

# **TAL1 und miR-17-92 bilden eine regulatorische Schleife in der Hämatopoese**

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik  
der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Annekarin Meyer**

aus Dernbach (Westerwald)

Hauptberichter:

Prof. Dr. Jörn Lausen

Mitberichter

Prof. Dr. Markus Morrison

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2020

Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart

2020



# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Summary</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>1 Einleitung</b> .....   | <b>5</b>  |
| 1.1 Hämatopoese.....  | 5         |
| 1.2 Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Hämatopoese.....                      | 8         |
| 1.3 Epigenetik .....  | 9         |
| 1.3.1 Chromatinorganisation.....  | 10        |
| 1.3.2 Posttranslationale Histonmodifikationen.....                                    | 12        |
| 1.3.3 DNA-Methylierung .....  | 13        |
| 1.4 MicroRNAs.....  | 14        |
| 1.4.1 Transkription und Prozessierung von miRNAs .....                                | 15        |
| 1.4.2 MiRNAs in der Hämatopoese .....   | 17        |
| 1.4.3 MiRNAs in der Pathogenese und Tumorigenese .....                                | 19        |
| 1.4.4 MiRNAs in der klinischen Anwendung und der Krebstherapie .....                  | 20        |
| 1.5 Das miR-17-92 Cluster .....   | 23        |
| 1.5.1 MiR-17-92 als Onkogen.....  | 24        |
| 1.6 TAL1 – T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1.....                           | 26        |
| 1.6.1 Struktur und Isoformen von TAL1.....  | 26        |
| 1.6.2 Heterodimerisierung von TAL1 mit E-Proteinen .....                              | 28        |
| 1.6.3 TAL1 bildet einen Multiproteinkomplex in der Hämatopoese .....                  | 29        |
| 1.6.4 TAL1 in Leukämien.....  | 33        |
| 1.6.5 Einfluss von TAL1 auf die Chromatinstruktur .....                               | 34        |
| 1.7 Zielsetzung der Arbeit.....   | 37        |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....  | <b>39</b> |
| 2.1 Material .....  | 39        |
| 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....   | 39        |
| 2.1.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur.....                                      | 40        |
| 2.1.3 Bakterien.....  | 41        |
| 2.1.4 Kits.....   | 41        |
| 2.1.5 Geräte.....   | 42        |
| 2.2 Zellbiologische Methoden .....  | 44        |
| 2.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien.....                                 | 44        |
| 2.2.2 Isolation von humanen primären CD34 <sup>+</sup> -Stammzellen.....              | 45        |
| 2.2.3 Kultivierung von humanen primären CD34 <sup>+</sup> -Stammzellen .....          | 45        |
| 2.2.4 Isolation von humanen CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen aus Thrombozyten-Spenden ..... | 46        |
| 2.2.5 Transfektion zur Virusherstellung .....   | 46        |
| 2.2.6 Ultrazentrifugation zur Virusernte .....  | 47        |
| 2.2.7 Transduktion von Zellen .....   | 47        |
| 2.2.8 Durchflusszytometrie .....  | 48        |
| 2.2.9 Durchflusszytometrische Sortierung von transduzierten Zellen.....               | 49        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.2.10   | <i>Colony forming unit-Assay</i> .....   | 49        |
| 2.3      | <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....   | 50        |
| 2.3.1    | Vektoren .....   | 50        |
| 2.3.1.1  | LeGO Vektoren .....  | 50        |
| 2.3.1.2  | SEW Vektor.....  | 51        |
| 2.3.1.3  | pGL4.10 Vektor.....  | 52        |
| 2.3.1.4  | pMirTarget Vektor .....  | 54        |
| 2.3.1.5  | pcDNA3 Vektor .....  | 56        |
| 2.3.2    | Polymerase-Kettenreaktion .....  | 57        |
| 2.3.3    | Gelelektrophorese zur Auftrennung von PCR-Produkten.....   | 58        |
| 2.3.4    | Aufreinigung eines PCR-Produktes .....   | 59        |
| 2.3.5    | Messung der DNA-Konzentration .....  | 60        |
| 2.3.6    | Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmid-DNA .....                                       | 60        |
| 2.3.7    | Ligation .....   | 61        |
| 2.3.8    | Transformation von kompetenten Bakterien.....  | 61        |
| 2.3.9    | Kultivierung von Bakterienkulturen .....   | 62        |
| 2.3.10   | Präparation von Plasmid-DNA .....  | 62        |
| 2.3.11   | Sequenzierung .....  | 63        |
| 2.3.12   | RNA-Isolation .....  | 63        |
| 2.3.13   | Umschreibung von RNA in cDNA.....  | 64        |
| 2.3.14   | Quantitative <i>Real-time</i> -PCR.....  | 64        |
| 2.3.14.1 | SYBR Green .....   | 65        |
| 2.3.14.2 | <i>TaqMan</i> -Sonden.....   | 67        |
| 2.3.15   | MiR-17-92 Cluster <i>Real-Time</i> PCR Assay Kit.....  | 68        |
| 2.4      | <i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....  | 69        |
| 2.4.1    | Zellkernextraktion .....   | 69        |
| 2.4.2    | DC-Protein-Assay.....  | 69        |
| 2.4.3    | Western Blot .....   | 70        |
| 2.4.4    | Luciferase-Reportergen-Assay.....  | 72        |
| 2.4.5    | Chromatin-Immunopräzipitations-Assay.....  | 73        |
| 2.5      | <i>Auswertung</i> .....  | 77        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>78</b> |
| 3.1      | <i>Identifikation von miR-17-92-Zielgenen</i> .....  | 78        |
| 3.2      | <i>TAL1 ist ein direktes Zielgen von miR-17-92 und wird von miR-19 reprimiert</i> .....          | 84        |
| 3.3      | <i>TAL1 und miR-17-92 regulieren sich gegenseitig</i> .....                                      | 86        |
| 3.4      | <i>TAL1 Knockdown führt zur Destabilisierung der E-Proteine</i> .....                            | 88        |
| 3.5      | <i>MiR-19 spielt eine essentielle Rolle während der Inhibition von TAL1 durch miR-17-92</i> .... | 96        |
| 3.6      | <i>TAL1 und E47 binden auf dem MIR17HG-Promotor</i> .....  | 99        |
| 3.7      | <i>Promotor-Analyse des MIR17HG-Promotors</i> .....  | 104       |
| 3.8      | <i>MiR-17-92 beeinflusst die Erythropoese in CD34<sup>+</sup>-Zellen</i> .....                   | 108       |
| 3.9      | <i>Der T-Zell Marker CD4 wird durch miR-17-92 Überexpression inhibiert</i> .....                 | 111       |
| 3.10     | <i>Altersabhängige Methylierung des MIR17HG-Gens beeinflusst die miR-17-92 Expression</i> ...    | 114       |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| <b>4</b>  | <b>Diskussion .....</b>  | <b>116</b> |
| 4.1       | <i>MiR-17-92 reguliert TAL1 und dessen Interaktionsnetzwerk .....</i>                                | 116        |
| 4.2       | <i>TAL1 bindet an den MIR17HG-Promotor und reguliert die miR-17-92 Expression .....</i>              | 119        |
| 4.3       | <i>MiR-19 aus dem miR-17-92 Cluster inhibiert die TAL1 Expression.....</i>                           | 122        |
| 4.4       | <i>MiR-17-92 beeinflusst über TAL1 die Differenzierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen.....</i>          | 124        |
| 4.5       | <i>CD4 ist ein weiteres Zielgen von miR-17-92.....</i>   | 125        |
| 4.6       | <i>Altersabhängige Methylierung des MIR17HG-Promotors beeinflusst die miR-17-92 Expression .....</i> | 127        |
| 4.7       | <i>MiR-17-92 und TAL1 als mögliche Ziele in der klinischen Anwendung .....</i>                       | 129        |
| <b>5</b>  | <b>Schlussfolgerung .....</b>  | <b>132</b> |
| <b>6</b>  | <b>Referenzen .....</b>  | <b>133</b> |
| <b>7</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>156</b> |
| <b>8</b>  | <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>160</b> |
| 8.1       | <i>Abbildungsverzeichnis .....</i>   | 160        |
| 8.2       | <i>Tabellenverzeichnis .....</i>   | 162        |
| <b>9</b>  | <b>Anhang .....</b>  | <b>164</b> |
| <b>10</b> | <b>Publikationen und Posterpräsentationen.....</b>   | <b>182</b> |
| 10.1      | <i>Publikationen .....</i>   | 182        |
| 10.2      | <i>Posterpräsentationen.....</i>   | 182        |
| 10.3      | <i>Präsentationen.....</i>   | 183        |
| <b>11</b> | <b>Danksagung .....</b>  | <b>184</b> |
| <b>12</b> | <b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>   | <b>185</b> |



## Summary

During hematopoiesis the regulation of cell fate determination and differentiation is tightly controlled by a complex network of gene regulatory factors such as transcription factors, cofactors and microRNAs (miRNAs). In this network transcription factors and miRNAs often form regulatory loops and influence each other's gene expression.

The miRNA cluster miR-17-92 is encoded by the *MIR17HG* gene, which is located on chromosome 13 (Ota et al. 2004) and produces six mature miRNAs: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a and miR-92a. It has diverse functions in physiological processes like hematopoiesis, embryonic development and B cell differentiation (Ventura et al. 2008), but is also widely described as an important oncogene since the miRNA cluster is highly expressed in a variety of cancer types like lung, breast, prostate and pancreas, but also in hematopoietic diseases (He et al. 2005; Mogilyansky and Rigoutsos 2013).

The transcription factor T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1 (TAL1) belongs to the class II of basic-helix-loop-helix (bHLH) proteins which form heterodimers with E-proteins, members of the class I bHLH-proteins (Murre et al. 1989). These heterodimers bind specifically to E-box motifs with the sequence CANNTG to the DNA (H. L. Hsu et al. 1991) and form multiprotein complexes with other transcription factors and cofactors which participate in TAL1 target gene regulation. TAL1 is essential for the formation of hematopoietic stem cells (HSCs) (Porcher et al. 1996) and is involved in megakaryocytic and erythroid differentiation (Shivdasani, Mayer, and Orkin 1995; Robb et al. 1995) while it is under physiological conditions downregulated in the lymphoid lineage (Y. Zhang et al. 2005). Besides, it is dysregulated in 60% of all T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cases (Look 1997; Ferrando et al. 2004; Bash et al. 1995) which occurs mostly due to chromosomal rearrangements or deletions, leading to aberrant TAL1 expression.

In this study, it was shown that the transcription factor TAL1 is a direct target of miR-17-92 and that TAL1 transcriptionally regulates the expression of miR-17-92. Hence, TAL1 and miR-17-92 create a regulatory loop in hematopoiesis.

T-cell leukemic Jurkat cells were overexpressed with miR-17-92 and a control vector and cultured in SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) medium. The cells were applied to mass-spectrometry analysis and 324 potential target genes, which were downregulated by miR-17-92 by an H/L ratio of at least 0.7 were obtained. Among these potential target genes, TAL1 was found to be inhibited by miR-17-92 overexpression which was accompanied by a reduced expression of the TAL1 transcriptional complex including the E-proteins E47 and HEB which are known to form heterodimers with TAL1 and the Lim-domain-binding protein 1 (LDB1). In this line a knockdown of TAL1 results in an increase of *miR-17-92* messenger RNA (mRNA) expression, supporting the idea, that TAL1 and miR-17-92 regulate each other

negatively. It could be found that TAL1 and E47 bind to the *MIR17HG* promoter and influence its expression. Furthermore, TAL1 knockdown destabilized the protein formation of its heterodimerization partners E47 and HEB which could be rescued by subsequent TAL1 overexpression.

Moreover, an analysis of the 3'-UTR of TAL1 displaying several potential binding sites for some members of the miR-17-92 cluster, revealed that miR-19 is the critical candidate in inhibiting TAL1 activity. This observation was further strengthened by a mutation of the miR-19 seed sequence within the miR-17-92 cluster whereby the repressive effect on TAL1 was abolished.

As TAL1 is a master regulator of erythroid differentiation a colony forming unit (CFU)-assay with human CD34<sup>+</sup>-cells transduced with miR-17-92 and a control vector was performed. It showed that the subsequent decrease of TAL1 leads to a decrease of erythroid colonies and the erythroid-specific surface markers glycophorin A (GPA) and CD71.

Interestingly, the T-helper cell-specific surface marker CD4 was notably downregulated during mass-spectrometry. This observation could be confirmed upon mRNA and flow cytometry measurement. Besides TAL1 and E47 binding could be detected on the CD4 enhancer, exhibiting a conserved double E-box. In this context a luciferase reporter gene assay demonstrated a repressive function of TAL1 on the E47 homodimer.

In addition to this, the *MIR17HG* promoter exhibits a long CpG-island which appears to be heavily methylated. This methylation pattern, which changes during aging, also influences the expression of miR-17-92.

Consequently, it can be concluded, that TAL1 and miR-17-92 both are interesting targets to influence progression of hematopoiesis especially towards erythroid differentiation. According to this study, it might be possible to enhance erythrocyte production by increasing TAL1 activity through targeting miR-17-92. As both factors are implicated in hematopoietic malignancies, it is possible, that a disturbance of the regulatory loop between TAL1 and miR-17-92 triggers the initiation of leukemia. Hence, the regulatory loop, which was described in this thesis can be an interesting target for new therapeutic approaches in the treatment of cancer. As TAL1 is abnormally expressed in T-ALL, a cell-specific expression of miR-19 in TAL1<sup>+</sup> malignant T cells might be a promising opportunity to downregulate TAL1 and thus contribute to curing T-ALL.



## Zusammenfassung

Während der Hämatopoese wird die Linienentscheidung und Differenzierung von Blutzellen durch ein komplexes Netzwerk aus regulatorischen Faktoren wie Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren und microRNAs (miRNAs) streng kontrolliert. Innerhalb dieses Netzwerkes bilden Transkriptionsfaktoren und miRNAs häufig regulatorische Schleifen aus und beeinflussen ihre Genexpression gegenseitig.

Das miRNA Cluster miR-17-92 wird von dem *MIR17HG*-Gen kodiert, welches auf Chromosom 13 liegt (Ota et al. 2004) und aus dem sechs reife miRNAs prozessiert werden: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a und miR-92a. Es hat diverse Funktionen in physiologischen Prozessen wie der Hämatopoese, der Embryonalentwicklung und der B-Zell-Differenzierung (Ventura et al. 2008). Allerdings ist das miRNA Cluster auch allgemein als wichtiges Onkogen beschrieben, da es in vielen Krebsarten wie Lungen-, Brust-, Prostata- und Bauchspeicheldrüsenkrebs aber auch in hämatologischen Erkrankungen hoch exprimiert wird (He et al. 2005; Mogilyansky and Rigoutsos 2013).

Der Transkriptionsfaktor *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1* (TAL1) gehört zur Klasse II der *basic-Helix-loop-helix* (bHLH) Proteine, die Heterodimere mit E-Proteinen ausbilden, welche zur Klasse I der bHLH-Proteine gehören (Murre et al. 1989). Diese Heterodimere binden spezifisch an E-Box Motive mit der Sequenz CANNTG an die DNA (H. L. Hsu et al. 1991) und bilden Multiproteinkomplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren, die zur Regulation der TAL1-Zielgene beitragen. TAL1 ist essentiell für die Bildung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) (Porcher et al. 1996) und ist in die megakaryozytäre und erythrozytäre Differenzierung involviert (Shivdasani, Mayer, and Orkin 1995; Robb et al. 1995), während es in der lymphoiden Linie unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert wird (Y. Zhang et al. 2005). Darüber hinaus ist TAL1 in 60% aller T-Zell akut lymphatischen Leukämien (T-ALL) fehlreguliert (Look 1997; Ferrando et al. 2004; Bash et al. 1995), was häufig aufgrund von chromosomalen Neuaneordnungen oder Deletionen, die zu aberranter TAL1 Expression führen, verursacht wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor TAL1 ein direktes Zielgen von miR-17-92 ist, und dass TAL1 die Expression des miR-17-92 Clusters transkriptionell reguliert. Folglich bilden TAL1 und miR-17-92 eine regulatorische Schleife in der Hämatopoese.

T-Zell-leukämische Jurkat-Zellen wurden mit miR-17-92 und einem Kontrollvektor transduziert und in SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)-Medium kultiviert. Die Zellen wurden durch Massenspektrometrie analysiert, wobei 324 potentielle Zielgene gefunden wurden, die mindestens um eine H/L Ratio von 0,7 durch miR-17-92 herunterreguliert waren. Unter diesen potentiellen Zielgenen befand sich auch TAL1, das durch miR-17-92 Überexpression inhibiert wurde. Dies ging mit einer Reduktion des TAL1-Komplexes, wie den E-Proteinen E47 und HEB sowie dem

*Lim-domain-binding protein 1* (LDB1) einher. In diesem Zusammenhang führte ein *Knockdown* von TAL1 zu einer Erhöhung der *miR-17-92* messenger RNA (mRNA) Expression, was die Idee, dass sich TAL1 und miR-17-92 gegenseitig negativ regulieren, unterstützte. Weiterhin konnte eine TAL1- und E47-Bindung am *MIR17HG*-Promotor entdeckt werden, was die Expression von miR-17-92 beeinflusst. Des Weiteren destabilisierte ein *Knockdown* von TAL1 die Proteinbildung seiner Heterdimerisierungspartner E47 und HEB. Eine anschließende Überexpression von TAL1 hob diesen Effekt auf und bewirkte eine Neubildung der Proteine.

Eine Analyse der 3'-UTR von TAL1, welche viele potentielle Bindestellen für miRNAs des miR-17-92 Clusters besitzt, offenbarte, dass miR-19 die entscheidende Rolle in der Inhibition der TAL1-Aktivität spielt. Diese Beobachtung wurde weiter durch eine Mutation der miR-19 *Seed*-Sequenz innerhalb des miR-17-92 Clusters unterstützt, durch die der reprimierende Effekt auf TAL1 aufgehoben werden konnte.

Da TAL1 ein Masterregulator der erythroiden Differenzierung ist, wurde ein *colony forming unit* (CFU)-Assay mit humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen, die mit miR-17-92 und einem Kontrollvektor transduziert wurden, durchgeführt. Er zeigte, dass die resultierende Herunterregulation von TAL1 zu einer geringeren Anzahl an erythroiden Kolonien sowie einer geringeren Expression der erythroid-spezifischen Oberflächenmarker Glykophorin A (GPA) und CD71 führte.

Interessanterweise war während der Massenspektrometrie auch der spezifische Marker für T-Helferzellen, CD4, deutlich herunterreguliert. Diese Beobachtung konnte auch durch Messung der mRNA Expression sowie durch durchflusszytometrische Analyse bestätigt werden. Außerdem konnte eine TAL1- und E47-Bindung auf dem *CD4-Enhancer* im Bereich einer konservierten doppelten E-Box entdeckt werden. In diesem Zusammenhang offenbarte ein Luciferase-Reportergen-Assay eine reprimierende Funktion von TAL1 auf das E47 Homodimer.

Des Weiteren enthält der *MIR17HG*-Promotor eine große CpG-Insel, die stark methyliert vorliegen kann. Dieses Methylierungsmuster, das sich im Laufe des Alters verändert, nimmt Einfluss auf die Expression von miR-17-92.

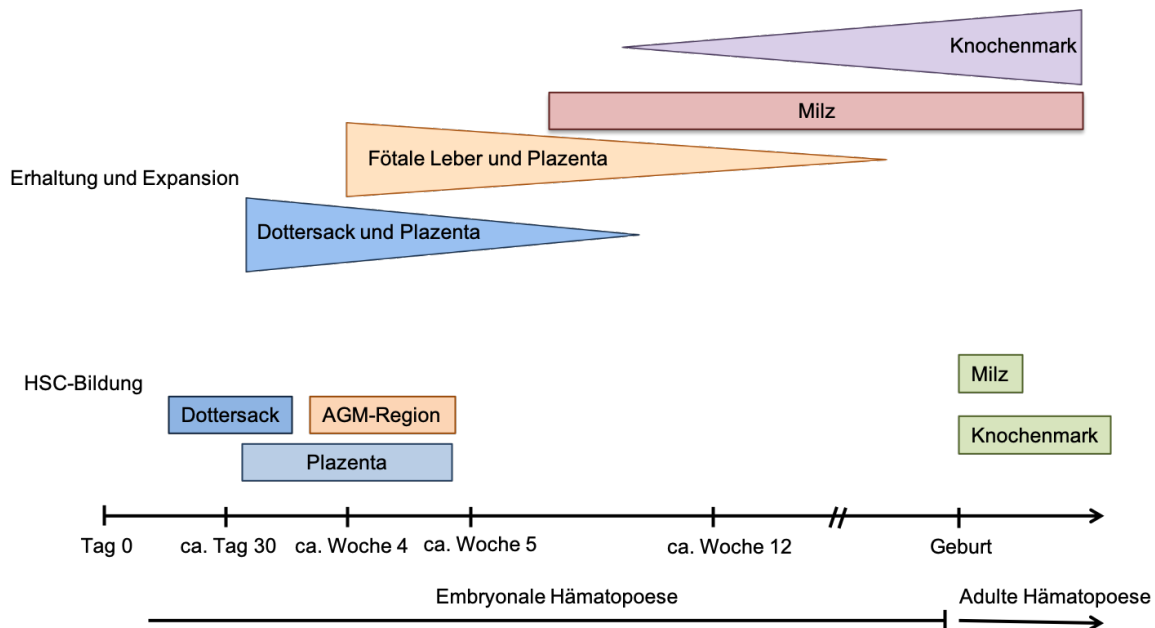
Folglich kann abschließend gesagt werden, dass TAL1 und miR-17-92 beides interessante Ziele darstellen, um die Hämatopoese in Richtung erythroider Differenzierung zu beeinflussen. Gemäß dieser Arbeit könnte es möglich sein, über miR-17-92 die Expression von TAL1 zu steigern und somit die Erythrozyten-Produktion zu fördern. Da beide Faktoren in Leukämie-Erkrankungen verwickelt sein können, ist es möglich, dass eine Störung der regulatorischen Schleife zwischen TAL1 und miR-17-92 eine Entwicklung von Leukämie auslöst. Daher könnte die regulatorische Schleife, die in dieser Arbeit beschrieben wurde, ein interessantes Ziel für neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von Krebs sein. Da TAL1 in T-ALL häufig hoch exprimiert vorkommt, könnte eine zell-spezifische Expression von miR-19 in TAL1<sup>+</sup> bösartigen T-Zellen eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, um TAL1 zu inhibieren und somit zur Heilung von T-ALL beizutragen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

In der Hämatopoese werden alle Zellen des Blutsystems aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) gebildet. Dazu zählen die roten Blutzellen (Erythrozyten), die Megakaryozyten, die Monozyten und Granulozyten, sowie die Lymphozyten. Reife Blutzellen weisen eine begrenzte Lebensdauer auf. Im Gegensatz dazu sind HSC in der Lage, sich selbst zu erneuern. Sie bilden die Spitze einer Hierarchie und können alle anderen kurzlebigen Blutzellen stetig neu bilden (Weissman 2000). So haben Erythrozyten beispielsweise eine durchschnittliche Lebensdauer von 30 bis 120 Tagen und Thrombozyten von 3 bis 10 Tagen.

Die Hämatopoese lässt sich einteilen in die embryonale (auch primitive) und die adulte (auch definitive) Hämatopoese, von der man ab dem Zeitpunkt der Geburt spricht. Die Hauptaufgabe der embryonalen Hämatopoese ist die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff durch die Bildung von Erythrozyten. Die Bereiche der HSC-Bildung und Expansion ändern sich permanent während der Embryogenese. Zunächst findet die Hämatopoese extraembryonal im Dottersack statt (Abbildung 1.1). Dort werden bereits vor dem ersten Herzschlag die ersten erythroiden Vorläuferzellen gebildet, allerdings findet im Dottersack keine terminale Differenzierung statt (McGrath and Palis 2005). Ab dem ersten Herzschlag ist auch die Plazenta eine Nische für die HSC-Bildung. Ab der vierten Schwangerschaftswoche bilden sich *de novo* HSCs dann intraembryonal in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region) und der Plazenta. Von der AGM-Region migrieren die HSCs in die Plazenta und die fetale Leber. Diese stellt das Hauptorgan für HSC-Expansion und -Differenzierung während des fetalen Lebens dar (Mikkola and Orkin 2006). Von dort aus besiedeln die HSCs recht schnell die Milz. Kurz vor der Geburt beginnt die adulte Hämatopoese, in der die HSCs langsam beginnen, in das Knochenmark zu wandern. Ab diesem Zeitpunkt kann auch eine Veränderung der HSC-Eigenschaften beobachtet werden. Sie gehen von dem fetalen proliferativen Phänotyp in einen Ruhezustand über, in dem sie sich selbst erneuern und erhalten können. Mit dieser Veränderung geht auch eine Modifikation der Oberflächenmarker einher (Ogawa et al. 2006). Ab der Geburt findet die HSC-Bildung überwiegend im Knochenmark und zu einem geringen Teil in der Milz statt (Rieger and Schroeder 2012; Mikkola and Orkin 2006; Orkin and Zon 2008)



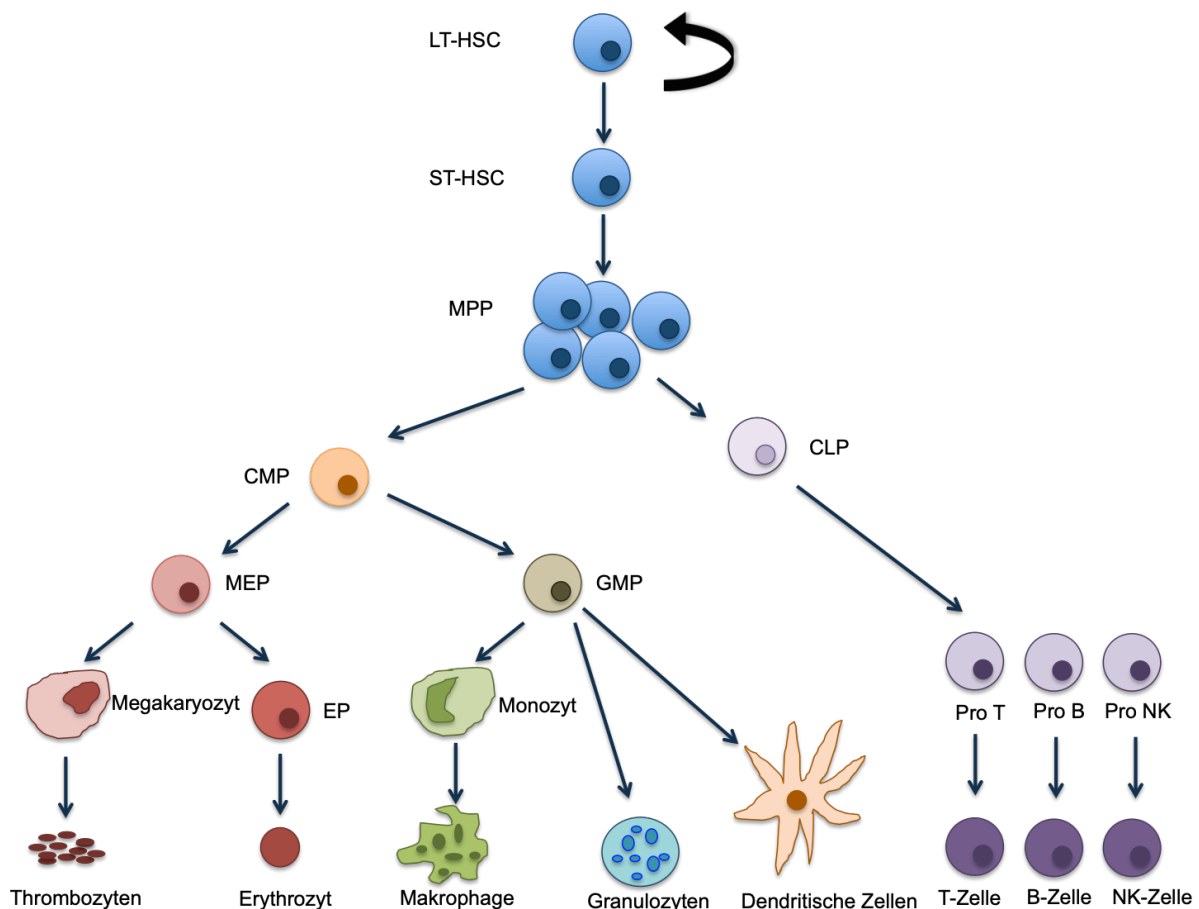
**Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Nischen der HSC-Bildung und -Expansion während der Embryogenese im Menschen.**

Die Hämatopoese im menschlichen Embryo beginnt extraembryonal im Dottersack und der Plazenta. Ab der vierten Schwangerschaftswoche findet sie in der AGM-Region statt. Die fötale Leber ist das Hauptorgan der fötalen HSC-Differenzierung und -Expansion. Ab der Geburt werden die HSCs überwiegend im Knochenmark produziert und expandiert. Modifiziert nach (Rieger and Schroeder 2012).

HSCs lassen sich in langzeit-repopulierende Stammzellen (*long-term HSC*, LT-HSC) und kurzzeit-repopulierende Stammzellen (*short-term HSC*, ST-HSC) unterscheiden (S. J. Morrison and Weissman 1994). LT-HSCs behalten ihr Leben lang das Potential, sich selbst zu erneuern und sich zu teilen (Abbildung 1.2). Aus ihnen gehen aber auch ST-HSCs hervor. Diese können nur kurz ihr Stammzellpotential halten und beginnen dann, in multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*, MPPs) zu differenzieren. Sie haben das Potential, sich in alle Zellen des Blutes zu differenzieren, können sich aber nicht mehr zurückentwickeln zu einer LT-HSC und sich selbst erneuern. Aus den MPPs bilden sich zunächst allgemeine myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor*, CMP) und allgemeine lymphoide Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitor*, CLP). Diese Vorläuferzellen sind in ihrem Differenzierungspotential auf ihre jeweilige Linie beschränkt. So können CMPs sich weiter in megakaryozytäre-erythroide Vorläuferzellen (*megakaryocyte erythroid progenitor*, MEP) oder granulozytäre-monozytäre Vorläufer (*granulocyte monocyte progenitors*, GMP) entwickeln. Aus den MEPs bilden sich dann weiter reife Erythrozyten, die für die Sauerstoffversorgung des Blutes zuständig sind, sowie Thrombozyten, die in der Wundheilung und der Blutkoagulation eine wichtige Rolle spielen (Rieger and Schroeder 2012). Aus GMPs entwickeln sich Makrophagen, Granulozyten und Dendritische Zellen, die unverzichtbare Aufgaben im Rahmen der

angeborenen Immunantwort einnehmen. CLPs können sich in drei verschiedene Lymphozyten differenzieren, T-, B- und NK-Zellen, die für die adaptive Immunantwort von Bedeutung sind. Ihrer reifen Form geht eine Vorläuferform des jeweiligen Lymphozyten-Typs voraus.

Das Blutssystem besitzt ein großes Anpassungspotential. In Stresssituationen, wie beispielsweise einer Anämie oder einer Infektion, kann es sofort reagieren und die Blutzellzahl drastisch erhöhen. Sobald die Stresssituation abgeklungen ist, kann das Blutssystem die Zellzahlen wieder an den physiologischen Zustand anpassen. Dieses Regenerationspotential der Stammzellen macht sich die Medizin seit vielen Jahren im Rahmen der Stammzelltransplantation zu Nutze (Rieger and Schroeder 2012).



**Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der Hämatopoese.**

LT-HSC stehen an der Spitze der hämatopoetischen Hierarchie und sind der Ursprung aller Blutzellen. Aus ihnen bilden sich MPPs, die wiederum Vorläufer der myeloiden und lymphoiden Linie formen. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich die reifen Blutzellen. LT-HSC: *Long-term* hämatopoetische Stammzelle; ST-HSC: *Short-term* hämatopoetische Stammzelle; MPP: *Multipotent progenitor*; CMP: *Common myeloid progenitor*; CLP: *Common lymphoid progenitor*; MEP: *Megakaryocyte erythroid progenitor*; GMP: *Granulocyte monocyte progenitor*; EP: *Erythrocyte progenitor*; Modifiziert nach (Passegué et al. 2003).

## 1.2 Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Hämatopoese

Das hämatopoetische System ist eine hierarchische Anordnung von unterschiedlich differenzierten Blutzellen, die bei der HSC beginnt, und in viele verschiedenen Zellarten mit diversen Funktionen mündet (Kapitel 1.1 und Abbildung 1.2). Sowohl die Differenzierung einer unreifen Blutzelle in eine reife Zelle mit linienspezifischen Eigenschaften als auch der Erhalt des Selbsterneuerungspotentials der HSCs unterliegen einem strikten Kontrollsystem. Dieses wird bedingt durch ein Zusammenspiel von verschiedensten intrinsischen und extrinsischen Faktoren (Orkin 2000; Orkin and Zon 2008; Cantor and Orkin 2002). Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die die Expression eines oder mehrerer Gene positiv oder negativ beeinflussen können, indem sie spezifisch an bestimmte Regionen der DNA binden und durch Rekrutierung der RNA-Polymerase die Transkription modulieren (Maston, Evans, and Green 2006). Sie können Einfluss auf die Linienentscheidung in der Hämatopoese nehmen und die Differenzierung einer unreifen Vorläufer- oder Stammzelle in eine bestimmte Richtung bedingen. Es gibt generelle Transkriptionsfaktoren, deren Anwesenheit am Promotor für jede Transkription notwendig ist, damit die RNA-Polymerase binden und aktiv werden kann. Die zweite Klasse von Transkriptionsfaktoren sind spezifische Transkriptionsfaktoren, zu denen auch die hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren zählen. Sie kommen nur in den Zellen vor, in denen sie auch für die Aktivierung oder Repression ihrer Zielgene benötigt werden. Diese spezifischen Transkriptionsfaktoren binden an eine Erkennungssequenz an der DNA in der Promotorregion, die bestimmte DNA-Abschnitte enthalten, sogenannte *Enhancer* oder *Silencer*, die die Transkription verstärken oder hemmen. Dabei spielt auch die Chromatinorganisation eine große Rolle. Wirkt ein Transkriptionsfaktor aktivierend auf die Genexpression, so vermittelt er beispielsweise Histonacetylierung, die zu einer Auflockerung des Chromatins führt, und somit die Bindung der Faktoren an die DNA erleichtert und die Aktivität des Promotors erhöht. Vermittelt ein Transkriptionsfaktor eine Repression der Genaktivität, so bedingen Histon-Deacetylasen eine dichtere Chromatinorganisation, was eine geringe Bindungsaffinität zur Folge hat und daher zu einer weniger effizienten Transkription führt. Transkriptionsfaktoren können außerdem Kofaktoren rekrutieren, die entweder als Koaktivatoren oder Korepressoren fungieren und somit Einfluss auf die Wirkung des Transkriptionsfaktors nehmen (D. S. Latchman 1997; David S Latchman 1993).

Zu den wichtigsten hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren gehören *mixed lineage-leukemia* (MLL), *runt-related transcription factor 1* (RUNX1), *T-cell acute lymphocytic leukemia 1* (TAL1), PU.1, *GATA binding protein 1* (GATA1) und *friend of GATA1* (FOG1). Ein Verlust eines dieser Gene führt zu maßgeblichen Störungen in der hämatopoetischen Entwicklung. RUNX1 ist beispielsweise während der primitiven Hämatopoese für die Entwicklung von HSCs in der AGM-Region unverzichtbar.

RUNX1 *Knockout*-Mäuse sterben am embryonalen Tag 12,5 aufgrund gänzlich fehlender Hämatopoese in der embryonalen Leber (Okuda et al. 1996). Eine Inaktivierung von RUNX1 in adulten HSCs hingegen beeinträchtigt die Stammzell-Eigenschaften nicht, führt jedoch zu Defekten in der megakaryozytären und lymphoiden Linienentwicklung (Ichikawa et al. 2004).

GATA1 wird insbesondere in Megakaryozyten- und Erythrozyten-Vorläufern exprimiert (Orkin and Zon 2008), wobei gezeigt werden konnte, dass das Expressionslevel ebenfalls Einfluss auf die Funktion des Transkriptionsfaktors nehmen kann. Geringe GATA1-Level gehen mit der Bildung von Eosinophilen einher, während höhere GATA1-Konzentrationen mit erythrozytärer und megakaryozytärer Differenzierung assoziiert werden (McDevitt et al. 1997). Ein Kofaktor von GATA1, FOG1, ist ebenfalls essentiell für die erythroide und megakaryozytäre Entwicklung (Tsang et al. 1997). Ein *Knockout* von FOG1 in Mäusen hat schwerwiegende Defekte der Megakaryopoese und der Erythropoese zur Folge (Tsang et al. 1998).

PU.1 ist in die myeloide sowie lymphoide Linienentscheidung involviert. Auch hier spielt die Konzentration des Transkriptionsfaktors eine Rolle für die Richtung, in die PU.1 die Expression seiner Zielgene steuert. Hohe PU.1-Level begünstigen die Differenzierung vom myeloiden Vorläufern in Makrophagen, während geringe Level B-Zell Entwicklung steuern (DeKoter and Singh 2000).

Da physiologische Genregulation und die Entwicklung von malignen Fehlregulationen sehr eng beieinander liegen, ist es nicht verwunderlich, dass die meisten bekannten hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren mit chromosomalen Translokationen oder somatischen Mutationen in Verbindung gebracht werden (Orkin and Zon 2008).

### 1.3 Epigenetik

Die basale Expression eines Gens und wie aktiv ein Gen während der Transkription abgelesen oder nicht abgelesen wird, hängt nicht ausschließlich von der DNA-Sequenz ab. Durch epigenetische Modifikationen können Prozesse im Zellkern ein- oder ausgeschaltet, verstärkt oder inhibiert werden, während sich das Erbgut, die DNA-Sequenz, nicht verändert. Der Begriff Epigenetik wurde erstmalig von Conrad Hal Waddington 1942 verwendet (Waddington 2012) und setzt sich zusammen aus dem griechischen Wort „epi“, was „über“ bedeutet, und -genetik. Folglich beschreibt die Epigenetik einen Prozess, der sich über den Genen und somit über der DNA-Sequenz abspielt. Sie betrifft nicht den Genotyp, sehr wohl aber den Phänotyp. Ein klassisches Beispiel stellen hierbei die äußerlichen Unterschiede zwischen eineiigen Zwillingen dar, die zwar genetisch identisch sind, aber dennoch geringe Variabilität im Phänotyp aufweisen (Bell and Spector 2011). Diese äußerlichen Abweichungen werden epigenetischen Veränderungen, die auch durch Umwelteinflüsse begünstigt werden können, zugeschrieben. Epigenetische Veränderungen werden durch Enzyme

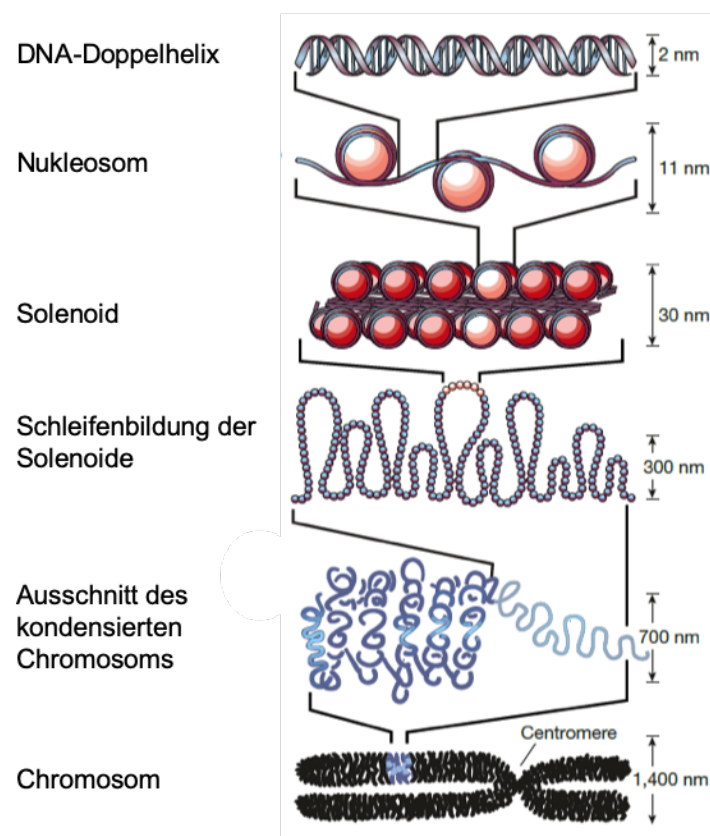
entweder an den Histonen oder der DNA direkt vorgenommen oder auch wieder entfernt. Die bekanntesten epigenetischen Modifikationen stellen Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung dar. Durch all diese enzymatischen Veränderungen kann die Form des Chromatins so beeinflusst werden, dass es beispielsweise sehr eng verpackt vorliegt. So ist es für Transkriptionsfaktoren, RNA-Polymerase und andere transkriptionelle Faktoren kaum zugänglich und wird daher mit inaktiver Genexpression assoziiert. Das Chromatin kann auch eine aufgelockerte Struktur einnehmen, die mit aktiver Transkription korreliert. Diese epigenetischen Modifikationen können bei der DNA-Replikation an die Tochterzelle weitergegeben werden (Slatkin 2009). Die Epigenetik nimmt eine essentielle Rolle in der Regulation der Zellphysiologie ein, da durch Stilllegung bestimmter Gene in einer Zelle entschieden wird, dass nur die dafür notwendigen Gene transkribiert werden. Natürlich können durch Störungen während dieser Prozesse Krankheiten wie beispielsweise Krebs initiiert werden. Wird ein Tumorsuppressorgen fälschlicherweise mit reprimierenden epigenetischen Modifikationen markiert und daher stillgelegt, kann es zu Fehlexpressionen kommen, die zu malignem Zellwachstum führen können.

### 1.3.1 Chromatinorganisation

Die gesamte DNA einer eukaryotischen Zelle hat eine Länge von zwei Metern und einen Durchmesser von nur zwei Nanometern. Damit die gesamte DNA einer Zelle in einer organisierten Form in den Zellkern passt, ist sie in einer komplexen Struktur, dem Chromatin, angeordnet. Das Chromatin besteht aus Kernproteinen, sogenannten Histonen, um die sich die DNA-Doppelhelix windet und durch Kondensation schließlich die kompakte Struktur eines Chromosoms erreicht, in der die DNA in der Zelle vorliegt. Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Es besteht aus etwa 165 Basenpaaren, die sich zweimal um ein Histon winden, und einer etwa 10 bis 80 Basenpaar-langen Linker-DNA, die mehrere Nukleosome miteinander verbindet (Abbildung 1.3). Ein Histon besteht aus jeweils zwei Kopien der vier Kern-Histone, H3, H4, H2A und H2B, wobei sich diese Kern-Histone als Heterodimer (H3/H4 und H2A/H2B) anlagern. Somit bildet sich ein Histon-Oktamer (Thomas and Kornberg 1975). Histone sind sehr basisch und weisen eine hohe Dichte an Lysin und Arginin auf (Bowman and Poirier 2015). Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Interaktionen zwischen der DNA und den Histonen binden die DNA an den Kernbereich der Histone (Arents and Moudrianakis 1993). Die Nukleosome reihen sich aneinander und bilden ein Solenoid, eine Struktur mit einem Durchmesser von 30 nm. Die 30 nm-Faser bindet ein fünftes Histon, das H1, das jedes Nukleosom mit der Linker-DNA verbindet und der Struktur Stabilität verleiht (Felsenfeld and Groudine 2003). Durch Schlaufenbildung kondensiert das Chromatin immer weiter, bis es zur Entstehung der Chromosomen kommt (Abbildung 1.3) (Luger et al. 1997). Wie genau



es zur Bildung dieses höchsten Kondensationsgrades des Chromatins kommt, ist nach wie vor nicht komplett verstanden. Die Chromatinstruktur ist dynamisch und lässt sich grundsätzlich in Hetero- und Euchromatin unterscheiden, wobei Heterochromatin transkriptionell inaktive, stark kompakte Chromatinbereiche bezeichnet (Emil 1928), während Euchromatin weniger stark kondensiert und zugänglich für Transkriptionsfaktoren ist. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, durch die die Struktur des Chromatins modifiziert werden kann. Nukleosome können durch spezifische Komplexe remodelliert werden, wodurch sich die Histon-Oktamere für kurze Distanzen entlang der DNA bewegen und so bestimmte Bereiche der DNA freigeben. Dieser Prozess läuft unter Verbrauch von ATP ab (Becker and Hörz 2002). Eine weitere Möglichkeit der Chromatinmodifikation besteht durch posttranslationale Modifikationen (Bowman and Poirier 2015). Außerdem gibt es Histonvarianten mit veränderter Proteinsequenz, die eine höhere Affinität für bestimmte Proteine oder eine bestimmte chemische Modifikation besitzen, welche die Kern-Histone ersetzen können (Ahmad and Henikoff 2002; Redon et al. 2002; Smith 2002).



**Abbildung 1.3. Organisation des Chromatins.**

Die DNA-Doppelhelix windet sich jeweils zweimal um ein Histon und bildet sogenannte Nukleosome. Die Nukleosome reihen sich aneinander und bilden ein Solenoid. Durch Schleifenbildung kondensieren die Solenoide immer weiter bis sie die Struktur eines kompakten Chromosoms aufweisen. Modifiziert nach (Felsenfeld and Groudine 2003).

### 1.3.2 Posttranslationale Histonmodifikationen

Eine entscheidende Rolle in der Regulation der dynamischen, alternierenden Struktur des Chromatins nehmen posttranslationale Modifikationen (PTM) ein, welche die Zugänglichkeit der DNA und infolgedessen die transkriptionelle Aktivität bestimmter Gene maßgeblich beeinflussen. Zu den bekanntesten PTMs gehören Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung. Diese PTMs können an den N-terminalen Histonschwänzen, die aus dem Nukleosom herausragen und reich an Lysin und Arginin sind, vorgenommen werden. Sie werden durch spezifische Enzyme katalysiert. Histon-Acetyltransferasen (HAT) können zum Beispiel eine Acetylgruppe zu der Aminosäure Lysin hinzufügen, wodurch eine positive Ladung des Histons entfernt wird. Dadurch wird die Bindung zur negativ geladenen DNA etwas schwächer, was wiederum zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur führt. Infolgedessen wird Histon-Acetylierung mit erhöhter Genaktivität in Verbindung gebracht (W. Zhang et al. 1998). Folglich werden sie vorwiegend in aktiven Promotorbereichen gefunden. Bekannte Histon-Acetylierungen sind H3K9Ac (Acetylierung an Lysin 9 des Histons 3), H3K14Ac (Acetylierung an Lysin 14 des Histons 3) und H3K27Ac (Acetylierung an Lysin 27 des Histons 3) (Creyghton et al. 2010; Koch et al. 2007). Acetylgruppen können enzymatisch durch Histondeacetylasen (HDAC) wieder entfernt werden.

Histon-Methylierung kann an den Aminosäuren Lysin und Arginin beobachtet werden und führt, je nach Art der Methylierung, zu einer Repression oder Aktivierung der Genexpression. Die Methylierung erfolgt durch spezifische Arginin- oder Lysin-Methyltransferasen, durch Histon-Demethylasen können Methyl-Gruppen von den Aminosäuren wieder entfernt werden. Bekannte aktivierende Histon-Methylierungen finden an Lysin 4 des Histons 3 (H3K4) statt. Diese Histonmodifikation kann als Mono-, Di- und Trimethylierung vorgefunden werden, während eine Trimethylierung von Lysin 27 des Histons 3 (H3K27me<sub>3</sub>) eine reprimierende Histonmarkierung darstellt. Die aktivierende Histonmarkierung H3K4me<sub>3</sub> und die inhibierende Modifikation H3K27me<sub>3</sub> können zeitgleich in einer bestimmten Chromatin-Region vorhanden sein. Man findet dieses bivalente Chromatin häufig in Genen von HSCs, deren Expression gering gehalten werden muss, bis sie durch ein Differenzierungssignal aktiviert werden, und deren Transkription vorangehen darf (Lausen 2013). Serin-Reste können durch Kinasen phosphoryliert werden, Phosphatasen haben die Fähigkeit, diese Phosphatgruppen von den Histonschwänzen wieder zu entfernen.

Die Modifikation von Histonen ist ein dynamischer Prozess. Sie wechseln permanent, passen sich an die Gegebenheiten an und interagieren miteinander. Eine Phosphorylierung an einer bestimmten Stelle kann beispielsweise die Acetylierung an einer anderen Stelle begünstigen. Ebenfalls Einfluss auf die Dynamik der Histonmodifikationen kann die DNA-Methylierung (Kapitel 1.3.3) nehmen. Wenn eine CpG-Insel methyliert vorliegt, können spezifische DNA-Bindeproteine rekrutiert

werden, die wiederum HDACs aktivieren, die folglich Histon-Acetylierungen entfernen und zur Repression des Gens beitragen (Felsenfeld and Groudine 2003). Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Histonacetylierung auch dafür verantwortlich sein kann, dass ein bestimmter Promotorbereich unmethyliert bleibt (Mutskov et al. 2002). Nukleosome, die an Lysin 9 des Histons 3 methyliert sind und von dem Heterochromatin Protein HP1 gebunden werden, rekrutieren die H3K9me3-spezifische Methyltransferase SUV39H1, wodurch die benachbarten Nukleosome ebenfalls methyliert werden (Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001). Eine ähnliche Art der „Selbstvermehrung“ kann auch bei Acetylierung beobachtet werden. Liegt ein Lysin acetyliert vor, wird es von einer Acetyltransferase erkannt, die die benachbarten Nukleosome auch acetyliert.

### 1.3.3 DNA-Methylierung

Epigenetische Modifikationen können nicht nur an den Histonen beobachtet werden. Sie können auch direkt an der DNA in Form von DNA-Methylierung vorgenommen werden. Man versteht darunter das Hinzufügen einer Methyl-Gruppe an das fünfte Kohlenstoffatom des Cytosins eines CpG-Dinukleotids (Robertson 2002). Diese Reaktion wird durch eine von drei verschiedenen DNA-Methyltransferasen (Dnmts) katalysiert. Dabei ist die Dnmt1 für die Erhaltung der DNA-Methylierung verantwortlich während die Dnmt3a und Dnmt3b *de novo* Methylierung an der DNA katalysieren (Beerman and Rossi 2014). Die DNA-Methylierung führt zu einer Inaktivierung oder Stilllegung bestimmter Gene (Robertson 2002) und ist essentiell für die Embryonalentwicklung, wie durch verschiedene *Knockout*-Experimente der Dnmts demonstriert werden konnten. Mäuse, denen eine dieser drei Dnmts fehlt, sind nicht lebensfähig (Okano et al. 1999; E. Li, Bestor, and Jaenisch 1992).

Viele Studien beweisen, dass sich das Methylierungsmuster im Laufe des Alters verändert (Beerman et al. 2013). In älteren Stammzellen konnte beispielsweise eine erhöhte DNA-Methylierung an Transkriptionsfaktor Bindestellen gefunden werden, die die Transkription von Differenzierungsgenen aktiviert sowie eine verminderte DNA-Methylierung in Bereichen, die für HSC-Erhaltung bekannt sind (Sun et al. 2014). Der Weg von der HSC zu den differenzierten linienspezifischen Zellen ist strikt durch DNA-Methylierung reguliert (Bock et al. 2012). Daher kann eine Fehlregulation des Methylierungsmusters in HSCs an die Tochterzellen weitergegeben werden, was die Genexpression und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen beeinflussen kann (Beerman and Rossi 2014). Darüber hinaus sind methylierte CpGs anfällig für Mutationen (Cooper and Krawczak 1989; Mazin 2009). Studien in Mäusen haben gezeigt, dass die Ansammlung von Mutationen an methylierten CpGs von HSC-Genen mit steigendem Alter das Risiko für AML erhöht (Jan et al. 2012; Krivtsov et al. 2013; Will et al. 2012), was zumindest teilweise durch einen Verlust der Methylierung

beispielsweise durch eine Dysregulation von Dnmt1 verursacht wird (Beerman and Rossi 2014).

## 1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind einzelsträngige, etwa 22 Nukleotid-kurze, nicht-protein-kodierende RNAs, welche die Expression unterschiedlichster Gene regulieren, indem sie ihre Zielgene posttranskriptional inhibieren oder degradieren. Dazu binden sie mit ihrer *Seed*-Sequenz komplementär an die Erkennungssequenz des Zielgens, die sich meistens in der 3'-UTR befindet. Die *Seed*-Sequenz ist ein etwa sechs Nukleotid-langer Bereich im vorderen Teil der miRNA, der perfekt mit der Zielsequenz binden muss, damit die miRNA regulatorisch auf das Gen Einfluss nehmen kann. Der restliche Teil der miRNA-Sequenz muss nicht 100% komplementär binden. Es wird davon ausgegangen, dass eine perfekte Bindung der *Seed*-Sequenz zu einer kompletten Degradation der Ziel-mRNA führt (György Hutvágner and Zamore 2002; Zeng, Wagner, and Cullen 2002), während eine nicht gänzlich komplementäre Bindung lediglich die Inhibition der Protein-Translation zur Folge hat (R. C. Lee, Feinbaum, and Ambros 1993; Wightman, Ha, and Ruvkun 1993). Dabei nimmt die Inhibition der Translation durch mRNA-Abbau den größeren Teil der beiden Vorgänge ein (Guo et al. 2010). MiRNAs liegen meist hoch konserviert vor, entweder zwischen verwandten Spezies, teils aber auch über mehrere Spezies verteilt.

Lin-4 war die erste miRNA, die 1993 von Lee und Kollegen (1993) in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben wurde (R. C. Lee, Feinbaum, and Ambros 1993). Dort reguliert lin-4 durch Bindung an die mRNA des Gens *lin-14* einen Entwicklungsschritt im frühen Larvenstadium. Danach gab es zunächst sieben Jahre keinen Hinweis auf die Existenz von weiteren miRNAs (Bartel 2004). Erst im Jahr 2000 wurde mit der Entdeckung von let-7 (Reinhart et al. 2000) die Vermutung gestärkt, dass miRNAs eine größere Rolle in der Genregulation multizellulärer Organismen einnehmen könnten (Wienholds and Plasterk 2005). Let-7, ähnlich wie lin-4, reguliert den Übergang von einem späten Larvenstadium zu einem adulten Zelltyp (Reinhart et al. 2000), darüber hinaus wurde let-7 dann im Menschen und in Drosophila sowie elf weiteren bilateralen Tierspezies entdeckt (Pasquinelli et al. 2000).

Nach heutigem Stand sind etwa 8000 Gene in unterschiedlichsten Organismen, wie Pflanzen, Viren und Tieren beschrieben worden, die für miRNAs kodieren, darunter allein 1000 in menschlichen Zellen (Mendes, Freitas, and Sagot 2009). Sie regulieren viele biologische und essentielle Prozesse, wie Zellproliferation, Zelltod und Fettmetabolismus (Brennecke et al. 2003; P. Xu et al. 2003) sowie hämatopoetische Prozesse während der Linienentscheidung (C. Z. Chen et al. 2004), kommen jedoch nicht in einzelligen Organismen wie Hefen vor (Shivdasani 2006). Computerbasierten Vorhersagen zufolge werden möglicherweise 20-30% aller menschlichen Gene durch

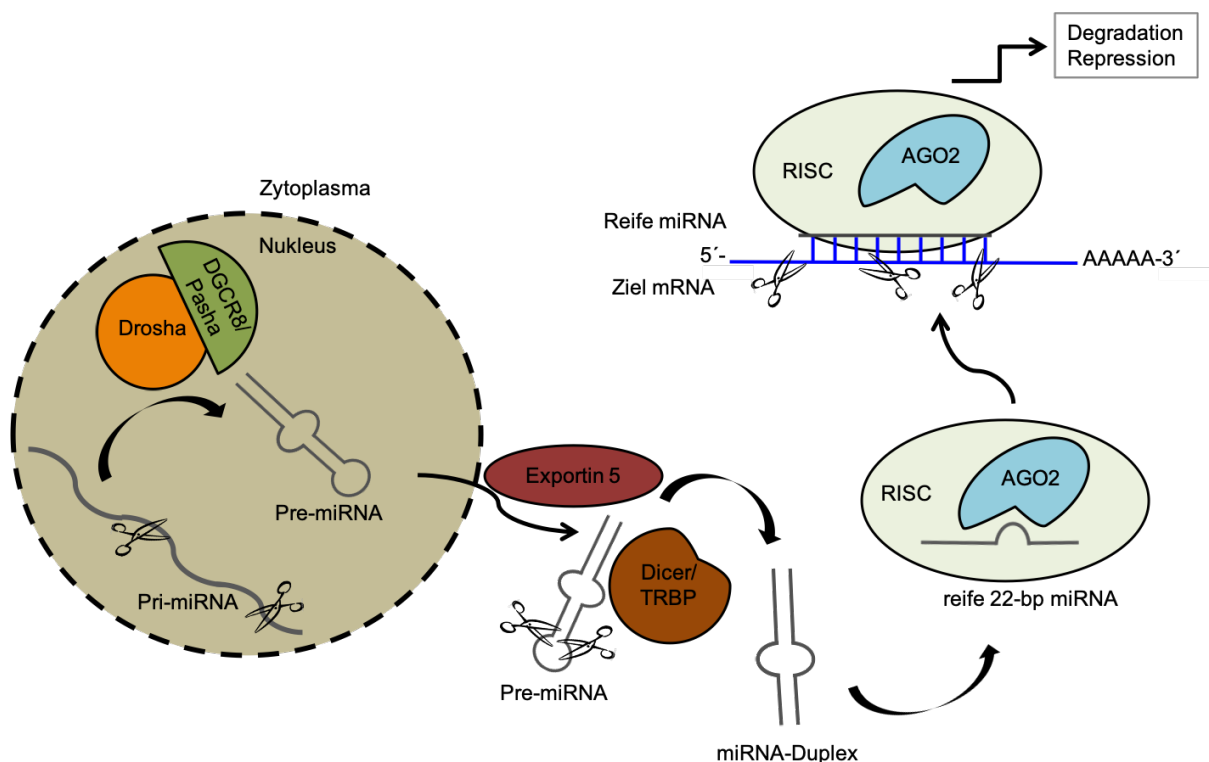
miRNAs reguliert (B P Lewis et al. 2005; Xie et al. 2005). Dabei kann eine einzelne miRNA die Expression von mehr als 200 Zielgenen regulieren, während ein Gen ebenfalls von mehreren miRNAs beeinflusst werden kann (Fang et al. 2017).

MiRNAs unterscheiden sich in einigen wesentlichen Punkten von *small interfering RNAs* (siRNAs), die im Grunde aber die gleichen Funktionen ausüben. Beide Klassen von kleinen RNAs regulieren Genexpression, indem sie posttranskriptional inhibieren und Protein-Translation verhindern (Shivdasani 2006). Während miRNAs von etwa 70 Nukleotid-langen Vorläufer-RNAs, die als Haarnadel-Struktur vorliegen, im Nukleus entstehen und später ins Cytosol exportiert werden, werden siRNAs von langen doppelsträngigen RNAs im Cytosol prozessiert. Sie werden von Transposons, Viren und heterochromatischer DNA kodiert (Zamore and Haley 2005). MiRNAs hingegen werden von ihren eigenen Genen transkribiert. Von jedem Arm des miRNA-Vorläufers, der als Haarnadel-Struktur vorliegt, wird eine reife miRNA gebildet, sodass ein miRNA-miRNA\*-Duplex resultiert. Aus jedem siRNA-Vorläufer kann allerdings eine Vielzahl an siRNA-Duplexen entstehen, was zu einer großen Ansammlung an verschiedenen siRNAs aus einem Vorläufer resultieren kann (Bartel 2004). Eine weitere wichtige Unterscheidung kann im Hinblick auf die mRNA Degradation getroffen werden. SiRNAs benötigen perfekte Basenpaarung um die mRNA des Gens zu binden und zu inhibieren, von dem sie selbst entstanden sind. MiRNAs benötigen keine perfekt komplementäre Bindung die darüber hinaus sogar an anderen Genen, die weit entfernt auf einem anderen Locus liegen, stattfinden kann (Bartel 2004), was auch ihre hohe evolutionäre Konservierung erklärt. Eine Mutation der miRNA-Sequenz würde keine Kompensationmechanismen beim Zielgen auslösen. Der Selektionsdruck würde die miRNA-Sequenz aufrechterhalten. SiRNAs sind nicht konserviert sondern variieren zwischen verschiedenen Spezies. Eine Mutation ihrer Sequenz würde auch zu einer Veränderung der Sequenz des Zielgens führen. Somit bliebe die Regulation durch die siRNA aufrecht erhalten (Bartel 2004).

#### 1.4.1 Transkription und Prozessierung von miRNAs

Die Transkription von miRNAs findet zunächst, wie bei jedem anderen Gen, im Zellkern statt. Die Gene, aus denen miRNAs transkribiert werden, können entweder im Intron oder Exon eines Gens liegen, wo sie den gleichen Promotor wie ihr Wirtsgen zur Transkription nutzen (Rodriguez et al. 2004) oder in Zwischengenregionen, wo sie unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors stehen (Monteys et al. 2010). Sie werden von der RNA-Polymerase II in eine so genannte *primary miRNA* (pri-miRNA) transkribiert (Y. Lee et al. 2004), eine etwa 1 Kilobase (kb) lange Struktur, die sich zu einer Schleife zusammenfaltet und einen typischen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende sowie ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende besitzt (Bracht et al. 2004; Cai, Hagedorn, and Cullen 2004). In einem weiteren Reifungsschritt schneidet die

Endonuklease Drosha, eine RNase III, zusammen mit einem Komplex, bestehend aus Nukleasen und assoziierten Faktoren sowie dem doppelsträngigen RNA-Bindeprotein DGCR8/Pasha die pri-miRNA in etwa 50-80 Nukleotid-große Vorläufer-miRNAs, auch *precursor miRNAs* (pre-miRNAs) genannt (Y. Lee et al. 2003; Denli et al. 2004). Diese Vorläufer-miRNAs lagern sich dabei zu einer typischen Haarnadelstruktur zusammen, welche durch ihre geringe Größe den Export aus dem Nukleus ins Zytoplasma ermöglicht. Dieser wird aktiv von dem Ran-GTP-abhängigen Faktor Exportin-5 gesteuert (Yi et al. 2003; Lund et al. 2004). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA über eine weitere RNase III, das Enzym Dicer, in etwa 22 Nukleotid-kurze doppelsträngige Fragmente geschnitten (G. Hutvágner et al. 2001), welche die reife miRNA enthalten. Durch Zusammenarbeit mit dem RNA-Bindeprotein TRBP gelingt es Dicer, die doppelsträngigen RNA-Komplexe zu einzelsträngiger RNA zu prozessieren (Fareh et al. 2016). Folglich entstehen aus jeder Haarnadelstruktur zwei reife miRNAs, eine sogenannte guide RNA mit dem 5'-Terminus am Ende und die Gegenstrang miRNA\*, die klassischerweise mit einem Stern (\*) gekennzeichnet ist. Der Einzelstrang wird mithilfe des Proteins Argonate 2 (AGO2) in einen *RNA-induced silencing complex* (RISC-Komplex) integriert. Die Bildung des RISC-Komplexes erfolgt asymmetrisch mit der miRNA des Duplexes, der die geringere thermodynamische Stabilität und eine weniger starke Basenpaarung am 5'-Ende aufweist (Schwarz et al. 2003; Khvorova, Reynolds, and Jayasena 2003). In dieser einzelsträngigen Form kann die reife miRNA an ihre Ziel-mRNA binden und regulatorisch wirksam werden.



**Abbildung 1.4. MiRNA Prozessierung und Reifung von der Transkription der Vorläufer-miRNA bis hin zur reifen funktionsfähigen miRNA.**

Das Gen einer miRNA wird abgelesen um zunächst eine unreife pri-miRNA zu bilden, die als langes Molekül vorliegt. Daraus werden mithilfe der Endonuklease Drosha und DGCR8/Pasha die haarnadelförmigen Strukturen der pre-miRNA ausgebildet. In dieser Form verlässt die pre-miRNA den Nukleus, ein Prozess, der aktiv von Exportin-5 unterstützt wird. Im Zytoplasma zerschneidet die RNase Dicer in Kooperation mit TRBP die Schleife der Haarnadelstruktur. Die pre-miRNA liegt dann in Form von zwei einzelsträngigen miRNA Stücken als miRNA-Duplex vor. Eine einzelsträngige guide RNA wird dann in den RISC-Komplex integriert, was durch Argonaute 2 ausgelöst wird. In dieser einzelsträngigen Form bindet die miRNA an ihre Ziel-mRNA und führt zu translationaler Repression oder Degradation. Pre-miRNA: *precursor* microRNA; Pri-miRNA: *primary* microRNA; mRNA: *messenger* RNA; RISC: *RNA-induced silencing complex*; AGO2: Argonaute 2; Modifiziert nach (Shivdasani 2006).

#### 1.4.2 MiRNAs in der Hämatopoese

Die Hämatopoese ist ein komplexer Prozess, der die kontinuierliche Differenzierung von multipotenten HSCs in die verschiedenen Linien der Blutentwicklung steuert. Dabei sind zwei Prozesse fundamental, zum einen die ständige Selbsterneuerung von HSCs und zum anderen die terminale Differenzierung der Vorläuferzellen in die entsprechenden, reifen Blutzellen. Diese Prozesse werden durch unterschiedlichste Faktoren kontrolliert und reguliert, unter anderem von miRNAs. Es konnte nachgewiesen werden, dass miRNAs in fast jedem Schritt der Hämatopoese eine entscheidende Rolle spielen (Abbildung 1.5).

Durch einen *Knockout* von Dicer im Mausmodell konnte die Wichtigkeit von miRNAs während der hämatopoetischen Entwicklung ebenfalls verdeutlicht werden, da diese Mäuse embryonal letal sind (Bernstein et al. 2003). Mit einem konditionellen *Knockout* mit einer Lck-Cre transgenen Maus zu einem frühen T-Zell-Entwicklungsschritt konnte gezeigt werden, dass Dicer offensichtlich nicht für die CD4 und CD8 T-Zell-Entwicklung verantwortlich ist (Cobb et al. 2006), jedoch eine Rolle bei regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>) einnimmt (Cobb et al. 2005).

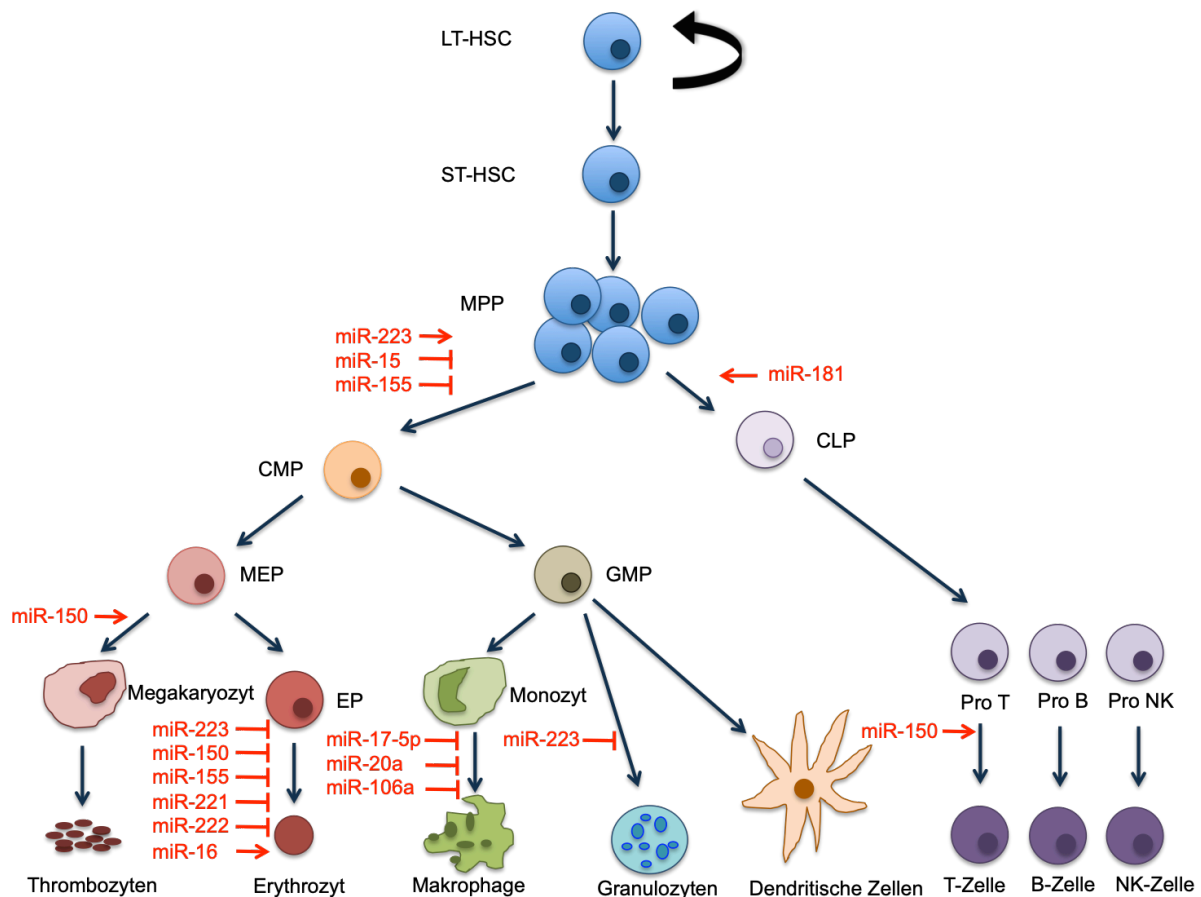
Chen und Kollegen haben 2004 drei miRNAs entdeckt, die vorzugsweise in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, miR-181a, miR-223 und miR-142. Dabei haben sie sich auf miR-181a, eine miRNA, die insbesondere im Thymus und im Knochenmark von Mäusen exprimiert wird, fokussiert. In einem Transplantationsversuch mit letal bestrahlten Mäusen konnte ein zweifacher Anstieg der B-Lymphozyten durch miR-181a Überexpression beobachtet werden, während eine zweifache Reduktion der zirkulierenden T-Lymphozyten und eine 90%ige Verminderung der CD8<sup>+</sup> Population festzustellen war (C. Z. Chen et al. 2004). Interessanterweise konnte der positive Effekt auf die B-Zell-Differenzierung im Maus Knochenmark durch Mutation der *Seed*-Sequenz von miR-181a reduziert werden (C. Z. Chen and Lodish 2005). Entsprechend konnte postuliert werden, dass miR-181a einen spezifischen positiven Regulator der B-Zell-Differenzierung im Mausmodell darstellt.

MiR-221 und miR-222 sind in CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurblut hoch exprimiert. Induzierte erythroide Differenzierung *in vitro* resultierte in einer Reduktion dieser miRNAs. Dabei ist *c-kit* ein mögliches Zielgen von miR-221 und miR-222. Da die beiden miRNAs eine identische *Seed*-Sequenz besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass sie die gleichen Zielgene binden können. Bei einer Messung der *c-kit*-mRNA lässt sich ein umgekehrt proportionales Verhältnis zur miRNA Konzentration feststellen (Felli et al. 2005).

MiR-150 ist eine weitere hämatopoetische miRNA, die in reifen, ruhenden B- und T-Lymphozyten vorhanden ist, jedoch nicht in Lymphozyten-Vorläuferzellen und auch nicht in weiter differenzierten T-Helferzellen (Monticelli et al. 2005). Durch miR-150 Überexpression in HSCs werden reife B-Zellen herunterreguliert, was daraus resultiert, dass diese miRNA den Übergang vom pro-B- zum pre-B-Zellstadium inhibiert (Zhou et al. 2007). Darüber hinaus ist der Transkriptionsfaktor c-MYB, der die Entwicklung der Lymphozyten kontrolliert, ein Zielgen von miR-150 und wird hoch in Lymphozyten-Vorläufern, jedoch nicht in reifen B- und T-Zellen exprimiert (Xiao et al. 2007).

In aktivierten B- und T-Zellen, sowie in aktivierten Monozyten hingegen, findet man miR-155. Eine Überexpression dieser miRNA in transgenen Mäusen führte zu einer leukämischen Proliferation von unreifen B-Zellen in der Milz sowie dem Knochenmark der Mäuse (Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N 2006). Auch in der myeloiden Linienentscheidung spielen miRNAs eine wichtige Rolle. Ein Beispiel stellt hierbei miR-223 dar, die in hoher Konzentration in CD34<sup>+</sup>-Knochenmarkzellen, jedoch nicht in B- oder T-Lymphozyten vorhanden ist. Sie bildet einen negative regulatorische Schleife mit dem Transkriptionsfaktor *negative nuclear factor 1A* (NFIA) und begünstigt die Granulozyten-Differenzierung in Mäusen (Fazi et al. 2005). Darüber hinaus konnte miR-223 ebenfalls eine Rolle in der Erythropoese nachgewiesen werden. Sie bindet an die 3'-UTR des *LIM-only protein 2* (LMO2) und inhibiert dessen Expression. Dadurch wird wiederum die Differenzierung und Reifung erythroider Zellen blockiert. Wird die miRNA herunterreguliert, können Progenitorzellen zu reifen erythroiden Zellen heranreifen (Felli et al. 2009).





**Abbildung 1.5. Schematische Darstellung des hämatopoetischen Systems mit einigen ausgewählten miRNAs.**

Die in rot eingezeichneten miRNAs üben eine bereits beschriebene Rolle während der Linienentscheidung der Hämatopoese aus. Ein Pfeil symbolisiert dabei eine aktivierende, ein Balken eine inhibierende Funktion. LT-HSC: *Long-term* hämatopoetische Stammzelle; ST-HSC: *Short-term* hämatopoetische Stammzelle; MPP: *Multipotent progenitor*; CMP: *Common myeloid progenitor*; CLP: *Common lymphoid progenitor*; MEP: *Megakaryocyte erythroid progenitor*; GMP: *Granulocyte monocyte progenitor*; EP: *Erythrocyte progenitor*; Modifiziert nach (Bissels, Bosio, and Wagner 2012).

### 1.4.3 MiRNAs in der Pathogenese und Tumorigenese

MiRNAs spielen eine wichtige Rolle in verschiedensten physiologischen biologischen Prozessen, wie Zelldifferenzierung, Proliferation, Metabolismus, Angiogenese und Apoptose. Vielen miRNAs konnte allerdings auch bereits eine Rolle in der Metastasierung und Tumorigenese zugeschrieben werden, insbesondere in Leukämien. Ein bekanntes Beispiel stellen hierbei miR-15a und miR-16-1 dar, ein humanes miRNA Cluster bestehend aus zwei miRNAs, welches auf Chromosom 13 (13q14) lokalisiert ist (Calin et al. 2002), eine Region, die für ihre häufige Deletion in chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) bekannt ist (Nicoloso et al. 2007). Beide miRNAs sind stark in CD5<sup>+</sup> B-Lymphozyten exprimiert, zeigen allerdings eine deutlich verringerte Expression in 68% aller CLL-Proben. Des Weiteren geht die verminderte

miR-15a und miR-16-1 Expression in CLL-Zellen mit einem Verlust des Alleles an der Stelle 13q14 einher, was darauf hindeutet, dass das besagte miRNA Cluster als Tumorsuppressor fungiert und dessen Herunterregulation zur Pathogenese von CLL beiträgt (Calin et al. 2002). Eine Erklärung für diese tumorsupprimierende Funktion von miR-15a und miR-16-1 fanden Cimmino *et al* (2005), die zeigen konnten, dass das Vorkommen der beiden miRNAs unabhängig voneinander umgekehrt proportional mit der Expression von *B-cell lymphoma 2* (BCL-2) korreliert, ein Protein, das von den meisten B-CLL-Zellen überexprimiert wird (Cimmino et al. 2005).

Viele Leukämien werden durch chromosomale Translokationen hervorgerufen. Auch miRNA Gene können dabei involviert sein, wie Gauwerky *et al* (1989) in ihrer Arbeit demonstrieren konnten. Sie identifizierten die t(8;17) Translokation, bei der der Promotor und der 5'-Bereich des miR-142-Vorläufers mit dem trunkierten *c-MYC*-Gen fusioniert und dadurch zu aggressiver B-Zell Leukämie führt (Gauwerky CE, Huebner K, Isobe M, Nowell PC 1989).

Viele miRNAs, die bereits im Zusammenhang mit der hämatopoetischen Differenzierung erwähnt wurden, haben natürlich auch ein hohes Potential durch aberrante Expression von ihrer physiologischen Funktion abzuweichen und in eine pathologische Rolle überzugehen. So ist beispielsweise miR-155 nicht nur ein Regulator von myeloider und erythroider Differenzierung. Ihre unkontrollierte Expression kann ebenso zu malignen Veränderungen in der myeloiden und erythroiden Linie führen (O'Connell et al. 2008). Darüber hinaus konnte diese miRNA in verschiedensten B-Zell Pathologien und Hodgkin-Lymphomen überexprimiert vorgefunden werden (Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N 2006; Kluiver et al. 2005). Auch miR-181a, die, wie bereits in Kapitel 1.4.2 beschrieben, eine wichtige regulatorische Funktion in murinen B-Lymphozyten einnimmt, konnte mit akuter myeloischer Leukämie (AML) der Subtypen M1 und M2 in Zusammenhang gebracht werden (Debernardi et al. 2007). MiR-223 ist in myeloide Differenzierung involviert, kann aber auch in adulter T-Zell Leukämie nachgewiesen werden (Bellon et al. 2009). Interessanterweise ist miR-223 darüber hinaus ein Zielgen des AML1/ETO Fusionsprotein, das in AML Blasten mit der t(8;21) Translokation entsteht (Fazi et al. 2007).

#### **1.4.4 MiRNAs in der klinischen Anwendung und der Krebstherapie**

Wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben ist, wird die Expression von vielen miRNAs mittlerweile mit diversen Pathologien in Zusammenhang gebracht, wobei sie sowohl als Tumorsuppressoren, als auch als Onkogene fungieren können. Folglich wächst auch das Interesse an miRNAs als Biomarker insbesondere in der Diagnose, Behandlung und Prognose von Tumoren (Lu et al. 2005), nicht zuletzt auch, da miRNAs mit unkomplizierten Methoden in Körperflüssigkeiten wie Plasma und Serum

nachgewiesen werden können, was darüber hinaus auch eine schonende, nicht invasive Methode darstellt, und daher Anwendung in der Klinik und Therapie findet. Es gibt mittlerweile verschiedenste Ansätze, um miRNAs in der Therapie zu nutzen. Dabei kann man zwischen zwei grundsätzlichen Vorgehensweisen unterscheiden. Man kann entweder bestimmte miRNAs inhibieren, wie beispielsweise tumorwachstumsfördernde miRNAs, oder man kann die Expression bestimmter miRNAs fördern oder wieder aktivieren, was im Falle von tumorsupprimierenden miRNAs sinnvoll ist.

Eine Möglichkeit, miRNAs therapeutisch zu inhibieren, stellen anti-miRNA Oligonukleotide (AMOs) dar. Diese AMOs sind chemisch modifizierte, einzelsträngige 17 bis 22 Nukleotid-lange anti-sense Oligonukleotide, die komplementär zu einer bestimmten reifen miRNA sind und diese binden, damit die miRNA nicht mehr an ihre eigentliche Ziel-mRNA binden kann (Garzon, Marcucci, and Croce 2010). Entsprechend kann das Gen, dessen mRNA nicht mehr degradiert oder inhibiert wird, transkribiert werden und seiner Funktion nachgehen.

Antagomire sind 23 Nukleotid-lange, einzelsträngige RNA Moleküle, die ebenfalls komplementär an eine bestimmte miRNA binden. Zusätzlich sind sie durch ein Phosphorothioat-Rückrat und einen 2'-O-methoxyethyl Zusatz chemisch modifiziert, um eine höhere Stabilität zu erzielen und sie vor enzymatischem Abbau zu schützen. Bereits 2005 konnten Krützfeldt und Kollegen (2005) erste Erfolge durch die intravenöse Gabe von Antagomir-122 und Antagomir-16 in Mäusen dokumentieren. Die Behandlung mit den Antagomiren führte zu einer spezifischen und anhaltenden Reduktion der endogenen miR-122 beziehungsweise miR-16 Expression in verschiedensten Organen der Mäuse (Krützfeldt et al. 2005).

Ganz ähnlich ist die Funktion von *Locked Nucleic Acid* (LNA) anti-miRs, die durch eine zusätzliche Methylenbrücke, die das 2'-Sauerstoffatom mit dem 4'-Sauerstoffatom verbindet, eine bicyclische Verbindung eingeht. Dadurch ist die Ribose in einer C3'-endo-Konformation fixiert, was den LNA anti-miRs eine hohe thermische Stabilität, hohe Wasserlöslichkeit, sowie eine hohe Hybridisierungsaffinität für ihre Ziel-mRNA verleiht. Darüber hinaus weisen sie eine verbesserte metabolische Stabilität auf, was die *in vivo* Gabe der LNA anti-miRs vereinfacht (Elmén et al. 2008; Vester and Wengel 2004). Miravirsen, ein LNA gegen miR-122, wurde von der Firma Santaris Pharma A/S entwickelt und für die Behandlung von Hepatitis C in einer klinischen Phase I und II Studie getestet (H. L. A. Janssen et al. 2013). Es konnte eine deutliche Reduktion der Virusreplikation erzielt werden, allerdings stieg die Viruslast nach Beendigung der Therapie wieder, was bedeutet, dass eine Heilung von Hepatitis C durch Miravirsen allein nicht erreicht werden kann, es aber durchaus eine wertvolle Komponente in der Therapie gegen Hepatitis C sein könnte (H. L. A. Janssen et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit der miRNA Inhibition stellt die Verwendung von miRNA *Sponges* (Schwämme) dar. Diese RNAs werden von Expressionsvektoren transkribiert und haben mehrere hintereinander angeordnete artifizielle Bindestellen

einer bestimmten miRNA, mit denen sie, wie der Name schon sagt, ähnlich wie ein Schwamm, die miRNAs auffangen und binden können. Dabei konkurrieren sie mit den endogenen Ziel-mRNAs (Ebert, Neilson, and Sharp 2007). Ma *et al* (2010) konnten durch die Anwendung von miRNA *sponges* miR-9 inhibieren, die in Brustkrebszellen hochreguliert ist, und somit die Bildung von Metastasen reduzieren (Ma et al. 2010). Eine weitere interessante Herangehensweise ist die Verwendung von kleinen Molekülen, sogenannte *small molecule inhibitors of miRNAs* (SMIRs). Diese fungieren, indem sie die Biogenese der miRNAs entweder verhindern oder aktiv unterstützen um die Expression fehlregulierter miRNAs wiederherzustellen (Monroig et al. 2015). Im Gegensatz zu den anderen bereits beschriebenen Methoden ist dies eine schnelle und dadurch auch kostengünstigere Möglichkeit der miRNA-Therapie. Das synthetische Antibiotikum Enoxacin hat die Fähigkeit, das miRNA Biosynthese Protein TRBP zu binden und somit die Produktion tumorsupprimierender miRNAs zu fördern (Melo et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnten Watashi *et al* zeigen, dass Polylysin und Trypaflavin eine Anti-Tumoraktivität aufweisen durch Inhibition der RISC-Aktivität (Watashi et al. 2010).

Eine andere Möglichkeit, das Level einer fehlregulierten tumorsupprimierenden miRNA zu erhöhen, ist die Verwendung von miRNA *mimics* (Nachahmern). Das sind miRNA-ähnliche, chemisch modifizierte, doppelsträngige RNA-Moleküle, die in den RISC aufgenommen werden und an die Ziel-mRNA der endogenen miRNA binden können. Diese Nachahmer-miRNA übernimmt die Rolle der fehlregulierten miRNA und stellt deren Funktion wieder her. Es konnten bereits vielversprechende Ergebnisse in klinischen Phase I Studien mit miRNA *mimics* erzielt werden. MRX34 beispielsweise ist ein Nachahmer der tumorsupprimierenden miR-34 und wurde von Mirna Therapeutics entwickelt. In einem orthotopen Leberkrebs-Mausmodell ließ sich eine komplette Tumorregression verzeichnen. Das Therapeutikum wurde anschließend zur Behandlung von Leberkarzinomen, Nierenkarzinomen und Melanomen in einer klinischen Phase I Studie an Patienten mit kontrollierbaren, moderaten Nebenwirkungen getestet (Beg et al. 2017).

Abgesehen von der Rolle, die miRNAs in der Therapie von soliden Tumoren und hämatopoetischen Pathologien einnimmt, finden sie auch noch in einem ganz anderen klinischen Bereich Anwendung. Einige miRNAs können für die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen verwendet werden. Die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 sind bekanntermaßen fähig, somatische Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen zu reprogrammieren (Takahashi et al. 2007). Diese Faktoren binden an eine konservierte Promotorregion des miR-302/367 Clusters und sind für die transkriptionelle Regulation von miR-302a notwendig (Greer Card et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass miR-302 und miR-372 den Übergang von der mesenchymalen zur epithelialen Morphologie (*mesenchymale-epithelial Transition* (MET)) beschleunigen können und somit eine Reprogrammierung humaner Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen begünstigen (Liao et al. 2011;

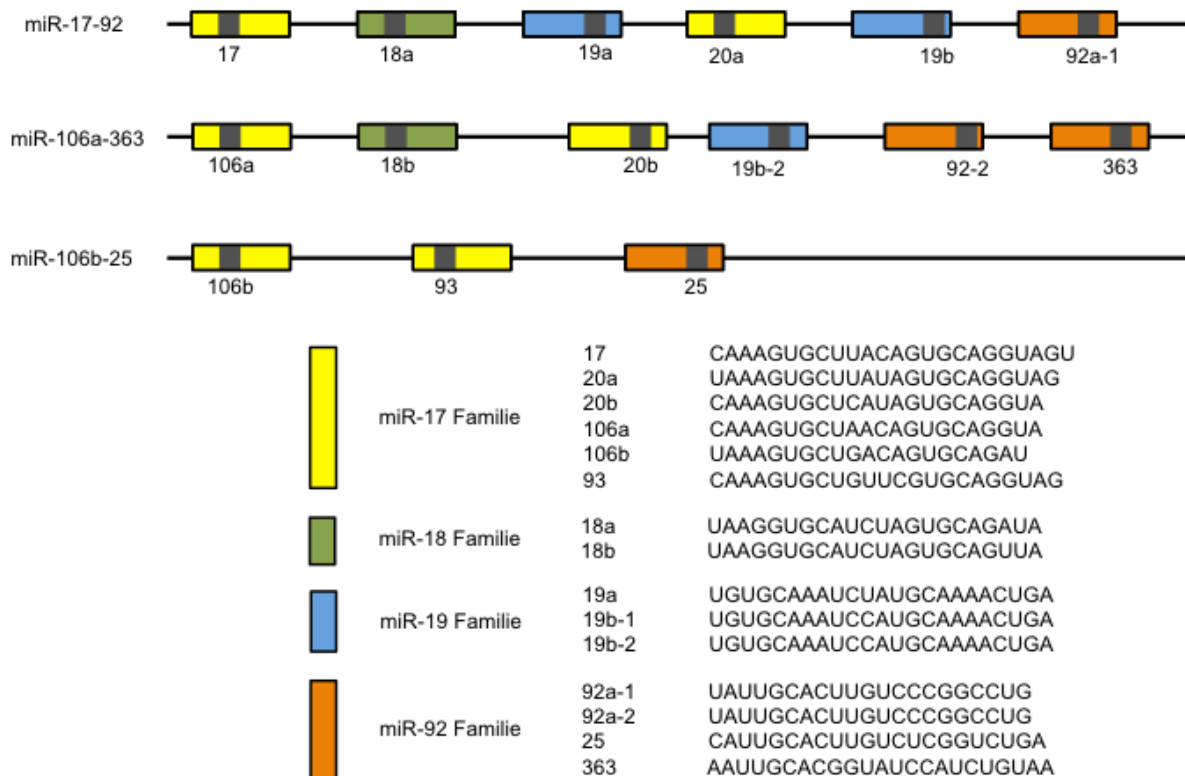
Subramanyam et al. 2011). Anokye-Danso *et al* konnten sogar 2011 beweisen, dass die Expression des miR-302/367 Clusters sowohl Maus, als auch humane somatische Zellen in pluripotente Stammzellen zurückprogrammiert, ohne die Zugabe der üblichen Transkriptionsfaktoren (Anokye-Danso et al. 2011). Diese Erkenntnisse rücken miRNAs im Hinblick auf ihre Verwendung als therapeutisches Mittel, Zielgen oder diagnostische Marker in der Krebstherapie und anderen Pathologien in den Vordergrund. Darüber hinaus nehmen sie im Rahmen der Stammzellforschung für die Expansion von HSCs und Reprogrammierung induzierter pluripotenter Stammzellen eine fundamentale Rolle in der aktuellen klinischen Forschung ein.

## 1.5 Das miR-17-92 Cluster

Das miR-17-92 Cluster ist eines der meist erforschten miRNA Cluster und wurde erstmals 2005 von He *et al* in humanen B-Zell-Lymphomen als Onkogen beschrieben (He et al. 2005). MiR-17-92 ist ein hoch konserviertes, polycistronisches miRNA Cluster, das auf Chromosom 13q31 lokalisiert ist (C13orf25) (Ota et al. 2004). Es kodiert für insgesamt sechs reife miRNAs: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a und miR-92a. Das Cluster hat zusätzlich zwei Paraloge, zum einen miR-106a-363, welches auf Chromosom X liegt und für miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92a-2 und miR-363 kodiert, zum anderen miR-106b-25, das sich auf Chromosom 7 befindet und für miR-106b, miR-93 und miR-25 kodiert. All diese miRNAs wurden entsprechend ihrer *Seed*-Sequenz in vier Familien eingeteilt, die miR-17, miR-18, miR-19 und miR-92 Familie. In Abbildung 1.6 ist die Struktur von miR-17-92, miR-106a-363 und miR-106b-25, sowie eine Aufstellung der vier miRNA-Familien mit den dazugehörigen reifen miRNA-Sequenzen dargestellt.

MiR-17-92 und seine beiden Paraloge ähneln sich nicht nur strukturell, sondern weisen auch überlappende Funktionen auf (Benjamin P. Lewis, Burge, and Bartel 2005). In einem *Knockout*-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen miR-17-92 auf beiden Allelen fehlt, nicht lebensfähig sind. Sie sterben kurz nach der Geburt aufgrund großer Entwicklungsdefekte in der Lunge und im Herz. Darüber hinaus ist die B-Zellentwicklung am Übergang vom pro-B zum pre-B Stadium blockiert. Ein *Knockout* von miR-106a-363 oder miR-106b-25 zeigte hingegen keinen Effekt auf die Entwicklung der Mäuse. Ein doppelter *Knockout* beider Paraloge blieb ebenfalls ohne Konsequenzen für die Mausentwicklung. Ein doppelter *Knockout* von miR-17-92 und miR-106b-25 sowie ein gleichzeitiger *Knockout* von allen drei Kandidaten führte zur Letalität am Tag 15 der Embryonalentwicklung (Ventura et al. 2008). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass für eine gesunde, embryonale Entwicklung lediglich miR-17-92 unverzichtbar ist. Interessanterweise wurde kürzlich beschrieben, dass miR-17-92 zudem eine wichtige Rolle während der Kardiomyozyten-Proliferation spielt. Eine spezifische Überexpression des miRNA Clusters in den Kardiomyozyten

fürte zu einer verstärkten Zellproliferation der Herzmuskelzellen in transgenen Mäusen und schützte das Herz zusätzlich vor Myokardinfarkten (J. Chen et al. 2013).



**Abbildung 1.6. Struktur des miR-17-92 Cluster und seiner Paraloge.**

Schematische Darstellung der Struktur des miR-17-92 Cluster mit seinen sechs miRNAs sowie seinen zwei Paralogen miR-106a-363 und miR-106b-25. Die zusammengehörigen miRNA Familien sind farblich gleich dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind die Sequenzen der jeweiligen miRNAs, sortiert nach ihren Familien, gezeigt. Modifiziert nach (Ventura et al. 2008).

### 1.5.1 MiR-17-92 als Onkogen

MiR-17-92 wird in vielen Tumorzellen hoch exprimiert, wie beispielsweise Lunge, Brust, Pankreas, Prostata, Schilddrüse und, wie bereits erwähnt, Lymphomen (He et al. 2005; Mogilyansky and Rigoutsos 2013). Daher trägt das Cluster auch den Namen OncomiR1. Interessanterweise haben die einzelnen reifen miRNAs des miR-17-92 Clusters unterschiedlichste Funktionen hinsichtlich ihrer Aktivität auf Tumorwachstum und Progression. Eine miR-92a Überexpression induziert Erythroleukämie im Mausmodell unter anderem durch Aktivierung der Onkogene c-Myc, Stat-5, Jak2 und Bcl-2. Diese tumorigene Wirkung wird von miR-17 supprimiert. Eine Koexpression von miR-92a und miR-17 im Mausmodell führte zu einer deutlich mildereren Form der Erythroleukämie mit verbesserter Überlebenszeit, was zumindest teilweise durch Aktivierung des Tumorsuppressors p53, sowie Inhibition von Stat-5, Bcl-2 und Jak2

nach miR-17 Überexpression zu erklären ist (Yanmei Li et al. 2012). MiR-20a hingegen konnte eine onkogene Rolle in Osteosarkomen zugewiesen werden, wo sie durch Inhibition des *early growth response 2* (EGR2) Zellproliferation und Zellzyklusprogression induziert (Zhuo et al. 2015). Der miR-18a konnten auch bereits tumoraktivierende Funktionen nachgewiesen werden. Diese miRNA wurde in Brust-, Prostata-, Darm- und Nasopharynxkarzinomen hoch exprimiert detektiert (T. I. Hsu et al. 2014). MiR-19a und miR-19b unterscheiden sich lediglich in einem Nukleotid außerhalb der *Seed*-Sequenz (Abbildung 1.6). Daher wird davon ausgegangen, dass diese beiden miRNAs ähnliche und überlappende Zielgene haben. Olive und Kollegen (2009) konnten zeigen, dass miR-19 ausschlaggebend für die Onkogenität des miR-17-92 Clusters zu sein scheint. MiR-19 fördert die c-MYC-induzierte Entwicklung von Lymphomen durch Suppression der Apoptose. Dies wird zumindest teilweise durch Aktivierung des Akt-mTor Signalweges, der wiederum den Tumorsuppressor Pten inhibiert, bedingt (Olive et al. 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass miR-19a und miR-19b die Expression von *SOCS1* herunterregulieren. Dieses Gen ist häufig im Multiplem Myelom stillgelegt und hat eine wichtige Funktion als Inhibitor von IL-6-vermitteltem Wachstum (Pichiorri et al. 2008).

Dass das Onkogen c-MYC und miR-17-92 in Zusammenhang miteinander stehen und dabei eine tumorfördernde Wirkung ausüben, konnte in vielerlei Hinsicht gezeigt werden. In einem B-Zell-Lymphom Model wurden Mäuse entweder mit c-MYC oder mit c-MYC und einer verkürzten Version von miR-17-92 (miR-17-19b) überexprimiert. Die Tiere, die c-MYC und miR-17-19b exprimierten, entwickelten im Vergleich zu den c-MYC Mäusen ein beschleunigtes Tumorwachstum mit ausgeprägter Malignität, Infiltration des Thymus, der Lunge und der Leber sowie eine erhöhte Fähigkeit Apoptose zu umgehen (He et al. 2005). O'Donnell *et al* (2005) konnten mithilfe von Chromatin-Immunoprecipitation zeigen, dass c-MYC auf dem Lokus des *MIR17HG*-Gens kurz von dem Exon, das miR-17-92 kodiert, bindet und dessen Expression begünstigt. Diese Gruppe konnte darüber hinaus bestätigen, dass der Transkriptionsfaktor E2F1, ein weiteres Zielgen von c-MYC, durch miR-17 und miR-20a negativ reguliert wird (O'Donnell et al. 2005).

In einer weiteren Studie konnte belegt werden, dass das Fusionsprotein BCR-ABL, welches häufig in chronischer myeloischer Leukämie (CML) aktiviert wird, zusammen mit c-MYC Einfluss auf die miR-17-92 Expression nimmt. Wenn BCR-ABL durch Behandlung mit Imatinib oder RNA-Interferenz inhibiert wird, oder c-MYC durch spezifische anti-c-MYC RNA-Interferenz herunterreguliert wird, kann eine Reduktion von miR-17-92 nachgewiesen werden. Außerdem ließ sich eine Überexpression von miR-17-92 in primären CML-Zellen in chronischer Phase aber nicht während der Blastenkrise verzeichnen (Venturini et al. 2007). Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Expression von miR-17-92 in der chronischen Phase von CML vom BCR-ABL-c-MYC Signalweg abhängt.

Ventura *et al* (2008) demonstrierten, dass das pro-apoptotische Protein BIM ein weiteres Zielgen von miR-17-92 ist. Eine Überexpression von miR-17-92 in akuter lymphatischer Leukämie (ALL) resultierte in Reduktion der BIM Expression und induzierte ein verstärktes Überleben von B-Zell-Vorläufern (Ventura et al. 2008).

All diese Erkenntnisse zeigen deutlich, dass eine aberrante Expression von miR-17-92 mit vielen verschiedenen hämatopoetischen Pathologien einhergehen. Durch diese Eigenschaft wird das miR-17-92 Cluster vermehrt in den Fokus der Wissenschaft und insbesondere der klinischen Forschung gerückt, da es sowohl als diagnostischer Marker als auch als interessantes therapeutisches Ziel in der Krebstherapie fungieren könnte.

## 1.6 TAL1 – *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*

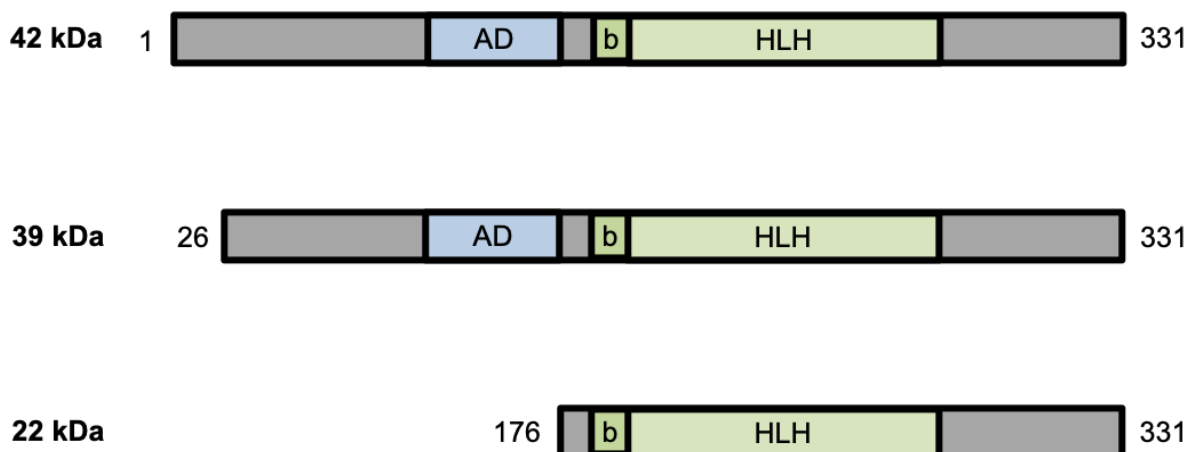
TAL1 ist ein hämatopoetischer Transkriptionsfaktor, der für die Regulation der primitiven und definitiven Hämatopoese von großer Bedeutung ist. Ein *Knockout* von TAL1 in der Maus führt zur embryonalen Letalität zwischen Tag 8,5 und 10,5. Die Mausembryonen sterben aufgrund von starken hämatopoetischen Defekten, was durch einen kompletten Verlust der Erythropoese im Dottersack verdeutlicht wurde. TAL1 ist folglich für die erythroide Entwicklung unverzichtbar (Shivdasani, Mayer, and Orkin 1995). Aufgrund seiner Struktur gehört er zur Gruppe der Klasse II *basic-Helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren und bildet Heterodimere mit Klasse I bHLH Proteinen (Murre et al. 1989). Das TAL1-Gen liegt auf Chromosom 1, hat eine Länge von 16 kb und besteht aus acht Exons, von denen drei kodierend sind (Aplan et al. 1990; Begley et al. 1991). Erstmals beschrieben wurde es im Zusammenhang mit der chromosomalen Translokation t(1;14) in einer akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie (T-ALL), bei der TAL1 mit dem T-Zell Rezeptor auf Chromosom 14 transloziert wird (Finger et al. 1989). Tatsächlich kann TAL1 in 60% aller T-ALL Fälle hoch exprimiert nachgewiesen werden (Look 1997; Ferrando et al. 2004; Bash et al. 1995) und ist daher auch als Onkogen bekannt.

### 1.6.1 Struktur und Isoformen von TAL1

*Helix-loop-helix*-Proteine bestehen aus zwei alpha-Helices, die eine Schleife bilden (*Loop*) und eine *Basic*-Region aufweisen, die positiv geladen und für die DNA-Bindung verantwortlich ist. TAL1 bindet als Heterodimer an die Erkennungssequenz CANNTG, eine sogenannte E-Box, an die DNA (H. L. Hsu et al. 1991). Die Aktivierung von TAL1 erfolgt über die Aktivierungsdomäne, die im N-Terminus gelegen ist, und wird durch die Phosphorylierung von Serin 122 initiiert (Wadman et al. 1994).



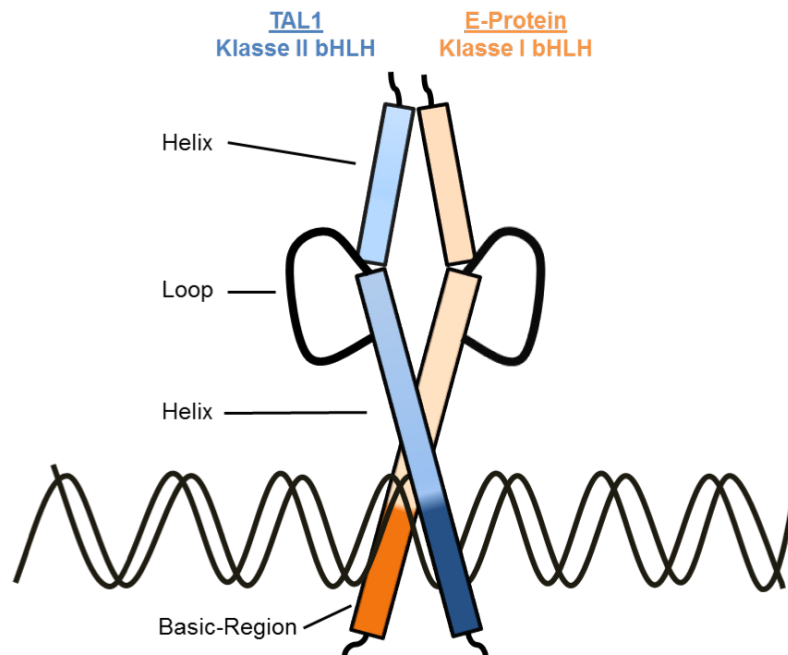
Es wurden drei Isoformen des TAL1-Proteins in Säugerzellen detektiert, das Volllänge-Protein mit einem molekularen Gewicht von 42 kDa, sowie zwei N-Terminal verkürzte Isoformen mit einem Gewicht von 39 und 22 kDa (Abbildung 1.7) (Pulford et al. 1995; Cheng et al. 1993). Die trunkierten Isoformen werden durch Translation von alternativen Translationsinitiationspunkten, die innerhalb der Sequenz von TAL1 liegen, gebildet. Alle drei Isoformen besitzen die bHLH-Region, die die Bindung an die DNA sowie die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht. Die Aktivierungsdomäne im N-Terminus ist allerdings nur in der Volllänge und der 39 kDa Isoform vorhanden (Bernard et al. 1991; Cheng et al. 1993). Das Volllänge-Protein besteht aus 331 Aminosäuren. Im dritten Exon liegt ein hoch konserviertes offenes Leseraster (*upstream open reading frame* (uORF)) vor, das als cis-Element während der Translation in die verschiedenen Isoformen fungiert (Calkhoven et al. 2003). Die kurze Isoform besteht aus 156 Aminosäuren (Vagapova et al. 2018). Interessanterweise ist diese kürzere Isoform für die Entwicklung erythroider Vorläuferzellen notwendig, während die Volllänge-Isoform für megakaryozytäre Vorläuferzellen von Bedeutung ist. Die 22 kDa Isoform enthält die *Helix-loop-helix*-Bindedomäne, aber nicht die N-terminale Region *upstream* der DNA-Bindedomäne, wodurch die Interaktion mit ETO2 verloren geht. Diese Interaktion unterdrückt die frühe erythroide Differenzierung, was die unterschiedliche Expression der Isoformen in erythroiden und megakaryozytären Vorläuferzellen erklärt (Jin et al. 2017). So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von der 22 kDa Isoform in murinen Knochenmarkzellen die erythroide Differenzierung stimuliert (Calkhoven et al. 2003).



**Abbildung 1.7. Schematische Darstellung der TAL1 Struktur und der verschiedenen Isoformen.** Von TAL1 sind drei verschiedene Isoformen bekannt, das Volllänge-Protein mit 42 kDa und 331 Aminosäuren sowie zwei trunkierte Varianten mit 39 kDa und 22 kDa. Die 42 kDa und die 39 kDa Isoformen besitzen neben der *Basic*-Region (b) und der *Helix-loop-helix* (HLH)-Region noch eine Aktivierungsdomäne (AD). Die kürzeste Isoform besitzt nur noch die *basic-Helix-loop-Helix* (bHLH)-Region für die DNA-Bindung und die Proteininteraktion, während der N-Terminale Bereich mit der Aktivierungsdomäne (AD) fehlt. Modifiziert nach (Vagapova et al. 2018; Calkhoven et al. 2003).

### 1.6.2 Heterodimerisierung von TAL1 mit E-Proteinen

TAL1 gehört zu der Gruppe der bHLH-Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine haben die Eigenschaft, Dimere mit anderen bHLH-Proteinen zu bilden, um effizient an die DNA binden zu können (Murre, McCaw, and Baltimore 1989; Murre et al. 1989). Die bHLH-Proteine besitzen eine extrem konservierte Region, wodurch die hohe Bindeaffinität zur DNA und die Interaktion der beiden Monomere miteinander gewährleistet ist. Durch die positiv geladene *Basic*-Region erfolgt die Bindung an die negativ geladene DNA, während die *Helix-loop-helix*-Domäne durch überwiegend hydrophobe Reste die Proteininteraktion und somit die Dimerisierung der bHLH-Proteine ermöglicht (Abbildung 1.8) (Murre et al. 1994). Die bHLH-Proteine lassen sich in verschiedene Klassen kategorisieren. Zur Klasse I gehören E47, E12, E2-2, HEB und Daughterless, auch E-Proteine genannt. Dabei sind E47 und E12 unterschiedliche *Splice*-Varianten, die aus dem *E2A*-Gen hervorgehen (Kee 2009). E-Proteine können sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden und werden ubiquitär in vielen Geweben exprimiert (Murre et al. 1989). Sie binden spezifisch an spezielle DNA-Bereiche, sogenannte E-Box-Motive, mit der Sequenz CANNTG, die ursprünglich in der schweren Kette des *Enhancers* im Immunoglobulin-Gen entdeckt wurden (Church et al. 1985; Ephrussi et al. 1985). Klasse II bHLH-Proteine, zu denen auch TAL1 zählt, sind, bis auf wenige Ausnahmen, nicht in der Lage, Homodimere zu bilden. Sie formen Heterodimere, bevorzugt mit E-Proteinen der Klasse I und werden gewebespezifisch exprimiert (Murre et al. 1989). Obwohl E-Proteine (E12, E47, E-2-2, HEB) Homodimere mit sich selbst ausbilden können, bevorzugen sie interessanterweise in Anwesenheit von TAL1 die Bildung eines E-Protein/TAL1 Heterodimers (H. L. Hsu et al. 1994). Die Bindung eines E-Protein/TAL1 Heterodimers erfolgt halbseitig. Das bedeutet, das Klasse I bHLH-Protein erkennt die erste Hälfte der E-Box-Sequenz (CAN) während das Klasse II bHLH-Protein an die zweite Hälfte der E-Box bindet (NTG) (Massari and Murre 2000). Hierbei können weitere bevorzugte Erkennungssequenzen für die bestimmten Monomere unterschieden werden. Die Bindung der bHLH-Proteine an die E-Box Motive ist zwar im flankierenden Bereich vorne und hinten (CANNTG) jeweils identisch für die Klasse I, beziehungsweise Klasse II bHLH-Proteine, allerdings können die beiden Basen in der Mitte der E-Box (CANNTG) variieren und weisen je nach Sequenz unterschiedlich präferierte Bindungsproteine auf. E47 beispielsweise bindet präferierend an den Sequenzen CAG oder CAC, während TAL1 an die zweite Hälfte der E-Box mit der Sequenz ATG bindet. Ein anderes Klasse II bHLH-Protein, MyoD, bindet vorwiegend an der Sequenz CTG (H. L. Hsu et al. 1994; Blackwell and Weintraub 1990; Wright, Binder, and Funk 1991). Dadurch ergibt sich, dass die Eigenschaften der DNA-Erkennung eines E2A Polypeptids sehr stark vom Dimerisierungspartner beeinflusst werden.



**Abbildung 1.8. Schematische Darstellung der Bindung von TAL1 zusammen mit seinem Dimerisierungspartner als Heterodimer an die DNA.**

TAL1 benötigt als bHLH-Protein der Klasse II einen Dimerisierungspartner aus der Klasse I der bHLH-E-Proteine (E47, E12, E2-2, HEB) um an eine E-Box mit der Sequenz CANNTG an die DNA zu binden. Die *Helix-loop-helix*-Domäne ermöglicht dabei die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren. Die *Basic-Region* bindet durch ihre positive Ladung an die negativ geladene DNA. TAL1: *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*; bHLH: *basic-Helix-loop-helix*; Modifiziert nach (N. C. Correia et al. 2016).

### 1.6.3 TAL1 bildet einen Multiproteinkomplex in der Hämatopoese

Transkriptionsfaktoren wirken in der Regel nicht allein auf die Expression ihrer Zielgene, sie bilden Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren, und die Zusammensetzung der verschiedenen Faktoren bestimmt die Wirkung des Komplexes auf die Genexpression. Auch TAL1 ist Teil eines Multiproteinkomplexes. Die Kofaktoren, die TAL1 rekrutiert, bestimmen, ob TAL1 als Aktivator oder als Repressor der Transkription fungiert.

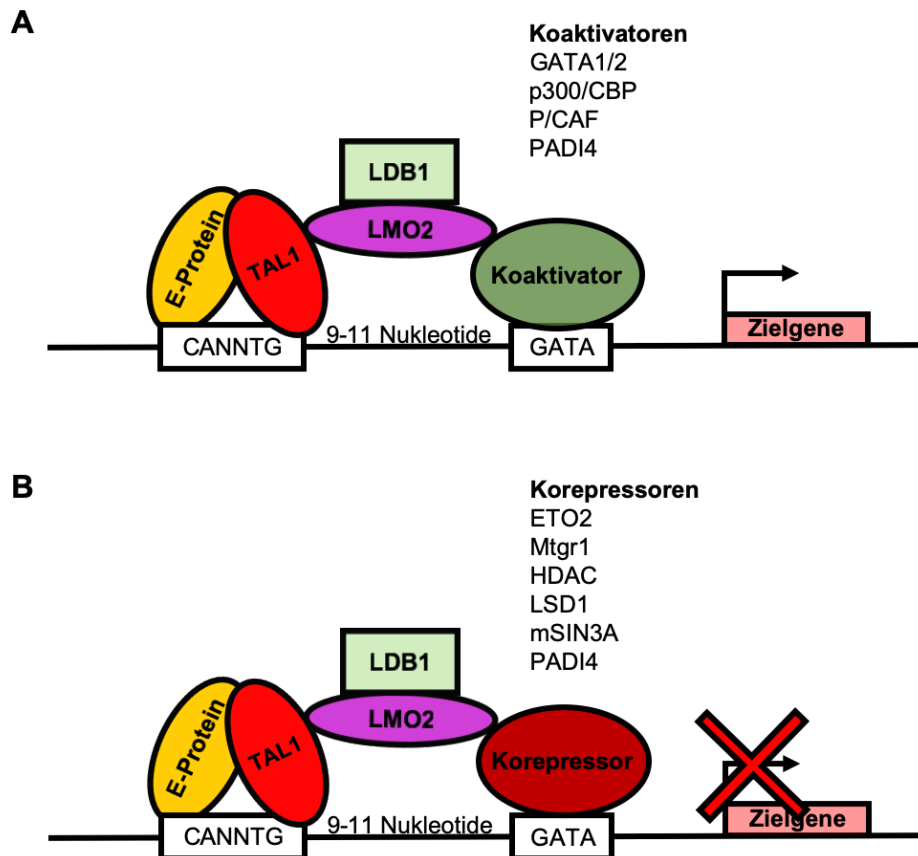
Wie in Kapitel 1.6.2 bereits beschrieben, bindet TAL1 als Heterodimer zusammen mit einem E-Protein an seine Erkennungssequenz (E-Box) an die DNA. Ebenfalls Teil des TAL1-Proteinkomplexes ist LMO2, ein Protein, das eine essentielle Rolle während der Erythropoese des Dottersacks spielt (Warren et al. 1994) und dessen Beteiligung am TAL1-Komplex nicht nur in der physiologischen Entwicklung notwendig ist, sondern auch für die Induktion von Leukämien in transgenen Mäusen vorhanden sein muss (Peter D. Aplan et al. 1997). Interessanterweise zeigen LMO2 *Knockout*-Mäuse den gleichen Phänotyp wie TAL1 *Knockout*-Mäuse mit fehlender Erythropoese im Dottersack und einer embryonalen Letalität am Tag 10,5 (Warren et al. 1994). Strukturanalysen haben ergeben, dass die Bindung von LMO2 an TAL1 neue

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem E-Protein/TAL1 Dimer induziert, wodurch die Formation des Heterodimers gestärkt wird (ElOmari et al. 2013). Da LMO2 nicht direkt an die DNA binden kann, fungiert es zusammen mit seinem Interaktionspartner *LIM domain-binding protein 1* (LDB1) als Brücke zwischen dem E-Protein/TAL1 Dimer und einem weiteren Transkriptionsfaktor wie beispielsweise GATA1 oder GATA2 während der erythroiden Differenzierung (Wadman et al. 1997). Diese Proteine bilden einen sogenannten pentametrischen Komplex (Abbildung 1.9). GATA1/2, ebenfalls ein Transkriptionsfaktor der erythroiden Differenzierung, bindet an ein GATA-Motiv auf der DNA 9-11 Nukleotide von der E-Box entfernt, wo das E-Protein/TAL1 Dimer bindet (Wadman et al. 1997). Dieser pentametrische Komplex bildet sich vorwiegend im *Enhancer*-Bereich erythroider Gene und aktiviert die Genexpression (Kerenyi and Orkin 2010). Der TAL1-Komplex, der sowohl aus spezifischen hämatopoetischen sowie ubiquitär vorkommenden Faktoren besteht, kann mithilfe des Transkriptionsfaktors *Specificity protein 1* (SP1) an den Promotor von *c-kit*, ein bekanntes Zielgen von TAL1, durch direkte Interaktionen zwischen dem TAL1-Komplex und dem SP1 Zinkfinger Protein gebunden werden (Lécuyer et al. 2002).

Eine Repression durch TAL1 wird zum Beispiel durch Rekrutierung der Korepressoren ETO2 und Mtgr1 vermittelt (Soler et al. 2010). Weitere bekannte Korepressoren, die mit dem TAL1-Komplex wirken können, sind mSIN3A, HDAC (S. Huang and Brandt 2000) und *lysine specific demethylase 1* (LSD1) (Y. Li et al. 2012).

Abgesehen von GATA1/2 wurde darüber hinaus *EP300/CREB-binding protein* (p300/CBP) als Koaktivator von TAL1 beschrieben (Suming Huang et al. 1999), sowie der chromatinmodulierende p300/CBP-assoziierte Kofaktor (P/CAF), der eine Acetylierung der Chromatinstruktur bewirkt (Suming Huang et al. 2000).

Peptidylarginin Deiminase IV (PADI4) ist ein interessanter Kofaktor von TAL1, der ebenfalls durch Modifikation der Chromatinstruktur Einfluss auf die Aktivität von TAL1 nimmt. Er kann, abhängig von dem Gen, an dessen Promotor er rekrutiert wird, sowohl aktivierende als auch reprimierende Histonmodifikationen herbeiführen (Kolodziej et al. 2014).



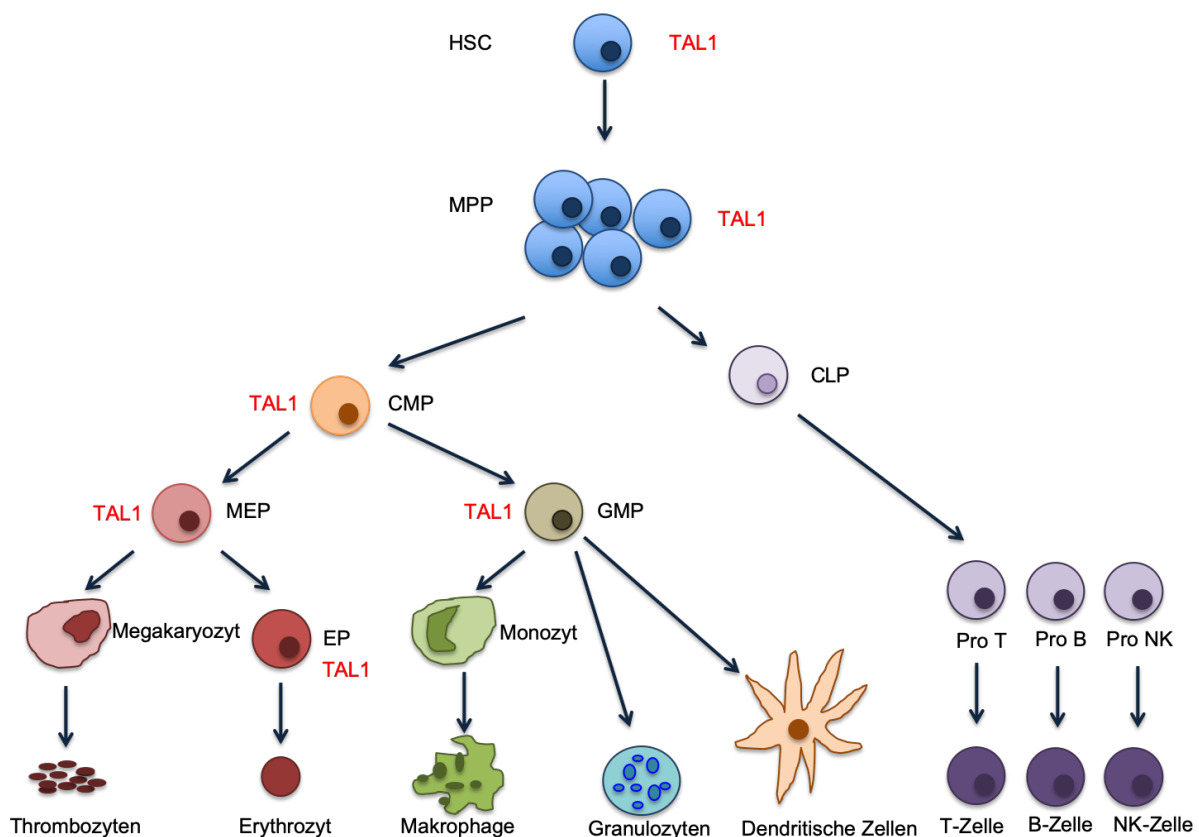
**Abbildung 1.9. TAL1 bildet einen multifaktoriellen Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren und kann sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren.**

(A) TAL1 bindet ein E-Protein, einen bHLH-Transkriptionsfaktor der Klasse I, der die Bindung an die DNA und die Aktivität des Proteins ermöglicht. Darüber hinaus bindet LMO2 an das E-Protein/TAL1 Dimer sowie dessen Interaktionspartner LDB1. Wenn TAL1 einen Koaktivator wie GATA1 oder GATA2, p300/CBP, P/CAF oder PADI4 rekrutiert, wirkt der Multiproteinkomplex als Aktivator der Genexpression. (B) Werden Korepressoren wie ETO2, Mtgr1, HDAC, LSC1, mSIN3A oder PADI4 von TAL1 rekrutiert, wird die Genexpression inhibiert. TAL1: *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*; LDB1: *LIM domain-binding protein 1*; LMO2: *LIM-only protein 2*; GATA: *GATA binding protein 1*; p300/CBP: *EP300/CREB-binding protein*; PADI4: *Peptidylarginin Deiminase IV*; HDAC: *Histoneacetylase*; LSD1: *lysine specific demethylase 1*; Modifiziert nach (Cantor and Orkin 2002).

TAL1 ist ein Masterregulator der Hämatopoese und unverzichtbar für die embryonale Entwicklung, wie es anhand von TAL1 *Knockout*-Modellen in Mäusen demonstriert werden konnte (Shivdasani, Mayer, and Orkin 1995; Robb et al. 1995). Betrachtet man die hierarchische Anordnung der Hämatopoese, so kann TAL1 in HSCs, MPPs und erythroiden und megakaryozytären Linien gemessen werden. In der lymphoiden Linie hingegen lässt sich keine TAL1 Expression finden, ebenso wenig wie in allen reifen Zellen der nicht-erythroiden Linien (Abbildung 1.10) (Mouthon et al. 1993; Herblot et al. 2000; Y. Zhang et al. 2005). Studien mit konditionellem TAL1 *Knockout* haben gezeigt, dass TAL1 für das Anwachsen und die Selbsterneuerung von HSCs sowie für die Differenzierung in myeloide und lymphoide Linien nicht notwendig ist. Demnach ist

der Masterregulator zwar essentiell für die Entstehung von HSCs im Embryo sowie für die korrekte Differenzierung von erythroiden und megakaryozytären Vorläuferzellen, allerdings ist seine kontinuierliche Expression für die weitere Funktion der HSCs nicht von Nöten (Mikkola et al. 2003; Curtis et al. 2004).

Abgesehen von GATA1/2 bildet TAL1 auch regulatorische Netzwerke mit anderen Transkriptionsfaktoren wie RUNX1 und *Friend leukemia integration 1* (FLI1) und Proteinen der *E26 transformation-specific* (ETS1)-Familie wie PU-1 (Wilson et al. 2010). Dadurch bilden diese Protein-Komplexe eine autoregulatorische Schleife, die dazu führt, dass sie die Expression ihrer eigenen *Downstream* Gene gegenseitig regulieren.



**Abbildung 1.10. Die Expression von TAL1 in den unterschiedlich reifen Zellen des hämatopoetischen Systems.**

TAL1 ist ein hämatopoetischer Transkriptionsfaktor und übt eine entscheidende Rolle während der primitiven Hämatopoese aus. Die Expression von TAL1 kann in HSCs und MPPs, sowie in CMPs nachgewiesen werden. Außerdem nimmt TAL1 auch Einfluss auf die megakaryozytäre und erythroide Linienentscheidung, und wird in MEPs, EPs und GMPs exprimiert. In der lymphoiden Linie hingegen kann es unter physiologischen Bedingungen nicht detektiert werden. LT-HSC: *Long-term* hämatopoetische Stammzelle; ST-HSC: *Short-term* hämatopoetische Stammzelle; MPP: *Multipotent progenitor*; CMP: *Common myeloid progenitor*; CLP: *Common lymphoid progenitor*; MEP: *Megakaryocyte erythroid progenitor*; GMP: *Granulocyte monocyte progenitor*; EP: *Erythrocyte progenitor*; Modifiziert nach (Passegué et al. 2003).

#### 1.6.4 TAL1 in Leukämien

TAL1 ist ein potentes Onkogen, wenn es durch Deletionen, Mutationen oder chromosomale Translokationen abnormal exprimiert wird. Dies ist für TAL1 insbesondere bei T-ALL der Fall. Wie bereits im Kapitel 1.6.3 beschrieben und in Abbildung 1.10 dargestellt, ist TAL1 unter physiologischen Bedingungen nicht in B- und T-Zellen exprimiert (Y. Zhang et al. 2005). Allerdings kann aberrante TAL1 Expression in 60% aller T-ALL Fälle nachgewiesen werden (Look 1997; Ferrando et al. 2004; Bash et al. 1995). T-ALL ist eine eher seltene Form der ALL, die etwa 15% aller neu diagnostizierten ALLs in Kindern und etwa 25% aller ALLs in Erwachsenen ausmacht (Pui and Evans 2006). Bei einer T-ALL ist die Differenzierung der unreifen T-Zellvorläufer betroffen. Im Gegensatz zur häufiger vorkommenden B-ALL ist diese Form der Leukämie in etwas älteren Patienten mit einem Durchschnittsalter von 10 Jahren vertreten und weist eine höhere Anzahl an Leukozyten und eine schlechtere Prognose auf (Goldfarb and Greenberg 1994).

Eine häufige Ursache für eine TAL1-induzierte maligne T-Zellentwicklung ist die Translokation t(1;14), bei der ein Teil des *TAL1*-Gens von Chromosom 1 in den Lokus des T-Zell-Rezeptors  $\alpha/\delta$  auf Chromosom 14 transloziert und ektopische TAL1 Expression verursacht (Finger et al. 1989). Die häufigste chromosomale Deletion, die am TAL1-Lokus beobachtet werden kann, ist die SIL-TAL1 Deletion, bei der ein 90 kb großer intrachromosomaler Bereich deletiert wird und mit dem benachbarten Promotor des *SIL*-Gens fusioniert. Dabei wird der kodierende Bereich von TAL1 unter die Kontrolle des *SIL*-Promotors gebracht, was zu einer ektopen TAL1 Expression führt (Peter D. Aplan, Raimondi, and Kirsch 1992; J. W. G. Janssen et al. 1993). Allerdings ist in den meisten Fällen von TAL1-positiven T-ALLs keine chromosomale Umorganisation notwendig. Eine hohe TAL1 Expression korreliert häufig mit hohen LMO2-Leveln, was eine Störung der Funktion des E-Proteins mit sich bringt und zu Leukämie führen kann (Patterson et al. 2007). In diesem Zusammenhang konnte durch einen Versuch mit transgenen Mäusen festgestellt werden, dass TAL1 allein nur ein geringes onkogenes Potential besitzt, während es in Kombination mit LMO1 und LMO2 eine stark tumorfördernde Wirkung zeigt (Cantor and Orkin 2002; Peter D. Aplan et al. 1997; Larson et al. 1996).

Des Weiteren konnte beschrieben werden, dass TAL1 die Expression von RUNX1, ETS1 und GATA3 in Blasten von T-ALL Patienten aktiviert (Liau, Ngoc, and Sanda 2017). Eine abnormal hohe TAL1 Expression führt zudem zu einer Steigerung der Transkription des TAL1-Zielgens *c-kit* in B-Lymphozyten, die diese Gene unter physiologischen Bedingungen nicht exprimieren (Lécuyer et al. 2002).

Eine Deregulation von TAL1 kann außerdem durch Mikroinsertionen verursacht werden. Eine Studie hat belegt, dass eine heterozygote Insertion von 12 Basenpaaren 7,5 kb *upstream* des Transkriptionsstarts von TAL1 in einer T-ALL Zelllinie mit aberranter TAL1 Expression gefunden wurde. Diese Mikroinsertion führt zu einer

Veränderung der Chromatinumgebung. Die reprimierende Histonmodifikation H3K27me<sub>3</sub> wird durch H3K27ac ausgetauscht, was mit aktiver Transkription einhergeht (Navarro et al. 2015).

### 1.6.5 Einfluss von TAL1 auf die Chromatinstruktur

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, kann TAL1 sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Genexpression fungieren, abhängig von der Sequenz und dem Differenzierungsstadium der hämatopoetischen Zellen (Linggi et al. 2005). Dazu werden Koaktivatoren und -repressoren rekrutiert, die die Richtung, in welche die Transkription der Zielgene gesteuert werden soll, maßgeblich mit beeinflussen. Während der Hämatopoese bestimmen auch epigenetische Modifikationen wie Histonacetylierung und -methylierung das Muster der Genexpression, das daraufhin die Zelldifferenzierung in eine bestimmte Linie vorgibt (Orford et al. 2008; Cui et al. 2009). TAL1 kann die Chromatinstruktur direkt beeinflussen durch Rekrutierung von HATs und HDACs, Faktoren, welche die Expression erythroider Gene durch Acetylierung und Deacetylierung modulieren (Hu, Ybarra, et al. 2009). In frühen erythroiden Entwicklungsstufen rekrutiert TAL1 beispielsweise mSIN3a, HDAC1 und HDAC2 (S. Huang and Brandt 2000), um die Transkription erythroid-spezifischer Gene zu reprimieren. Diese deacetylierenden Faktoren sind während der Differenzierung deutlich weniger am TAL1-Komplex vorhanden, damit die Expression der erythroiden TAL1-Zielgene stattfinden kann. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Trichostatin A (TSA), ein spezifischer HDAC-Inhibitor, zusammen mit TAL1 die erythroide Differenzierung steigert, was darauf schließen lässt, dass HDAC1/2 die transkriptionelle Aktivität von TAL1 negativ moduliert (S. Huang and Brandt 2000).

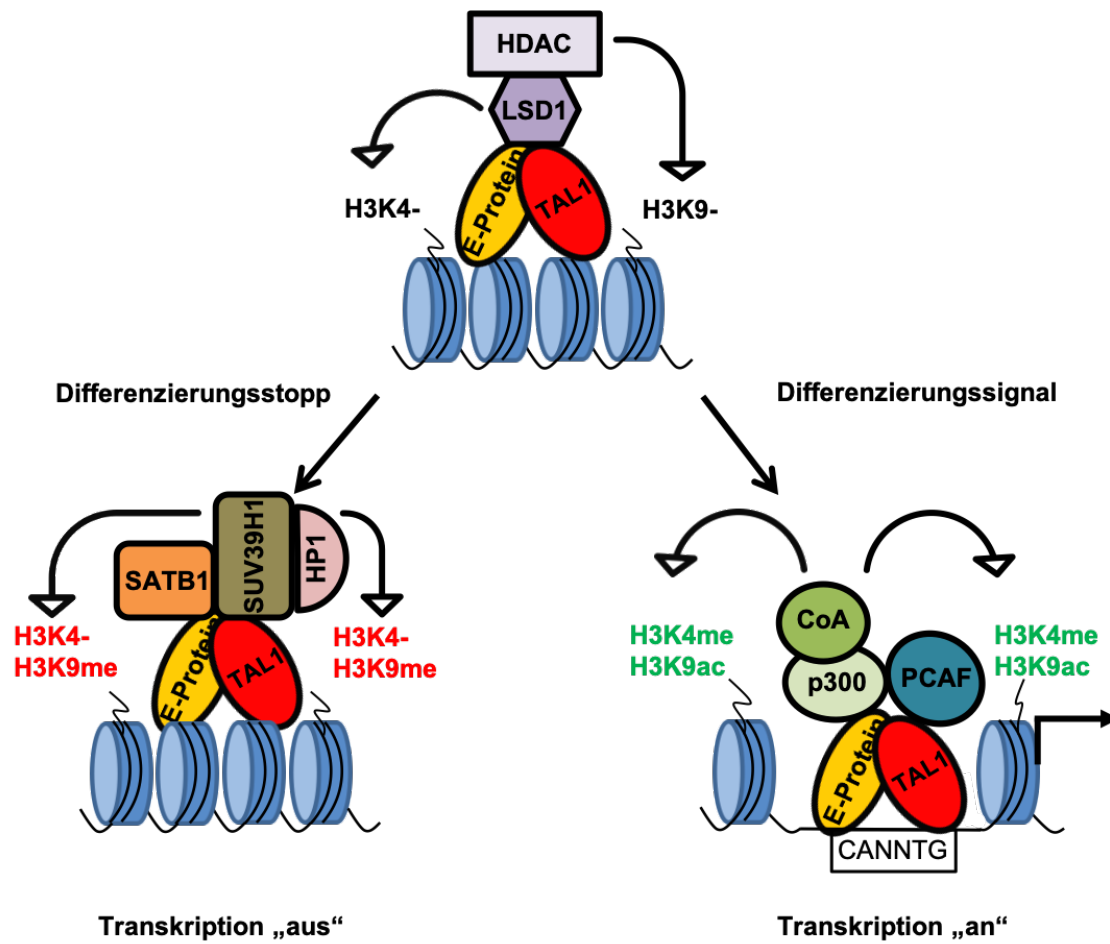
Sobald Differenzierungsgene benötigt werden, werden aktivierende Faktoren wie p300 und der Kofaktor P/CAF, die histonacetylierende Eigenschaften aufweisen, an den TAL1-Komplex rekrutiert. Durch Acetylierung von TAL1 wird zum einen die DNA-Bindekapazität verstärkt und zum anderen der TAL1-mSIN3a-Repressorkomplex destabilisiert (Suming Huang et al. 1999; 2000).

Methylierungen finden an den Histonen 3 und 4 statt, die entweder mono-, di- oder trimethyliert werden können. Um TAL1-vermittelte transkriptionelle Reprimierung zu bewirken, assoziiert TAL1 mit der Methyltransferase SUV39H1 und dem Heterochromatin Protein HP1, die spezifisch Lysin 9 an Histon 3 (H3K9) methylieren. Interessanterweise wird häufig in unreifen Thymozyten zusammen mit dem TAL1/SUV38H1 Komplex der globale Chromatinorganisator *special AT-rich sequence binding 1* (SATB1) gefunden, der die Chromatinstruktur zu einer höheren Ordnung faltet, wodurch es weniger zugänglich für die Transkription ist (Wen et al. 2005).

Des Weiteren konnte eine Studie belegen, dass TAL1 in Jurkat und erythroleukämischen Zellen mit LSD1 interagiert, eine Demethylase, die spezifisch die



Methylgruppen von Lysin 4 am Histon 3 (H3K4) entfernt (Hu, Li, et al. 2009). H3K4-Methylierung ist eine Modifikation, die in transkriptionell aktivem Chromatin gefunden wird. Durch die Demethylierung durch LSD1 wird die Expression daher wiederum stillgelegt. Sobald die erythroide Differenzierung induziert wird, dissoziiert der TAL1/LSD1-Komplex, sodass sich wiederum aktive Markierungen wie H3K4me2 und H3K9ac am Promotor der TAL1-Zielgene anreichern können (Hu, Li, et al. 2009; Hu, Ybarra, et al. 2009). Eine weitere wichtige Rolle in diesem komplexen Netzwerk aus Histonmodifikationen spielt die Phosphorylierung. TAL1 kann an der Aminosäure Serin 172 durch die cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-abhängige Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden, was die DNA-Bindekapazität von TAL1 verringert und sich somit ebenfalls negativ auf die transkriptionelle Aktivität auswirkt. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass der TAL1/LSD1-Komplex in Erythroblasten durch Erythropoietin (EPO)-stimulierte Differenzierung an Serin 172 phosphoryliert wird, was eine Aktivierung der reifen Erythropoese initiiert (Prasad and Brandt 1997). Durch diesen epigenetischen Wechsel zwischen aktivierenden und reprimierenden Histonmodifikationen entsteht ein Gleichgewicht zwischen der aktivierenden und inhibierenden Funktion von TAL1 während der Entwicklung und Reifung von Erythrozyten.



**Abbildung 1.11. Epigenetische Regulation von TAL1 während der Erythropoese.**

Vereinfachte Darstellung des epigenetischen „Switch“ zwischen reprimierter und aktiver TAL1-regulierter Transkription. Durch Differenzierungssignale werden Koaktivatoren wie p300 und PCAF an den TAL1-Komplex rekrutiert, die histonacetylierende Eigenschaften aufweisen. Die Transkription erythroider Gene wird angeschaltet. Wenn die Zelle Signale für einen Differenzierungsstopp sendet, werden Korepressoren rekrutiert wie HDAC, die die Acetylierung von H3K9 entfernt und LSD1, eine H3K4 spezifische Demethylase. Zusätzlich wird SUV39H1 und HP1 an den TAL1-Komplex gebunden, die eine spezifische Methylierung an H3K9 katalysiert. SATB1 fungiert zusätzlich, um das Chromatin dichter zu verpacken und unzugänglicher zu machen. SATB1: *special AT-rich sequence binding 1*; HP1: Heterochromatin Protein 1; TAL1: *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*; HDAC: Histondeacetylase; LSD1: *lysine specific demethylase 1*; CoA: Koaktivator; p300: EP300; Modifiziert nach (Hu, Ybarra, et al. 2009).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

TAL1 ist ein Masterregulator des hämatopoetischen Systems, der essentielle Rollen während der primitiven Hämatopoese und insbesondere in der myeloiden Linienentscheidung ausübt. Dieser Transkriptionsfaktor bildet einen Kernkomplex mit Kofaktoren und weiteren Transkriptionsfaktoren und reguliert die Expression von TAL1-Zielgenen. In lymphoiden Zellen ist TAL1 unter physiologischen Voraussetzungen herunterreguliert. Allerdings ist weithin beschrieben, dass in 60% aller T-ALL Patienten eine aberrante TAL1 Expression beobachtet werden kann (Look 1997; Ferrando et al. 2004; Bash et al. 1995). Diese wird häufig durch Translokationen oder chromosomale Deletionen hervorgerufen.

Das miR-17-92 Cluster ist ein polycistronisches miRNA Cluster, das für sechs reife miRNAs kodiert, welche unterschiedliche Aufgaben ausüben und verschiedene Zielgene haben. Es hat essentielle Funktionen in der embryonalen Entwicklung der Lunge und des Herzens sowie in der B-Zell-Reifung (Ventura et al. 2008) inne. Weiterhin wird das miRNA Cluster auch als Onkomir bezeichnet, da es in vielen soliden Tumoren sowie hämatologischen Erkrankungen hoch exprimiert vorgefunden werden kann (He et al. 2005).

Dadurch, dass TAL1 und miR-17-92 beide unverzichtbare hämatologische Eigenschaften aufweisen und onkogenes Potential besitzen, lag die Vermutung nahe, dass eine Korrelation zwischen den beiden Faktoren bestehen könnte. Darüber hinaus konnten durch vorherige Arbeiten mehrere potentielle miRNA Bindestellen des miR-17-92 Clusters auf der 3'-UTR von TAL1 entdeckt werden, was ein weiteres Indiz auf einen Zusammenhang von TAL1 und miR-17-92 darstellt.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst durch die Verwendung von SILAC-basierter Massenspektrometrie festzustellen, ob es sich bei *TAL1* um ein direktes Zielgen des miR-17-92 Clusters handelt. In diesem Rahmen sollte genauer spezifiziert werden, welche der sechs reifen miRNAs aus dem miR-17-92 Cluster Einfluss auf die TAL1 Expression nehmen. Da der Transkriptionsfaktor als Komplex aus vielen Faktoren agiert, sollte zudem herausgefunden werden, welche weiteren Gene sekundär durch miR-17-92 über eine Veränderung von TAL1 beeinflusst werden. Weiterhin sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob TAL1 auch einen Effekt auf die miR-17-92 Expression hat und sich diese beiden Faktoren gegenseitig regulieren.

Durch die wichtige Rolle, die TAL1 in der myeloiden Linienentscheidung einnimmt, wurde außerdem analysiert, wie sich eine Veränderung der TAL1-Konzentration durch miR-17-92 auf die Differenzierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen und auf die Expression spezifischer Differenzierungsgene wie *Glykopherin A* und *CD71* auswirkt.

Da TAL1 darüber hinaus im Falle von T-ALL häufig hoch exprimiert in unreifen Thymozyten vorkommt, sollte getestet werden, ob sich eine durch miR-17-92

veränderte TAL1 Expression auf das Expressionslevel des T-Zell-spezifischen Oberflächenmarkers CD4 niederschlägt.

Aufgrund der Tatsache, dass im Bereich des *MIR17HG*-Promotors eine große CpG-Insel entdeckt werden konnte und epigenetische Modifikationen im Laufe des Alters Veränderungen durchlaufen, sollte untersucht werden, ob eine altersabhängige Korrelation zwischen der TAL1- und der miR-17-92 Expression in gesunden T-Zellen besteht, die möglicherweise das Risiko für eine Leukämie-Entstehung erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ziel dieser Forschungsarbeit darin lag, die regulatorische Schleife zwischen TAL1 und miR-17-92 zu analysieren. Dabei sollte die Rolle dieser Regulation während der Hämatopoese untersucht und mögliche Risiken einer Leukämie bei einer Fehlregulation in Betracht gezogen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

|  |                          |
|--|--------------------------|
| Agarose  | Biozym                   |
| Adenosintriphosphat (ATP)  | Carl Roth                |
| Ammoniumpersulfat (APS)  | Carl Roth                |
| Ampicillin-Natriumsalz (Amp)   | Carl Roth                |
| Bromphenolblau   | Sigma Aldrich            |
| Bovines Serumalbumin (BSA)   | PAA-Laboratories         |
| Cut Smart Puffer   | New England Biolabs      |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) | Carl Roth                |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | Carl Roth                |
| Dithiothreitol (DTT)   | Carl Roth                |
| DNA Ladepuffer (6x)  | New England Biolabs      |
| dNTPs (100 mM)   | Thermo Fisher Scientific |
| Essigsäure, 100%   | Carl Roth                |
| Ethanol, 96%   | Carl Roth                |
| Ethidiumbromidlösung 1%  | Carl Roth                |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)  | Carl Roth                |
| Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)  | Carl Roth                |
| Formaldehyd 37%  | Carl Roth                |
| Glycin   | Carl Roth                |
| Glycylglycin (GlyGly)  | AppliChem                |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)                                 | Carl Roth                |
| Isopropanol  | Carl Roth                |
| Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)  | Carl Roth                |
| Kaliumchlorid (KCl)  | Carl Roth                |
| Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  | Carl Roth                |
| D-Luciferin  | Carl Roth                |
| Lachssperma-DNA (SSD)  | AppliChem                |
| LB-Agar  | Sigma Aldrich            |
| LB-Medium  | Carl Roth                |
| Lysozym  | Carl Roth                |
| Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )  | Carl Roth                |
| Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )   | Carl Roth                |
| $\beta$ -Mercaptoethanol   | Carl Roth                |

|  |                          |
|--|--------------------------|
| Metafectene  | Biontex                  |
| Methanol   | Carl Roth                |
| Natriumchlorid (NaCl)  | Carl Roth                |
| Natriumdeoxycholat   | Carl Roth                |
| Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O) | Carl Roth                |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)   | Carl Roth                |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )  | Carl Roth                |
| o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG)  | Carl Roth                |
| Nonidet P40 (NP-40)  | AppliChem                |
| Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase  | Thermo Fisher Scientific |
| Phusion 5x HF Puffer   | Thermo Fisher Scientific |
| Phusion 5x GC Puffer   | Thermo Fisher Scientific |
| Primer   | Eurofins Genomics        |
| Protaminsulfat   | Sigma Aldrich            |
| Protease-Inhibitor-Cocktail 5  | AppliChem                |
| Proteinase K   | AppliChem                |
| Polyethylenimin (PEI)  | Polysciences             |
| RNAse A (aus PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit)                                       | Invitrogen               |
| Roti®-Block  | Carl Roth                |
| Rotiphorese Gel 30   | Carl Roth                |
| D(+)-Saccharose  | Carl Roth                |
| Salzsäure (HCl)  | Carl Roth                |
| T4 DNA-Ligase  | New England Biolabs      |
| T4 DNA-Ligase Puffer   | New England Biolabs      |
| <i>TaqMan</i> -Sonden  | Thermo Fisher Scientific |
| Tetramethylethylenediamine (TEMED)   | Carl Roth                |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)   | Carl Roth                |
| Triton X-100   | Carl Roth                |
| Trypanblau   | Sigma Aldrich            |
| Tween-20   | Carl Roth                |
| Q5® High-Fidelity DNA Polymerase   | New England Biolabs      |
| Q5 GC Enhancer   | New England Biolabs      |
| Q5 Reaction Puffer   | New England Biolabs      |
| Zeocin   | InvivoGen                |

### 2.1.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

|  |                  |
|--|------------------|
| DMEM, high glucose, GlutaMAX                         | Gibco/Invitrogen |
| Fötales Kälberserum (FKS)                            | PAA-Laboratories |
| (h) <i>FMS like tyrosine kinase 3</i> (Flt-3) Ligand | Miltenyi Biotech |

|                                       |                       |
|---------------------------------------|-----------------------|
| (h) Interleukin-3 (IL-3)              | Miltenyi Biotech      |
| (h) Interleukin-6 (IL-6)              | Miltenyi Biotech      |
| StemMACS HSC-CFU lite with Epo, human | Miltenyi Biotech      |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)   | PAA-Laboratories      |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)   | PAA-Laboratories      |
| RPMI 1640, GlutaMAX                   | Gibco/Invitrogen      |
| (h) Stammzellfaktor (SCF)             | Miltenyi Biotech      |
| StemSpan SFEM-Expansionsmedium        | StemCell Technologies |
| Trypsin-EDTA (0,05%)                  | Gibco/Invitrogen      |

### 2.1.3 Bakterien

|                |   |
|----------------|---|
| DH5 $\alpha$   | <i>Escherichia coli</i> Stamm zur Amplifikation von Plasmid-DNA |
| One Shot TOP10 | <i>Escherichia coli</i> Stamm zur Amplifikation von Plasmid-DNA |

### 2.1.4 Kits

|  |                          |
|--|--------------------------|
| CD34 MicroBead Kit                                 | Miltenyi Biotec          |
| CD3 MicroBead Kit                                  | Miltenyi Biotec          |
| ChIP DNA Clean & Concentrator                      | Zymo Research            |
| DC™ Protein-Assay                                  | BIO-RAD                  |
| GeneJet Gel Extraction Kit                         | Thermo Fisher Scientific |
| GeneJet PCR Purification                           | Thermo Fisher Scientific |
| GeneJet Plasmid Miniprep Kit                       | Thermo Fisher Scientific |
| Mesa Blue 2x PCR Master Mix for SYBR Green I Assay | Eurogentec               |
| miR-17-92 Cluster <i>Real-Time</i> PCR Assay Kit   | Signosis                 |
| miRNeasy Mini Kit                                  | Qiagen                   |
| PrimeScript™ RT Master Mix                         | Takara                   |
| PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit               | Invitrogen               |
| RNeasy Mini Kit                                    | Qiagen                   |
| Roti-Transform Kit                                 | Carl Roth                |
| TaqMan Universal PCR Master Mix                    | Thermo Fisher Scientific |

## 2.1.5 Geräte

Tabelle 2. 1 Übersicht aller verwendeter Geräte.

| Gerät                         | Bezeichnung                             | Hersteller                 | Ort               |
|-------------------------------|---|----------------------------|-------------------|
| Autoklav                      | Varioklav H+P                           | HP Medizintechnik          | Oberschleißheim   |
| AutoMACS                      | autoMACS pro                            | Miltenyi Biotech           | Bergisch Gladbach |
| Automatisches Hämatozytometer | Hemavet Multi-Cell 3/LV                 | Drew Scientific            | Miami Lakes       |
| Bakterienbrutschrank          | IN30                                    | Memmert GmbH               | Schwabach         |
| Bakterienschüttler            | MaxQ 4000                               | Thermo Fisher Scientific   | Schwerte          |
| Blot-Kammer                   | TransBlot Turbo                         | BioRad                     | Hercules          |
| Drehinkubator                 | Rotator für Reagenz- und Probenröhrchen | VWR                        | Darmstadt         |
| Durchflusszytometer           | BD FacsFortessa LSRII                   | BD Biosciences             | Franklin Lakes    |
| Durchflusszytometer           | BD FacsAria Cell Sorter                 | BD Biosciences             | Franklin Lakes    |
| Durchflusszytometer           | BD FacsAria Fusion Cell Sorter          | BD Biosciences             | Franklin Lakes    |
| Elektronische Multipipette    | Multipette XStream                      | Eppendorf                  | Hamburg           |
| Elektrophoresekammer DNA      | PerfectBlue Gelsystem Mini S            | PeqLab Biotechnologie GmbH | Erlangen          |
| Elektrophoresekammer Protein  | Elektrophoresesystem                    | PeqLab Biotechnologie GmbH | Erlangen          |
| Falkon-Kühlzentrifuge         | Rotina 420R                             | HettichZentrifugen         | Tuttlingen        |
| Falkon-Kühlzentrifuge         | Megafuge 1.0R                           | Heraeus Instruments        | Hanau             |
| Falkon-Zentrifuge             | Rotina 420                              | HettichZentrifugen         | Tuttlingen        |
| Feinwaage                     | isoCAL                                  | Sartorius AG               | Göttingen         |
| Fluoreszenzmikroskop          | IX71                                    | Olympus                    | Shinjuku          |



|                                 |                                     |                                  |                       |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Gefrierschrank -80°C            | MDF-53V                             | Sanyo                            | Osaka                 |
| Gefrierschrank -20°C            | ÖkoArctis                           | AEG                              | Frankfurt/Main        |
| Gelgießstand                    | Gießschiene<br>PerfectBlue Mini S   | PeqLab<br>Biotechnologie<br>GmbH | Erlangen              |
| Heizblock                       | Thermomixer R                       | Eppendorf                        | Hamburg               |
| Kühlschrank                     | Profi-Line                          | Liebherr                         | Bulle FR              |
| Lichtmikroskop                  | CKX41                               | Olympus                          | Shinjuku              |
| Magnetisches Rack               | 12 Tube Magnetic<br>Separation Rack | New England<br>Biolabs           | Frankfurt/Main        |
| Magnetischer<br>Zellseparator   | QuadroMACS™<br>Separator            | Miltenyi Biotech                 | Bergisch<br>Gladbach  |
| Magnetrührer                    | FB15001                             | Thermo Fisher<br>Scientific      | Waltham               |
| Mikrokühlzentrifuge             | 2K15                                | Sigma Aldrich                    | Osterode am<br>Harz   |
| Mikrozentrifuge                 | Mikro 120                           | HettichZentrifugen               | Tuttlingen            |
| Minizentrifuge                  | Sprout<br>Minizentrifuge            | Biozym                           | Hessisch<br>Oldendorf |
| Odyssey-Entwickler              | Odyssey CLX<br>imaging System       | LI-COR Bioscience                | Bad Homburg           |
| PCR Cycler                      | T Professional<br>Basic Gradient    | Biometra GmbH                    | Göttingen             |
| pH Meter                        | HI 2211 pH/ORP<br>Meter             | Hanna Instruments                | Vöhringen             |
| Photometer                      | BioPhotometer                       | Eppendorf                        | Hamburg               |
| Pipette 0,2-2 µl                | Pipetman L P2L                      | Gilson                           | Middleton             |
| Pipette 1-10 µl                 | Pipetman L P10L                     | Gilson                           | Middelton             |
| Pipette 2-20 µl                 | Pipetman L P20L                     | Gilson                           | Middelton             |
| Pipette 20-200 µl               | Pipetman L P200L                    | Gilson                           | Middelton             |
| Pipette 100-1000 µl             | Pipetman L<br>P1000L                | Gilson                           | Middelton             |
| Pipettierhilfe                  | CellMate II                         | Matrix<br>Technologies<br>Corp.  | Hudson                |
| Plattenlesegerät                | Viktor X4                           | Perkin Elmer                     | Waltham               |
| <i>Real-time</i> -PCR<br>Cycler | LightCycler480                      | Roche                            | Mannheim              |

|                         |  |                                |                       |
|-------------------------|--|--------------------------------|-----------------------|
| Real-time-PCR<br>Cycler | StepOne Plus<br>Real-time                | Applied<br>Biosystems          | Foster City           |
| Rollmixer               | R137                                     | PSI Medizintechnik             | Laudenbach            |
| Sonifizierer            | Bioruptor                                | Diagenode                      | Liège                 |
| Spektrophotometer       | Nano Drop 2000                           | Thermo Fisher<br>Scientific    | Waltham               |
| Sterilwerkbank          | Holten Safe 2010<br>1.2                  | Thermo Fisher<br>Scientific    | Waltham               |
| Spannungsquelle         | PowerPac HC                              | BioRad                         | Hercules              |
| Transilluminator        | Gel Doc <sup>TM</sup> XR+                | BioRad                         | Hercules              |
| Ultrazentrifuge         | Suprafuge 22                             | Heraeus Holding<br>GmbH        | Hanau                 |
| UV Licht Tisch          | FL-117/2<br>Fluorescent tables           | Renner GmbH                    | Dannstadt             |
| Vortexer                | Vibrofix VF1                             | Janke & Kunkel<br>Labortechnik | Staufen i. Br.        |
| Waage                   | EMB 600-2                                | Kern & Sohn<br>GmbH            | Balingen              |
| Wasserbad               | WNE7                                     | Memmert GmbH                   | Schwabach             |
| Wippschüttler           | PMR-30                                   | Grant                          | Cambridge             |
| Zählkammer              | Neubauer-<br>improved                    | Marienfeld                     | Lauda-<br>Königshofen |
| Zellkulturbrutschrank   | Steri Cycle CO <sub>2</sub><br>Incubator | Thermo Fisher<br>Scientific    | Waltham               |

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Für die Experimente dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden zum einen K562- und zum anderen Jurkat-Zellen verwendet. Bei K562 handelt es sich um eine Leukämiezelllinie, die ursprünglich von einer 53-jährigen Patientin isoliert wurde, die unter chronischer myeloischer Leukämie (CML) in Blastenkrise litt (Lozzio and Lozzio 1975). Jurkat-Zellen sind T-Lymphozyten, die von einem 14-jährigen Patienten mit T-ALL isoliert wurden (Schneider, Schwenk, and Bornkamm 1977). Des Weiteren wurden HEK293T-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden von humanen embryonalen Nierenzellen gewonnen und künstlich mit dem menschlichen Adenovirus 5 transformiert, wodurch sie artifiziell die Charakteristika einer Krebszelle erhalten haben. Ein Subklon der HEK293T-Zellen exprimiert zusätzlich das Simian-Virus 40

(SV40) große T-Antigen, welches für die Replikation des Virus zuständig ist. Dadurch ist diese Zelllinie zur Herstellung von Retroviren wie beispielsweise Lentiviren sehr gut geeignet (zur Hausen 1967; Shein and Enders 1962).

K562- und Jurkat-Zellen wurden in RPMI und HEK293T-Zellen in DMEM-Medium, welches mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) angereichert wurde, im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert.

Um die Zellen aufzubewahren, wurden sie in FCS mit 10% DMSO in einem Einfrierbehälter (Mr. Frosty), der mit Isopropanol befüllt wurde, zunächst 1°C pro Minute bis auf -80°C abgekühlt und anschließend in den Stickstofftank überführt (-200°C). Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie durch Zugabe von 37°C warmem Medium aufgetaut und zunächst zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Anschließend konnten die Zellen mit frischem Medium in eine Kulturflasche überführt werden.

### **2.2.2 Isolation von humanen primären CD34<sup>+</sup>-Stammzellen**

Humane primäre CD34<sup>+</sup>-Stammzellen wurden aus Knochenmarkspenden von gesunden, freiwilligen Spendern, die vom DRK Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt wurden, isoliert. Dafür wurde das Knochenmark zunächst in PBS/0,5% BSA aufgenommen und über eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll in Erythrozyten, Thrombozyten und mononukleäre Zellen aufgetrennt. Die mononukleären Zellen wurden vorsichtig in ein frisches 50 ml Zentrifugationsgefäß überführt und mit PBS/0,5% BSA gewaschen. Anschließend wurden die CD34<sup>+</sup>-Zellen mithilfe des CD34 MicroBead Kit nach Herstellerangaben markiert und über LS-Columns mit einem magnetischen QuadroMACS Separator positiv selektiert. Die isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit einem CD45-FITC und einem CD34-PE spezifischen FACS-Antikörper angefärbt und mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit überprüft.

PBS/0,5% BSA:                      2,5 g BSA in 500 ml PBS, sterilfiltriert

### **2.2.3 Kultivierung von humanen primären CD34<sup>+</sup>-Stammzellen**

Die humanen primären CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden in einer 24-*well* Platte mit einer Zelldichte von 5 x 10<sup>5</sup> Zellen in 500 µl pro *Well* in serumfreiem Expansionsmedium SFEM StemSpan ausgesät. Dem Medium wurde SCF (100 ng/ml), Flt-3 (100 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml) und IL-6 (20 ng/ml) sowie 1% Pen/Strep zugesetzt. Die Zellen wurden bei

37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Dabei wurde die Zelldichte konstant gehalten.

#### **2.2.4 Isolation von humanen CD3<sup>+</sup>-T-Zellen aus Thrombozyten-Spenden**

Humane CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus Thrombozyten-Spenden von gesunden, freiwilligen Spendern, die vom DRK Blutspendedienst in Frankfurt zur Verfügung gestellt wurden, gewonnen. Dafür wurde das Thrombozyten-Präparat zunächst mit PBS/0,1% BSA in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und über eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll aufgetrennt. Die weiße Schicht, die aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes besteht, wurden vorsichtig in ein frisches 50 ml Zentrifugationsgefäß überführt und mit PBS/0,5% BSA gewaschen. Anschließend wurden CD3<sup>+</sup>-T-Zellen mit CD3<sup>+</sup> MicroBeads nach Herstellerangaben markiert. Die Isolation in CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup> Zellfraktionen erfolgte unsteril mithilfe des AutoMACS Pro Separator über das Programm „Pssel“. Um die Reinheit und Effizienz der Isolation zu überprüfen, wurden die isolierten Zellen mit einem CD45-APC-Cy7 und einem CD3-Pacific Blue spezifischen FACS-Antikörper angefärbt und mittels durchflusszytometrischer Analyse auf ihre Reinheit überprüft. Die Zellen wurden anschließend pelletiert und bei -80°C gelagert, bis sie für die RNA-Isolation verwendet wurden.

#### **2.2.5 Transfektion zur Virusherstellung**

Um lentivirale Viruspartikel herzustellen, wurden HEK293T-Zellen mit einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^7$  in einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen. Dafür wurden 10,1 µg des Envelop-Plasmids pMD2-G (VSV-G) (env), 18,7 µg des pCMdelta R8.91 (gag, pol) und 28,8 µg des gewünschten Transferplasmids zusammen mit DMEM ohne Zusätze auf ein Gesamtvolumen von 430 µl in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 144 µl PEI gemischt. Der Transfektionsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die HEK293T-Zellen pipettiert. Vier Stunden nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und durch 15 ml frisches DMEM ersetzt. Der Virusüberstand wurde 24 und 48 Stunden nach der Transfektion gesammelt und bei 4°C bis zur Aufkonzentration gelagert.

### 2.2.6 Ultrazentrifugation zur Virusernte

Um eine maximale Transduktionseffizienz zu erreichen, wurden die Viruspartikel durch eine Ultrazentrifugation des Kulturüberstandes der transfizierten HEK293T-Zellen aufkonzentriert. Dafür wurde zunächst der gesammelte Virusüberstand für 5 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde der Virusüberstand durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Danach wurden 5 ml einer 20%igen Succrose Lösung unter den filtrierten Virusüberstand geschichtet. Die Ultrazentrifugationsröhrchen mussten mit einer Waage perfekt austariert werden. Anschließend wurde der Virusüberstand für 2 Stunden bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Viruspellet in 500 µl PBS (für Transduktion von Zelllinien) oder SFEM StemSpan Medium (für Transduktion von CD34<sup>+</sup>-Zellen) resuspendiert. Der aufkonzentrierte Virus wurde entweder sofort verwendet oder in 250 - 500 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

20%ige Succrose-Lösung: 200 g D(-)-Saccarose in 1 L H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

### 2.2.7 Transduktion von Zellen

Für die Transduktion von Zelllinien wurden zunächst  $1,4 \times 10^6$  K562- oder  $2 \times 10^6$  Jurkat-Zellen in 1,4 ml RPMI-Medium in einer 6-*well* Platte pro *Well* ausgesät. Nach 2 - 4 Stunden wurden 100 µl des aufkonzentrierten Virus und 15 µl Protaminsulfat (1:100) tropfenweise auf die Zellen gegeben. Anschließend fand eine Zentrifugation der Zellen für 30 min, 400 x g bei 32°C statt. Am nächsten Tag wurde die Transduktion wiederholt. Vier Stunden nach der Zentrifugation wurden 3 ml vorgewärmtes RPMI-Medium auf die transduzierten Zellen gegeben.

Für die Transduktion von humanen primären CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 500 µl in einer 24-*well* Platte pro *Well* ausgesät. Es wurden 100 µl des aufkonzentrierten Virus und 6 µl Protaminsulfat (1:100) tropfenweise auf die Zellen gegeben. Das weitere Verfahren der Transduktion fand statt wie bereits bei den Zelllinien beschrieben.

Drei bis fünf Tage nach der Transduktion konnte die Transduktionseffizienz zum einen am Fluoreszenzmikroskop beobachtet und zum anderen mittels Durchflusszytometrie anhand der GFP (grün fluoreszierendes Protein) oder Tomato-Fluoreszenz der Zellen genauer bestimmt werden.

Protaminsulfat: 400 µg Protaminsulfat in 1 ml H<sub>2</sub>O

### 2.2.8 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Transduktionseffizienz transduzierter Zellen, die Reinheit der CD34- und CD3-Isolationen anhand der Oberflächenmarkerexpression oder die Expression von T-Zell-spezifischen Oberflächenmarkern in miR-17-92-überexprimierenden Jurkat-Zellen bestimmt. Dafür wurde ein BD LSR Fortessa mit drei Lasern und die FACSDiva Software zur Auswertung verwendet. Um die Transduktionseffizienz anhand der GFP- oder Tomato Expression zu bestimmen, war keine Antikörper-Färbung notwendig, da die GFP Expression durch den FITC und die Tomato Expression durch den PE-Kanal analysiert werden können. Für die FACS Messung wurden etwa  $5 \times 10^5$  Zellen in ein 5 ml Rundboden-Röhrchen (FACS-Röhrchen) überführt und mit PBS/0,5% BSA gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in 300  $\mu$ l PBS/0,5% BSA aufgenommen, um die Messung durchzuführen.

Zur Bestimmung der Isolationsreinheit von aufgereinigten CD34<sup>+</sup>- oder CD3<sup>+</sup>-Zellen, wurden etwa  $5 \times 10^5$  Zellen zunächst in ein FACS-Röhrchen gegeben, in PBS/0,5% BSA gewaschen und mit 10  $\mu$ l FcR Blockierungsreagenz inkubiert, um unspezifische Bindungen an FC-Rezeptoren zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern, die mit der jeweiligen Fluoreszenz gekoppelt sind, für 15 min im Dunkeln bei 4°C gefärbt. CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit einem CD45-PE und einem CD34-FITC spezifischen Antikörper gefärbt, CD3<sup>+</sup>-Zellen wurden mit einem CD45-APC-Cy7 und einem CD3-Pacific Blue Antikörper gefärbt. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und in 300  $\mu$ l PBS/0,5% BSA aufgenommen, um die Messung am Durchflusszytometer durchzuführen.

Um die Expression der T-Zell-spezifischen Oberflächenmarker in miR-17-92-exprimierenden Jurkat-Zellen zu bestimmen, wurden die transduzierten Zellen mindestens sieben Tage nach Transduktion in der gleichen Weise wie bereits für CD34<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>-Zellen beschrieben für die Färbung vorbereitet. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen mit einem CD45-APC-Cy7, einem CD3-Pacific Blue, einem CD4-PE und einem CD8-APC Antikörper gefärbt. Die Messung erfolgte wie bereits beschrieben.

Tabelle 2. 2 Übersicht über die verwendeten FACS-Antikörper.

| Name | Fluorochrom  | Marker                      | Hersteller       |
|------|--------------|-----------------------------|------------------|
| CD34 | PE           | Hämatopoetische Stammzellen | Miltenyi Biotech |
| CD3  | Pacific Blue | T-Zellen                    | BioLegend        |
| CD4  | PE           | T-Helferzellen              | BioLegend        |
| CD8  | APC          | Cytotoxische T-Zellen       | BioLegend        |
| CD45 | FITC         | Alle Leukozyten             | BioLegend        |
| CD45 | APC-Cy7      | Alle Leukozyten             | BioLegend        |
| FcR  | -            | Blockierungsreagenz         | Miltenyi Biotech |

### 2.2.9 Durchflusszytometrische Sortierung von transduzierten Zellen

Um eine reine Population transduzierter Zellen zu erhalten, wurden die Zellen anhand ihres GFP- oder Tomato-Signals mittels Durchflusszytometrie sortiert. Dazu wurden die transduzierten Zellen zunächst mit PBS/0,5% BSA gewaschen und mit einem Rundboden-Röhrchen mit Zellsieb vereinzelt. Die Zellen wurden in einer maximalen Konzentration von  $1 \times 10^7$  pro ml in PBS/0,5% BSA aufgenommen und steril verschlossen auf Eis zum Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main transportiert, wo die Sortierung durch Unterstützung von Dr. Stefan Stein und Annette Trzmiel am BD FACSAria Fusion steril oder am FACSAria I unsteril durchgeführt wurde. Unsteril sortierte K562- oder Jurkat-Zellen wurden in RPMI mit 20% FCS und 1% Pen/Strep aufgefangen und dreimal mit PBS/3% Pen/Strep gewaschen, bevor sie wieder in Kultur genommen wurden. Steril sortierte primäre CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden in Expansionsmedium mit 1% Pen/Strep aufgefangen und ohne Waschschrift wieder in Kultur genommen oder für einen *Colony forming unit* (CFU)-Assay ausgesät.

#### 2.2.10 Colony forming unit-Assay

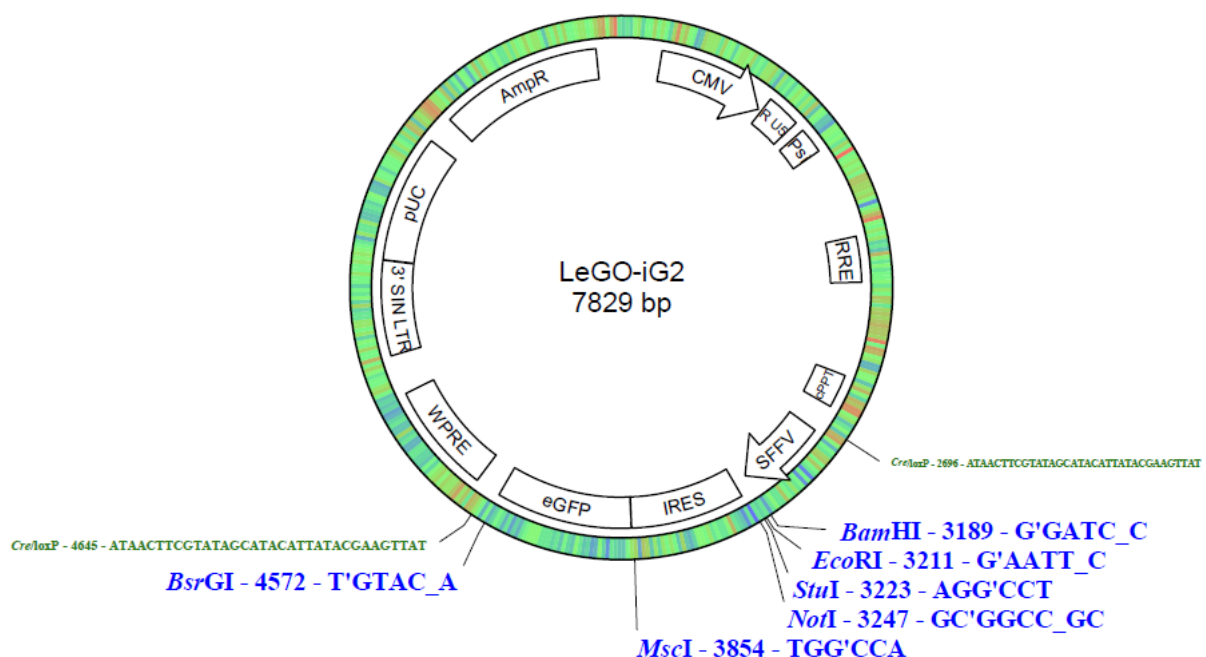
Unmittelbar nach der Sortierung der GFP<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden die Zellen für einen CFU-Assay ausgesät. Dieser diente dazu, die Differenzierung der CD34<sup>+</sup>-Zellen in Richtung erythrozytärer, monozytärer und granulozytärer Kolonien zu analysieren. Dazu wurden 4000 Zellen und 60 µl Pen/Strep (3 %) in 2 ml Methylzellulose gegeben und stark durchmischt. Danach wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend jeweils 1 ml der Methylzellulose-Zellsuspension in einer 35 mm Kulturschale ausplattiert. Pro Ansatz wurden mindestens vier Kulturschalen angesetzt. Die Zellen wurden für 10 - 14 Tage bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Vektoren

#### 2.3.1.1 LeGO Vektoren

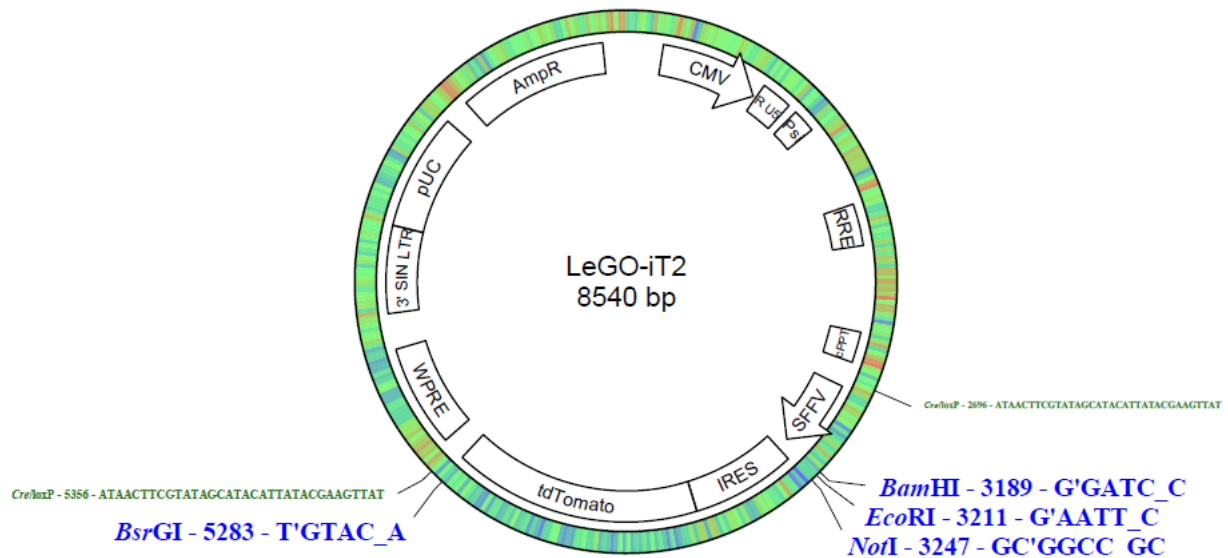
Um Überexpressionskonstrukte zu klonieren, wurde der LeGO-iG2 und der LeGO-iT2 Vektor verwendet (Weber et al. 2008). Diese Vektoren besitzen einen *Spleen focus-forming virus* (SFFV)-Promotor, der ein breites Expressionsmuster bietet und sich daher sehr gut für die Überexpression gewünschter Gene eignet. Hinter dem SFFV-Promotor befindet sich die *internal ribosome entry site* (IRES) gefolgt von einem Markergen, dem GFP oder dem rot fluoreszierenden Protein (tdTomato). Durch spezifische Klonierungsschnittstellen vor der IRES kann die gewünschte cDNA direkt hinter den SFFV-Promotor kloniert werden, was ebenfalls die Expression des Transgens erhöht. Eine Ampicillin-Resistenz ermöglicht eine Selektion positiv transformierter Bakterien. Der LeGO-iG2 Vektor wurde verwendet für die Überexpression der miR-17-92 cDNA und der LeGO-iT2 Vektor wurde verwendet für die Überexpression der murinen Tal1 und der MYC cDNA.



**Abbildung 2.1. Vektorkarte des lentiviralen LeGO-iG2 Vektors.**

Es werden zusätzlich alle einfachen Restriktionsschnittstellen angezeigt. Modifiziert nach (Weber et al. 2008).





**Abbildung 2.2. Vektorkarte des lentiviralen LeGO-iT2 Vektors.**

Es werden zusätzlich alle einfachen Restriktionsschnittstellen angezeigt. Modifiziert nach (Weber et al. 2008).

**Tabelle 2. 3 Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer und Enzymschnittstellen für die Klonierungen in die LeGO Vektoren.**

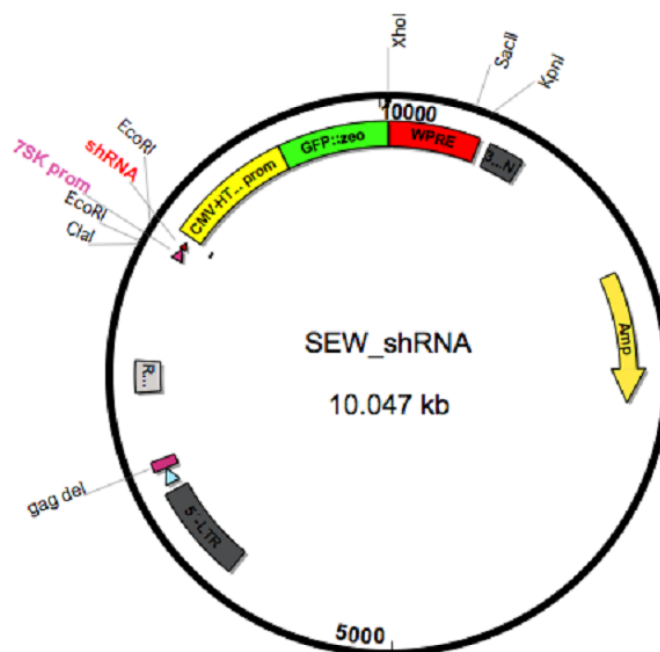
| Genname         | Primersequenz                           | Enzymschnittstelle | Tm     |
|-----------------|---|--------------------|--------|
| hmiR-17-92<br>F | TATGGATCCCTAAATGGACCTCA<br>TATCTTTGAG   | BamHI              | 65,8°C |
| hmiR-17-92<br>R | TATGAATTCGAAAACAAGACAAG<br>ATGTATTTACAC | EcoRI              | 62,4°C |
| mTal1 F         | TATGGATCCATGACGGAGCGGC<br>CGCC          | BamHI              | 71,1°C |
| mTal1 R         | TATGAATTCTCACCGGGGGCCAG<br>CCC          | EcoRI              | 69,5°C |
| hMYC F          | GATCGGATCCCTGGATTTTTTTC<br>GGGTAGTG     | BamHI              | 68,2°C |
| hMYC R          | AATTGAATTCTTACGCACAAGAGT<br>TCCGTAG     | EcoRI              | 64,2°C |

Das LeGO-iT2-MYC Konstrukt wurde von Jasmin Yillah kloniert.

### 2.3.1.2 SEW Vektor

Für *knockdown* Experimente mittels lentiviralen shRNA Transfers in humane Zelllinien wurde der SEW Vektor verwendet (Demaison et al. 2002). Dieser Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz, die als Selektionsfaktor für positiv transformierte Bakterien dient.

Darüber hinaus besitzt der Vektor einen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor und eine nachfolgende GFP-Zeocin Kasette, die eine Selektion transduzierter eukaryotischer Zellen ermöglicht. Dieser Promotor zusammen mit der GFP-Zeocin Kasette wurde aus dem psiRNA-7hSK-Vektor in den SEW Vektor kloniert. Der SEW Vektor wurde verwendet für die Expression der shRNA ACCTCGACAAGAAGCTCAGCAAGAATTCAAGAGATTCTTGCTGAGCTTCTTGTC TTTTT gegen das humane TAL1. Dieses Konstrukt wurde von Sebastian Koch (AG Lausen) mit den Enzymschnittstellen ExoRI und XhoI in den SEW-shRNA Vektor kloniert. Als Kontrolle diente eine shRNA, die gegen LacZ gerichtet ist.



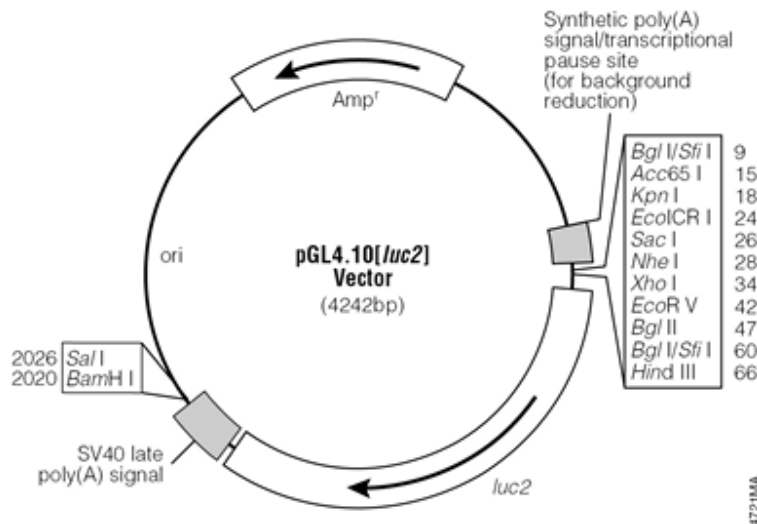
**Abbildung 2.3. Vektorkarte des lentiviralen SEW-shRNA Vektors.**

Modifiziert nach (Demaison et al. 2002).

### 2.3.1.3 pGL4.10 Vektor

Um Promotorstudien im Luciferase-Reporter-Gen-Assay durchzuführen, wurde der pGL4.10 (*luc2*) Vektor verwendet. Dieser Vektor kodiert das Luciferasegen *luc2* des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* und wurde für transiente Transfektion in Säugerzellen hergestellt. Der Vektor enthält keinen Promotor, dafür aber viele Restriktionsschnittstellen vor dem Luciferasegen, wo der zu untersuchende Promotor oder Fragmente des Promotors einkloniert werden können. Die Aktivität der Luciferase steht dann unter der Kontrolle des Promotor-Fragments. Um den Promotor des *MIR17HG*-Gens zu analysieren, wurden Deletionsfragmente von 1450, 934, 427 und

271 Basenpaaren Länge mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI vor das Luciferasegen kloniert. Zusätzlich wurde im 427 bp und 271 bp Fragment eine E-Box (CANNTG) vor dem Transkriptionsstart, die eine potentielle TAL1 Bindestelle darstellt, mutiert. Die Primer sind in Tabelle 2. 4 dargestellt.



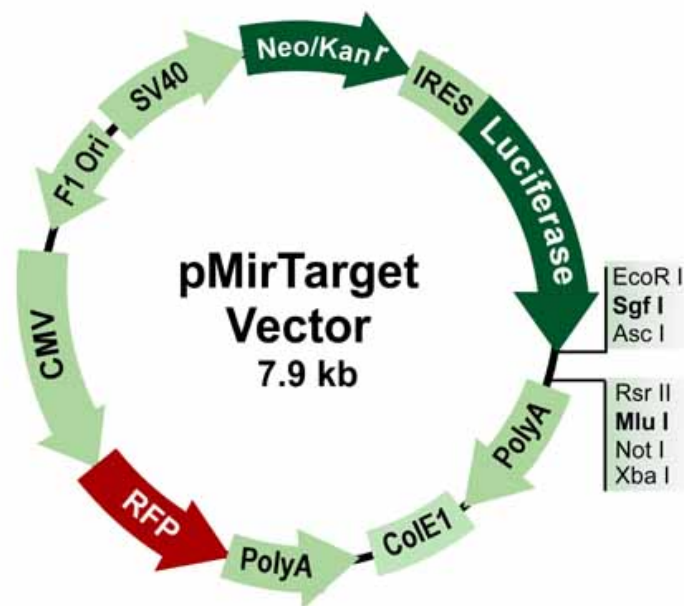
**Abbildung 2.4. Vektorkarte des pGL4.10 (luc2) Vektors (Promega, Madison).**  
Der Vektor wurde für Promotorstudien verwendet.

**Tabelle 2. 4 Übersicht über die verwendeten Klonierungs- und Mutageneseprimer und Enzymschnittstellen für die Klonierungen in den pGL4.10 Vektor.**

| Genname             | Primersequenz                       | Enzymschnittstelle | Tm     |
|---------------------|-------------------------------------|--------------------|--------|
| MIR17HG-1500 F      | TATAGGTACCCAATGCCGACCAA<br>AAGTAACG | KpnI               | 66,8°C |
| MIR17HG-1000 F      | TATAGGTACCAAGAAGGAGGTGC<br>TCCTGA   | KpnI               | 66,8°C |
| MIR17HG-500 F       | TATAGGTACCCAGAGCTTGTTAA<br>CGGAGGG  | KpnI               | 68,1°C |
| MIR17HG-250 F       | TATAGGTACCCGCCAAGAACGAG<br>CCGCCGTG | KpnI               | 73,5°C |
| MIR17HG R           | TATACTCGAGGCGGAGGAGCGC<br>GAGCCCCG  | XhoI               | >75°C  |
| MIR17HG-mut E-box F | CCTTCATTACCCACAAGGTCCT<br>TCGAGG    | -                  | 69,5°C |
| MIR17HG-mut E-box R | CCTCGAAGGACCTTGTGGGTGAA<br>TGAAGG   | -                  | 69,5°C |

## 2.3.1.4 pMirTarget Vektor

Für posttranskriptionale Studien wurde der pMirTarget Vektor (OriGene) verwendet. Dieser Vektor kodiert für das Luciferasegen *luc2* (*Photinus pyralis*) hinter das sich eine multiple Klonierungsstelle anschließt. Darüber hinaus enthält der Vektor eine Kanamycin-Resistenz für die Selektion in Bakterienzellen. Die Luciferase Kasette wird über eine davor liegende IRES kontrolliert, was eine hohe Sensitivität der Luciferase-Assays ermöglicht. Außerdem besitzt der Vektor einen CMV-Promotor und trägt das Gen für das rot fluoreszierende Protein (RFP), um die Transfektion mikroskopisch überprüfen zu können. Um die posttranskriptionale Regulation von TAL1 analysieren zu können, wurde die 3'-UTR von TAL1 in den pMirTarget Vektor mit den Enzymschnittstellen EcoRI und NotI kloniert. Zusätzlich wurden drei Deletionskonstrukte von Position 1-1094, 1075-2076 und 2076-3401 hergestellt. Das mittlere Fragment, 1075-2076, enthielt interessante miRNA Bindestellen. Um den Einfluss der miRNAs auf die Aktivität der 3'-UTRs von TAL1 zu analysieren, wurden diese Bindestellen mutiert. Die Primer für die Klonierung sind in Tabelle 2. 5 und die Mutageneseprimer in Tabelle 2. 6 aufgelistet.



**Abbildung 2.5. Vektorkarte des pMirTarget Vektors (OriGene).**

Der Vektor enthält ein IRES-betriebenes Luciferasegen, an das sich eine multiple Klonierungsstelle anknüpft.

**Tabelle 2. 5 Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer und Enzymschnittstellen für die Klonierungen der TAL1-3'-UTR in den pMirTarget Vektor.**

| Genname                   | Primersequenz                         | Enzymschnittstelle | Tm     |
|---------------------------|---------------------------------------|--------------------|--------|
| hTal1 3UTR<br>1-1093 F    | TATAGAATTCTGGGTCTGGGCCAC<br>CAGG      | EcoR1              | 68°C   |
| hTal1 3UTR<br>1-1093 R    | TATAGCGGCCGCGAGGCTGGATCC<br>TGGTCCTAT | NotI               | 73,3°C |
| hTal1 3UTR<br>1075-2076 F | TATAGAATTCATAGGACCAGGATC<br>CAGCCT    | EcoR1              | 65,4°C |
| hTAL1 3UTR<br>1075-2076 R | TATAGCGGCCGCGATAGGCCAAG<br>CCAGAGTCA  | NotI               | 73,3°C |
| hTAL1 3UTR<br>2076-3401 F | TATAGAATTCTGACTCTGGCTTGG<br>CCTATC    | EcoR1              | 65,4°C |
| hTAL1 3UTR<br>2076-3401 R | TATAGCGGCCGCGCTTCCCGATACA<br>TCCTCA   | NotI               | 70,9°C |

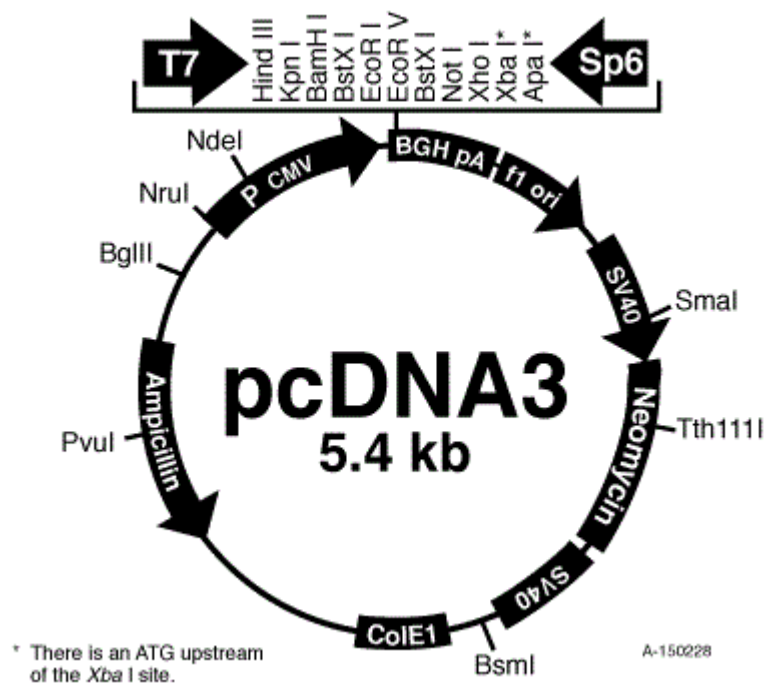
**Tabelle 2. 6 Übersicht über die verwendeten Primer für die Mutagenese der 3'-UTR von TAL1 für die Luciferase-Konstrukte.**

| Genname                 | Primersequenz                             | Tm     |
|-------------------------|---|--------|
| hTAL1-3UTR-<br>19mut F  | CATGGGACAAATAGGAGAGAAGTCC<br>TGTATG       | 66,8°C |
| hTAL1-3UTR-<br>19mut R  | CATACAGGACTTCTCTCCTATTTGTC<br>CCATG       | 66,8°C |
| hTAL1-3UTR-<br>34amut F | GTAGAATGAACCTCAGGCCCTTCAT<br>TG           | 65°C   |
| hTAL1-3UTR-<br>34amut R | CAATGAAGGGCCTGAGGTTTCATTCT<br>AC          | 65°C   |
| hTAL1-3UTR-<br>92mut F  | GAGGTTGGTTTAATCCTAAAGAAGT<br>GCTC         | 63,9°C |
| hTAL1-3UTR-<br>92mut R  | GAGCACTTCTTTAGGATTAAACCAA<br>CCTC         | 63,9°C |
| hTAL1-3UTR-<br>128mut F | GCAAGAACTCATCTCAGAGGCTGTC<br>TGGAAAG      | >75°C  |
| hTAL1-3UTR-<br>128mut R | AAAGAGTCACACACCCTCTGAGTTG<br>GCCTCTGGGCTG | >75°C  |
| hTAL1-3UTR-<br>221mut F | GTTCACCTTTCTTGGACTCAGGCTC<br>TC           | 66,5°C |

|                         |                                 |        |
|-------------------------|---------------------------------|--------|
| hTAL1-3UTR-<br>221mut R | GAGAGCCTGAGTCCAAGAAAGGTG<br>AAC | 66,5°C |
|-------------------------|---------------------------------|--------|

### 2.3.1.5 pcDNA3 Vektor

Der pcDNA3 Vektor ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen, der es erlaubt, *in vitro* Transkription zu analysieren. Er besitzt einen CMV-Promotor und eine multiple Klonierungsstelle. Außerdem ist er mit einer Ampicillin-Resistenz zur Selektion für Bakterienzellen und einer Neomycin-Resistenz für die Selektion von Säugerzellen ausgestattet. Dem Vektor wurde ein Hämagglutinin (HA)-Tag mit BamHI und BglIII eingefügt. In dieser Arbeit wurde er für die Expression von humanem TAL1 und humanem E47 in einem Luciferase-Reporter-Gen-Assays verwendet. Die Primer für die Klonierung sowie die Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle 2. 7 aufgelistet.



**Abbildung 2.6. Vektorkarte des pcDNA3 Vektors.**

Der pcDNA3 Vektor eignet sich zur transienten Transfektion in Säugerzellen.

**Tabelle 2. 7 Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer und Enzymschnittstellen für die Klonierungen des humanen TAL1 und des humanen E47 in den pcDNA3 Vektor.**

| Genname | Primersequenz                       | Enzymschnittstelle | Tm     |
|---------|-------------------------------------|--------------------|--------|
| hTAL1 F | ATATGGATCCATGGCCACCGAGC<br>GGCCGCCG | BamH1              | >75°C  |
| hTAL1 R | ATATGAATTCTCACCGAGGGCCG<br>GCTCCATC | EcoR1              | 70,8°C |
| hE47 F  | TATAGGATCCATGAACCAGCCGCA<br>GAGG    | BamH1              | 68°C   |
| hE47 R  | AATTGAATTCTTACATGTGCCCGG<br>CGGG    | EcoR1              | 66,6°C |

Diese Konstrukte wurden von Nadine Courtial (hTAL1) und Jasmin Yillah (hE47) kloniert.

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren, mit dem bestimmte DNA-Sequenzen vervielfältigt werden können (Saiki et al. 1988). Dazu wird das Enzym DNA-Polymerase benötigt, welches in jeder Zelle vorkommt und für die DNA-Replikation verantwortlich ist. Es hat die Fähigkeit, komplementäre Nukleotide an die 3'-Ende eines bestehenden DNA-Strangs zu synthetisieren. Für die Experimente dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde zum einen die Standard-DNA-Polymerase Taq verwendet und die hitzeresistenten DNA-Polymerasen mit Korrekturlese-Aktivität Phusion und Q5.

Die PCR-Reaktion besteht aus drei grundsätzlichen Schritten: 1. Der Denaturierung, bei der die doppelsträngige DNA auf 95°C oder 98°C, abhängig von der DNA-Polymerase, erhitzt wird, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen aufzubrechen und eine Trennung des Doppelstrangs zu erzielen. 2. Die Primerhybridisierung (*Annealing*), bei der die Temperatur schnell herabgesetzt wird auf 55 - 65°C, um eine Wiederverschmelzung der DNA-Stränge zu verhindern. Bei diesem Schritt lagern sich die Primerpaare spezifisch an die DNA an. Die Hybridisierungstemperatur variiert je nach Primerpaar und ist abhängig von der Länge und der Sequenz der jeweiligen Primer. Diese sollten so konstruiert werden, dass die Hybridisierungstemperatur sich zwischen 55 - 65°C bewegt. 3. Der Elongation, bei der die DNA-Polymerase ab dem 3'-Ende der angelagerten Primer die fehlenden Nucleotide komplementär zum Mutterstrang in 5'-3'-Richtung auffüllt. Dieser Schritt erfolgt bei 68 - 72°C, je nach dem bei welcher Temperatur die DNA-Polymerasen ihre höchste Aktivität erreichen. Dieser Zyklus wird 25 bis 35 mal wiederholt, was zu einer Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts führt. Durch Zugabe von DMSO kann

eine effizientere Primerbindung erzielt werden, und durch Magnesiumchlorid kann die Enzymaktivität der DNA-Polymerase gesteigert werden. Diese Parameter, ebenso wie die *Annealing*-Temperatur müssen für jede PCR spezifisch angepasst werden.

**Tabelle 2. 8 Beispiel eines PCR Programms mit der Phusion oder Q5 Polymerase.**

| Programmschritt        | Temperatur | Zeit         |
|------------------------|------------|--------------|
| Initiale Denaturierung | 98°C       | 30 sek       |
| Denaturierung          | 98°C       | 1 min        |
| <i>Annealing</i>       | 55 - 72°C  | 30 sek       |
| Elongation             | 72°C       | 1 min pro kb |
| Finale Elongation      | 72°C       | 5 min        |
| Pause                  | 4°C        | ∞            |

**Tabelle 2. 9 Beispiel eines Pipettier-Schemas für einen 50 µl PCR Ansatz.**

| Komponente                   | Menge   |
|------------------------------|---|
| Phusion DNA-Polymerase       | 0,5 µl  |
| 5x Phusion HF oder GC Puffer | 10 µl   |
| 10 mM dNTPs                  | 1 µl  |
| 10 µM <i>Forward</i> Primer  | 1 µl  |
| 10 µM <i>Reverse</i> Primer  | 1 µl  |
| DNA                          | 200 ng genomische DNA oder<br>10 ng Plasmid-DNA |
| DMSO (optional)              | 1 µl  |
| MgCl <sub>2</sub> (optional) | 1 µl  |
| Nuklease-freies Wasser       | ad 50 µl  |

### 2.3.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte zu visualisieren, wurde die Agarose Gelelektrophorese verwendet. Bei dieser Methode werden Nukleinsäurestränge der Größe nach aufgetrennt, was eine Beurteilung des amplifizierten PCR-Produktes ermöglicht. Dazu wurde Agarose, ein Polysaccharid, verwendet, welches eine sehr engmaschige Quervernetzung seiner Kettenmoleküle ausbildet, sobald es abkühlt, und somit ein Gel formt. Als Farbstoff wurde Ethidumbromid verwendet, ein roter Phenanthridin-Farbstoff, der in die DNA interkaliert (Waring 1965) und dadurch sein Absorptionsspektrum verändert (Le Pecq



and Paoletti 1966). Wird ein Agarosegel mit ultraviolettem (UV) Licht angestrahlt, leuchten die DNA Banden entsprechend heller auf, als Bereiche, in denen sich keine DNA befindet. 0,8 bis 2% Agarose wurde in einen Tris-Essigsäure-EDTA Puffer (TAE-Puffer) gegeben und in einem Kolben aufgekocht. Anschließend wurden 2,5 µl Ethidiumbromid zu der flüssigen Agarose zugegeben, kurz geschwenkt und in die Gelkammer gegeben, in die Kämme eingeführt wurden, um Taschen für das spätere Beladen mit den PCR Proben zu erhalten. Sobald das Gel ausgehärtet war, konnten die Kämme entfernt und das Gel in die Gelelektrophoresekammer, die mit 1x TAE-Puffer befüllt ist, überführt werden. Die Proben wurden zusätzlich mit einem DNA-Ladepuffer versetzt, der die Dichte der Probe erhöht und somit das Einsinken der Probe in die Geltasche erleichtert und die Laufmittelfront markiert. In der Gelkammer wurde ein elektrisches Feld erzeugt, welches aufgrund der negativ geladenen DNA eine Migration der PCR Proben durch das Agarosegel in Richtung des Pluspols (Anode) ermöglicht. Dabei laufen kürzere DNA Fragmente schneller durch das Agarosegel als längere DNA Fragmente. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleinere DNA Fragmente können im Gel aufgetrennt werden. Um die Größe der einzelnen DNA Fragmente definieren zu können, wurde eine DNA Leiter mit bekanntem Längenstandard neben den PCR Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 90 - 110 Volt für 20 - 30 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel unter UV Licht mit einem Transilluminator gescannt, um die DNA Banden zu visualisieren.

50x TAE-Puffer: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA (pH 8,0)  
1x TAE-Puffer: 20 ml 50x TAE-Puffer ad 1 L H<sub>2</sub>O

### 2.3.4 Aufreinigung eines PCR-Produktes

Um ein spezifisches PCR-Produkt aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde das „GeneJet PCR Purification Kit“ von Thermo Fisher Scientific verwendet. Es dient dazu, alle Puffer-, Salz- und Gelreste zu entfernen, um ausschließlich das gewünschte DNA Produkt zu isolieren. Zunächst wurde das Gewicht eines leeren 1,5 ml Reaktionsgefäßes mithilfe einer Feinwaage bestimmt. Die gewünschte DNA Bande wurde mit einem Skalpell unter UV Licht ausgeschnitten und in das zuvor gewogene Reaktionsgefäß überführt. Das 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde erneut gewogen und das Gewicht des Gelfragmentes bestimmt. Anschließend wurde die DNA nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert. War nach der gelelektrophoretischen Auftrennung nur eine spezifische Bande auf dem Gel sichtbar, konnte der PCR Ansatz auch direkt über die Säule aufgereinigt werden, ohne die Bande zuvor aus dem Gel auszuschneiden.

### 2.3.5 Messung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mithilfe des Nanodrop 2000, eines Spektralphotometers, bestimmt. Dazu wurde zunächst eine Leermessung mit 1 µl Nuklease-freien Wasser durchgeführt, um das Gerät zu kalibrieren. Anschließend wurde 1 µl der DNA Probe auf die Messoberfläche pipettiert, der Gerätearm geschlossen und die Messung durchgeführt. Das Spektralphotometer bestimmt die Absorption von UV Licht bei einer Wellenlänge von 230 nm, 260 nm und 280 nm. Durch die Messung bei einer Wellenlänge von 230 nm werden organische Komponenten detektiert. Nukleinsäuren zeigen bei einer Wellenlänge von 260 nm eine starke Absorption und Proteine absorbieren UV Licht am stärksten bei 280 nm. Daher wurde für eine Messung der DNA-Konzentration die A260/280 Ratio bestimmt, die bei 1,8 liegen sollte. Liegt dieser Wert niedriger, deutet dies auf eine Verunreinigung durch Proteine hin.

### 2.3.6 Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau ermöglicht es, mithilfe von Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen bekannt sind, DNA an spezifischen Bereichen zu schneiden. Diese Methode ist hilfreich, um zum einen DNA Produkte zu charakterisieren, indem die aus der Restriktion entstandenen DNA Fragmente auf einem Agarosegel überprüft werden und zum anderen um kompatible Enden zwischen einer Vektor-DNA und einem Insert für eine Klonierung zu schaffen. Die Restriktionsenzyme haben eine spezifische Bindestelle von etwa sechs Nukleotiden, an die sie sich anlagern, um dann den DNA Strang mit ihrer Endonuklease zwischen zwei spezifischen Basen zu schneiden. Der Verdau kann mit bis zu zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen durchgeführt werden, vorausgesetzt die Enzyme sind laut Hersteller kompatibel. Dabei sollte das passende Puffersystem ausgewählt werden, in dem beide Enzyme die größtmögliche Aktivität entfalten. Der Verdau wurde, wenn nicht anders vom Hersteller beschrieben, für 1h bei 37°C durchgeführt.

Tabelle 2. 10 Beispiel für einen 10 µl Ansatz eines Restriktionsverdaus.

| Komponente        | Menge    |
|-------------------|----------|
| Restriktionsenzym | 1 µl     |
| 10x Puffer        | 1 µl     |
| DNA               | ca. 1 µg |
| H <sub>2</sub> O  | ad 10 µl |

### 2.3.7 Ligation

Bei einer Ligation werden die kompatiblen Enden von linearisierter Vektor- und Insert-DNA, die durch den Restriktionsverdau mit den gleichen Enzymen entstanden sind, miteinander verbunden. Dazu verwendet man das Enzym DNA-Ligase, welches natürlicherweise in der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur vorkommt. Es hat die Fähigkeit, Doppelstrangbrüche zu reparieren, indem es unter ATP Verbrauch die 3'-Hydroxylgruppe (OH-Gruppe) des einen Stranges mit der 5'-Phosphat-Gruppe des anderen Stranges verbindet und eine Phosphodiesterbindung bildet. In dieser Arbeit wurde die T4 DNA-Ligase verwendet, die in dem Enterobakterienphagen-T4 gebildet wird (Armstrong, Brown, and Tsugita 1983). Die Insert-DNA wurde, abhängig von der Fragment Länge, in 3 - 7-facher Menge im Vergleich zur Vektor-DNA eingesetzt. Die molaren Mengen konnten mithilfe des *NEBioCalculators* (<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) bestimmt werden. Die Durchführung des Protokolls erfolgte nach Herstellerangaben. Der Ligationsansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die T4 DNA-Ligase anschließend bei 65°C für 10 min inaktiviert.

**Tabelle 2. 11 Beispiel eines Pipettier Schemas eines Ligationsansatzes.**

| Komponente                 | Menge    |
|----------------------------|----------|
| T4 DNA-Ligase Puffer (10x) | 1,5 µl   |
| Vektor-DNA                 | variabel |
| Insert-DNA                 | variable |
| T4 DNA-Ligase              | 1 µl     |
| Nuklease-freies Wasser     | ad 15 µl |

### 2.3.8 Transformation von kompetenten Bakterien

Um die rekombinant hergestellte Plasmid-DNA vervielfältigen zu können, muss sie zunächst in Bakterien transformiert werden. Als Transformation wird die nicht virale Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterien bezeichnet (Griffith 1928). Dazu wurden *Escherichia coli* Top10 oder DH5α verwendet. Mithilfe des „Roti-Transform Kit“ von Carl Roth wurde eine Kompetenz der Bakterien geschaffen, freie DNA aufzunehmen. Die Herstellung der kompetenten Bakterien erfolge nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Bakterien bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Für die Transformation wurden pro Ansatz 150 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und 5-15 µl Ligationsansatz hinzugegeben. Die Zellen wurden 20 min auf Eis inkubiert und währenddessen alle 5 min vorsichtig durch anschnippen

gemischt. Daraufhin erfolgte für 1 min der Hitzeschock bei 42°C, der die Bakterienmembran durchlässiger und somit empfänglicher für die Aufnahme der DNA macht. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min auf Eis inkubiert, wobei die Bakterienmembran sich wieder schließt, sodass die rekombinante DNA nicht mehr austreten kann. Danach wurden 250 µl vorgewärmtes *lysogeny broth* (LB)-Medium ohne Zusätze zu den Bakterien gegeben und die Probe für 1 Stunde bei 37°C und 250 rpm in einem Bakterenschüttler inkubiert. Schließlich wurden die Bakterien auf einer LB-Agar Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Ampicillin wurde als Selektionsfaktor verwendet, um zu gewährleisten, dass sich nur positiv transformierte Klone, welche die Antibiotikaresistenz besitzen, bilden können.

LB-Medium:                    20 g LB-Medium auf 1 L H<sub>2</sub>O, autoklaviert  
LB-Agar:                        35 g LB-Agar auf 1 L H<sub>2</sub>O, autoklaviert

### **2.3.9 Kultivierung von Bakterienkulturen**

Nach erfolgreicher Transformation haben sich nach 24 Stunden einzelne Bakterien Kolonien auf den Agar Platten gebildet. Zur Kultivierung der Bakterien wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen 10 µl Pipettenspitze von der Agar Platte gepickt und in ein Bakterien Röhrchen mit 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsfaktor überführt. Die Bakterien wurden für 16 Stunden bei 37°C und 250 rpm im Bakterenschüttler inkubiert. Danach wurde die Bakterienkultur in 250 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in einen Erlenmeyerkolben überführt und erneut für 16 Stunden bei 250 rpm geschüttelt.

### **2.3.10 Präparation von Plasmid-DNA**

Um die rekombinante Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren, wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Dazu wurde entweder das GeneJET Plasmid-Miniprep Kit (Thermo Fisher) verwendet, um aus einer 3 ml Bakterienkultur die Plasmid-DNA zu isolieren oder das PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen), um aus einer 250 ml Bakterienkultur die Plasmid-DNA zu gewinnen. Die Verwendung beider Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Zuvor wurden die über Nacht bei 37°C hochgezogenen Bakterienkulturen pelletiert und der Überstand verworfen, um dann weiter verarbeitet werden zu können. Die aus der Plasmidpräparation gewonnene Plasmid-DNA konnte anschließend zur Transfektion (Kapitel 2.2.5) und Transduktion (Kapitel 2.2.7) verwendet oder auf einem Agarosegel mittels Restriktionsverdau

(Kapitel 2.3.6) auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Um die genaue Sequenz zu analysieren, konnte die DNA auch sequenziert werden.

### 2.3.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von Eurofins Genomics mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurden 80 – 100 ng/µl Plasmid-DNA oder 20 – 80 ng/µl aufgereinigtes PCR-Produkt zusammen mit 5 µM eines *Forward* oder *Reverse* Primers in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt in einem Gesamtvolumen von 10 µl und mit einem LIGHTRUN Barcode versehen. Der Sequenzierungsprimer sollte so gewählt sein, dass der Primer etwa 50 Basenpaare vor dem zu sequenzierenden Bereich bindet. Darüber hinaus sollte jede DNA Probe sowohl mit einem *Forward* als auch mit einem *Reverse* Primer sequenziert werden, um die Sequenz aus beiden Leserichtungen überprüfen zu können. Die Proben wurden von Eurofins Genomics innerhalb von 24 Stunden sequenziert. Die Ergebnisse sind anschließend online abrufbar und wurden mithilfe des „BioEdit Sequence Alignment Editor“ analysiert.

Tabelle 2. 12 Pipettierschema einer Sequenzierungsreaktion.

| Komponente                                    | Menge                     |
|---|---------------------------|
| Primer ( <i>Forward</i> oder <i>Reverse</i> ) | 2,5 µl (5 µM)             |
| DNA   | variabel (20 - 100 ng/µl) |
| Nuklease-freies Wasser                        | ad 10 µl                  |

### 2.3.12 RNA-Isolation

Um RNA aus humanen Zelllinien oder aus primären humanen Zellen zu isolieren, wurden  $0,5 - 5 \times 10^6$  Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Um RNA aus CFU Kolonien zu gewinnen, wurde vorgewärmtes PBS in die 3 cm Schale gegeben, um die Methylzellulose aufzulösen. Die Methylzellulose wurde zusammen mit den Kolonien in ein 15 ml Zentrifugationsgefäß überführt und herunterzentrifugiert. Das Kolonie-Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Messung der DNA-Konzentration konnte anschließend am NanoDrop 2000 bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Die Durchführung der Messung erfolgte wie in Kapitel 2.3.5

beschrieben. Der Wert der 260/280 Ratio sollte bei etwa 1,8 – 2 liegen, um eine reine RNA Probe zu indizieren.

### 2.3.13 Umschreibung von RNA in cDNA

Bei der Umschreibung von RNA in cDNA macht man sich die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase zunutze, DNA anhand einer RNA Vorlage zu synthetisieren. Dieses Enzym wurde erstmalig 1970 entdeckt (Temin and Mizutani 1970; Baltimore 1970) und kommt natürlicherweise in Retroviren vor, welche die reverse Transkriptase Aktivität verwenden, um ihr eigenes RNA Genom in DNA umzuschreiben und somit in ihr Wirtsgenom zu integrieren. Beim Vorgang der reversen Transkription wird zunächst ein DNA-RNA Hybrid synthetisiert. Der RNA Strang wird durch RNase H Aktivität abgebaut, die auch von der Reversen Transkriptase gewährleistet wird. Anschließend wird durch normale DNA-abhängige Polymerase Aktivität der DNA Einzelstrang zu einem Doppelstrang synthetisiert (Okayama and Berg 1982).

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA wurde mithilfe des „PrimeScript™ RT Master Mix“ (Takara) durchgeführt. Von einer Probe wurden 500 bis maximal 1000 ng RNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis vorbereitet. Zu 1000 ng RNA wurden 4 µl 5x PrimeScript RT Master Mix gegeben und mit RNase freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion fand für 15 min bei 37°C statt. Anschließend wurde die Probe für 5 Sekunden bei 85°C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. 20 µl cDNA wurden mit 20 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert oder sofort verwendet.

### 2.3.14 Quantitative *Real-time*-PCR

Die quantitative *Real-time*-PCR (qRT-PCR) dient dazu, die Expression eines Gens in einer Probe zu analysieren. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR, bei der das PCR-Produkt nur amplifiziert und vervielfältigt wird (Kapitel 2.3.2), ermöglicht die qRT-PCR eine Datenerfassung in der exponentiellen Wachstumsphase der PCR während die Reaktion abläuft. Während der exponentiellen Phase herrschen optimale Bedingungen für die PCR, da alle Reagenzien noch verfügbar und frisch sind. Dabei wird nach jedem Zyklus die DNA Menge bestimmt. Sobald die Fluoreszenzintensität die Schwellenwertlinie über dem Hintergrund überschreitet, wird der sogenannte Ct-Wert (*cycle threshold*) bestimmt. Je früher ein Gen entsprechend detektiert wird, desto stärker ist es in der Probe exprimiert und je kleiner fällt der Ct-Wert aus. Hohe Ct-Werte hingegen deuten auf eine Detektion in einem späteren Zyklus und somit eine schwache Expression des Gens hin. Als Referenzgen wird das Haushaltsgen *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)* mitgemessen, welches eine

wichtige Rolle in der Glykolyse spielt und daher unverzichtbar für alle Zellen ist. Für die Messung wurde das StepOnePlus *Real-Time* PCR System (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Proben wurden in transparenten 96-well Platten als Triplikate wie in Tabelle 2. 13 aufgeführt, pipettiert und kurz herunterzentrifugiert um alle Reagenzien in der 96-well Platte zu vereinigen.

Für die Auswertung der qRT-PCR Analyse wurden die Ct-Werte nach der  $\Delta\Delta C_t$  Quantifizierungsmethode (Pfaffl 2001; Livak and Schmittgen 2001) berechnet und auf *GAPDH* normalisiert. Dabei konnten die Werte entweder als % *GAPDH* dargestellt werden oder die Kontrollprobe wurde gleich eins gesetzt und die Werte der anderen Proben auf die Kontrollprobe bezogen.

#### 2.3.14.1 SYBR Green

Für die Quantifizierung der qRT-PCR kann ein interkalierender Farbstoff verwendet werden wie beispielsweise SYBR Green. SYBR Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert, was die Fluoreszenz steigert, und eine Analyse der angefärbten DNA ermöglicht (T. B. Morrison, Weis, and Wittwer 1998). Infolgedessen steigt die Floreszenz proportional zur DNA Menge an. Da der Farbstoff die DNA unspezifisch bindet, wird am Ende der qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die Schmelztemperatur spezifisch für das PCR-Produkt bestimmt wird und somit von unspezifischen Produkten unterschieden werden kann.

**Tabelle 2. 13 Pipettierschema für eine Reaktion einer qRT-PCR mit SYBR Green.**

| <b>Komponente</b>                  | <b>Menge</b> |
|------------------------------------|--------------|
| SYBR Green                         | 12,5 $\mu$ l |
| <i>Forward</i> Primer (10 $\mu$ M) | 0,5 $\mu$ l  |
| <i>Reverse</i> Primer (10 $\mu$ M) | 0,5 $\mu$ l  |
| RNase-freies Wasser                | 9,5 $\mu$ l  |
| cDNA (1:1 verdünnt)                | 2 $\mu$ l    |

**Tabelle 2. 14 Übersicht über das verwendete qRT-PCR Programm mit SYBR Green am StepOne Plus Real-time Cycler.**

| Programmschritt        | Temperatur | Zeit   | Anmerkung               |
|------------------------|------------|--------|-------------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C       | 10 min |                         |
| Denaturierung          | 95°C       | 15 sek | 50 Zyklen               |
| <i>Annealing</i>       | 58°C       | 1 min  |                         |
| Elongation             | 78°C       | 10 sek |                         |
| Schmelzkurvenmessung   | 60 - 98°C  | 30 min | Kontinuierliche Messung |

In Tabelle 2. 15 sind alle Primerpaare aufgelistet, die für die qRT-PCR verwendet wurden.

**Tabelle 2. 15 Übersicht über die in der qRT-PCR verwendeten Primerpaare.**

| Genname        | Primersequenz            | Schmelztemperatur |
|----------------|--------------------------|-------------------|
| GAPDH F        | TCTTTTGCGTCGCCAGCCGAGC   | 65,8°C            |
| GAPDH R        | TGACCAGGCGCCCAATACGACC   | 65,8°C            |
| miR-17-92 F    | TTTGCATCCAGCTGTGTGAT     | 55,3°C            |
| miR-17-92 R    | ACCGATCCCAACCTGTGTAG     | 59,4°C            |
| humanes TAL1 F | TCGGCAGCGGGTTCTTTGGG     | 63,5°C            |
| humanes TAL1 R | CCATCGCTCCCGGCTGTTGG     | 65,5°C            |
| murines Tal1 F | GCTCGCCTCACTAGG          | 54,2°C            |
| murines Tal1 R | CACCCGGTTGTTGTT          | 52,5°C            |
| E47 F          | GGGACTCGGAGGCAAGAGCG     | 65,5°C            |
| E47 R          | TCGCCTGACAGGAAGCCAGC     | 63,5°C            |
| HEB F          | AGGGAATGCTGCTGGAAGCTCA   | 62,1°C            |
| HEB R          | CTGGTACCTGTGAGAGGTGAAGGT | 64,4°C            |
| LDB1 F         | ACCTGATGTGATGGTGGTGG     | 59,4°C            |
| LDB1 R         | TGCGTCAAACCTGGGTGTTCT    | 57,3°C            |
| GPA F          | CCCTCCAGAAGAGGAAACCGGAGA | 66,1°C            |
| GPA R          | GGCACGTCTGTGTCAGGTGAGG   | 65,8°C            |
| CD71 F         | AGGACGCGCTAGTGTTCTTC     | 61,5°C            |
| CD71 R         | CCAGGCTGAACCGGGTATATG    | 61,9°C            |



2.3.14.2 *TaqMan*-Sonden

Deutlich spezifischer ist die Verwendung von *TaqMan*-Sonden in der qRT-PCR. Diese spezifischen Sonden sind mit einem Fluoreszenz Farbstoff, dem sogenannten *Reporter*, am 5'-Ende und einem Fluoreszenzlöcher, dem *Quencher*, am 3'-Ende, markiert. Erst sobald die Sonden sich an ihre Zielsequenz angelagert haben und die DNA-Polymerase die neuen DNA Stränge synthetisiert hat und auf eine *TaqMan*-Sonde trifft, wird der Fluoreszenz Farbstoff vom *Quencher* getrennt und kann so ein Fluoreszenz Signal freisetzen. Die Menge des freigesetzten Farbstoffes steigt proportional zur Expression des Zielgens.

Tabelle 2. 16 Pipettierschema für eine Reaktion einer qRT-PCR mit *TaqMan*-Sonde.

| Komponente                                  | Menge |
|---|-------|
| <i>TaqMan</i> -Sonde                        | 1 µl  |
| 2x <i>TaqMan</i> Gene Expression Master Mix | 10 µl |
| cDNA (1:1 verdünnt)                         | 2 µl  |
| RNase-freies Wasser                         | 7 µl  |

Tabelle 2. 17 Übersicht über das verwendete qRT-PCR Programm mit *TaqMan*-Sonde am StepOne Plus *Real-time* Cycler.

| Programmschritt        | Temperatur | Zeit   | Zyklen |
|------------------------|------------|--------|--------|
| Initialisierung        | 50°C       | 2 min  | 1      |
| Initiale Denaturierung | 95°C       | 10 min | 1      |
| Denaturierung          | 95°C       | 15 sek | 40     |
| <i>Annealing</i>       | 60°C       | 1 min  |        |

Für die qRT-PCR wurden die in Tabelle 2. 18 aufgelisteten *TaqMan*-Sonden verwendet.

Tabelle 2. 18 Übersicht über die in der qRT-PCR verwendeten *TaqMan*-Sonden.

| Genname    | Assay-ID       |
|------------|----------------|
| GAPDH      | HS02758991_g1  |
| TAL1       | HS01097987_m1  |
| Hsa-mir-17 | HS03295901 pri |

### 2.3.15 MiR-17-92 Cluster *Real-Time* PCR Assay Kit

Das miR-17-92 Cluster *Real-Time* PCR Assay Kit (Signosis) ermöglicht es, die einzelnen reifen miRNAs des miR-17-92 Clusters mittels qRT-PCR in einer bestimmten Probe zu detektieren. Dazu hybridisiert ein miR-17-92 Oligo Mix, der mit einem Streptavidin-*Tag* markiert ist, mit den jeweiligen reifen miRNAs. Streptavidin Beads binden an den miRNA-Oligo Hybrid. Die hybridisierten Oligos werden miteinander ligiert. Trifft die Ligase dabei auf eine einzelne nicht-komplementäre Base, bricht die Ligation ab. Das ermöglicht selbst die Differenzierung zwischen miR-19a und miR-19b, die sich nur in einem Nukleotid unterscheiden. Die Durchführung des Assays fand nach Herstellerangaben statt. Eine anschließende qRT-PCR Analyse ermöglichte die Quantifizierung der miRNA Expression.

Tabelle 2. 19 Übersicht über das verwendete qRT-PCR Programm für das miR-17-92 Cluster *Real-time* PCR Assay Kit mit dem StepOne *Real-time* PCR Cycler.

| Programmschritt        | Temperatur | Zeit      | Anmerkung               |
|------------------------|------------|-----------|-------------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C       | 30 sek    |                         |
| Denaturierung          | 95°C       | 15 sek    | 35 Zyklen               |
| <i>Annealing</i>       | 55°C       | 30 sek    |                         |
| Elongation             | 72°C       | 30 sek    |                         |
| Schmelzkurvenmessung   | 55 - 95°C  | 0,6°C/sek | Kontinuierliche Messung |

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Zellkernextraktion

Für die Herstellung von Zellkernlysaten wurde das Protokoll von Schreiber und Kollegen als Vorlage verwendet (Schreiber et al. 1989). Zunächst wurden  $5 - 10 \times 10^6$  Zellen geerntet und mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß pelletiert und für alle nachfolgenden Arbeitsschritte auf Eis gehalten. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 100 - 200  $\mu$ l Puffer A resuspendiert und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 2  $\mu$ l einer 20%igen Nonident-P40 (NP-40) Lösung zur Probe gegeben und gevortext. Die Probe wurde für 5 min bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthält die Zellkerne, der Überstand die Zytoplasmafraktion. Diese wurde verworfen. Das Zellkernpellet wurde in 50 - 100  $\mu$ l kaltem Puffer C aufgenommen, sodass es sich vom Boden des Reaktionsgefäßes löste. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf dem Drehinkuabtor bei 4°C. Anschließend fand eine Zentrifugation für 25 min bei 15000 x g und 4°C statt. Das entstandene Pellet enthält unlösliche Bestandteile der Zellkerne, der Überstand die Kernproteine. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5  $\mu$ l Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kernlysate konnten bei -80°C gelagert oder sofort verwendet werden.

|           |   |
|-----------|---|
| Puffer A: | 10 mM Tris (pH 7,5), 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 mM EGTA (pH 8,0), 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1x Protease-Inhibitor-Mix (PI) (frisch) |
| Puffer C: | 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0), 1 mM EGTA (pH 8,0), 0,4 M NaCl, 20% Glycerol, 1 mM DTT, 1x PI (frisch)               |
| 1 x PI:   | 100 x Protease-Inhibitor (1mg/ml)   |

### 2.4.2 DC-Protein-Assay

Der *detergent compatible* (DC)-Protein-Assay (Biorad) ist ein kalorimetrischer Assay, um Proteinkonzentrationen zu bestimmen. Der Assay basiert auf einer Reaktion des Proteins mit Kupfer Tartrat in alkalischer Umgebung und einer anschließenden Reduktion eines Folin Reagenz durch die Aminosäuren des Proteins, was zu einer blauen Farbreaktion führt (LOWRY et al. 1951). Zunächst wurden Proteinstandards hergestellt, um eine Standardkurve zur Kalibrierung zu erhalten. Für die Proteinstandards wurde Bovines Serumalbumin (BSA) in Puffer C gelöst und Konzentrationen von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 4 mg/ml hergestellt. Zunächst wurden 5  $\mu$ l der Standards in Doppelansätzen in eine klare 96-well Mikroplatte pipettiert. Puffer C ohne BSA wurde als Nullprobe verwendet. Anschließend wurden 5  $\mu$ l der zu bestimmenden Proteinlysate ebenfalls in Doppelansätzen in die 96-well Platte pipettiert. 20  $\mu$ l von Reagenz S wurde zu 1 ml von Reagenz A gegeben und

gemischt. Danach wurden 25 µl der A+S Lösung in jedes *Well* gegeben. Anschließend wurden 200 µl von Reagenz B zügig hinzugefügt, was den Farbumschlag auslöst. Die Mikroplatte wurde vorsichtig gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schlussendlich wurde der Absorptionsindex bei 750 nm am Spektrometer gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte über die Berechnung der Steigung und des Y-Achsenabschnitts der Standards nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \text{Steigung (Standard)} * \text{Absorptionsindex (Probe - Blank)} + \text{Achsenabschnitt (Standard)}$$

### 2.4.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, welche die Detektion, Visualisierung und Quantifizierung von bestimmten Proteinen in einer Probe ermöglicht. Dabei mussten die Proteinproben in Form von Zellkernlysaten zunächst mit 4x Protein Ladepuffer versetzt werden, der die Laufmittelfront markiert und die Dichte erhöht, was ein einfaches Einsinken der Probe in die Geltasche ermöglicht. Anschließend wurden die Western Blot Lysate bei 95°C für 5 min denaturiert, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zu brechen, damit sie eine lineare Form annehmen und durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden konnten. Die denaturierten Proteine wurden auf ein senkrecht eingespanntes Polyacrylamid Gel geladen, welches eine engmaschige, siebartige Struktur aufweist. Das obere Sammelgel im Bereich der Geltaschen weist eine geringere Polyacrylamid Konzentration auf und ist großmaschiger als das untere Trenngel (Tabelle 2. 20). Das Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer gestellt, die mit einem SDS-haltigen TRIS-Glycin Puffersystem befüllt wurde. Durch eine elektrische Spannung migrieren die negativ geladenen Proteine durch das Gel, wobei kleine Proteine schneller durch das Gel wandern als große Proteine und somit der Größe nach aufgetrennt werden. Als Größenstandard wurde die Proteinleiter PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 80 Volt für 35 min bis die Proben vom Sammelgel ins Trenngel gelaufen sind. Anschließend wurde die Voltzahl auf 120 erhöht und die Gelelektrophorese 1,5 – 2 Stunden fortgesetzt. Das Gel wurde vorsichtig aus der Gelkammer entfernt und auf eine Nitrozellulose Membran überführt. Unter die Membran und über das Gel wurden in Towbin-Puffer getränkte Whatman Papiere gelegt. Der Proteintransfer fand mit dem Semi-dry Western Blot System von BioRad bei 0,8 Ampere pro Gel für 90 min statt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in 1x Roti-Block in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Darauf folgend wurde der gewünschte Primärantikörper (Tabelle 2. 21) in der vom Hersteller angegebenen Konzentration auf

die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 10 min in TBS/T gewaschen und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem gegen den Ursprungsorganismus des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper (Tabelle 2. 22), der zusätzlich mit einer Fluoreszenz gekoppelt ist, inkubiert. Die Detektion und Quantifizierung erfolgte mit dem Odyssey-System CLX von LI-COR.

**Tabelle 2. 20 Pipettierschema des SDS-Polyacrylamid Gels.**

| Sammelgel           |        | Trenngel            |        |
|---------------------|--------|---------------------|--------|
| Komponente          | Menge  | Komponente          | Menge  |
| H <sub>2</sub> O    | 2,1 ml | H <sub>2</sub> O    | 1,9 ml |
| 30% Polyacrylamid   | 500 µl | 30% Polyacrylamid   | 1,7 ml |
| 1,5 M Tris (pH 6,8) | 380 µl | 1,5 M Tris (pH 8,8) | 1,3 ml |
| 10% SDS             | 30 µl  | 10% SDS             | 50 µl  |
| 10% APS             | 30 µl  | 10% APS             | 50 µl  |
| TEMED               | 3 µl   | TEMED               | 2 µl   |

**Tabelle 2. 21 Übersicht über die verwendete Western Blot Primärantikörper.**

| Name                 | Ursprungsorganismus | Mono-/<br>Polyclonal | Verdünnung | Hersteller             |
|----------------------|---------------------|----------------------|------------|------------------------|
| Alpha-Tubulin (DM1A) | Maus                | monoclonal           | 1:5000     | Abcam (ab7291)         |
| Actin                | Kanninchen          | polyclonal           | 1:1000     | Abcam (ab1801)         |
| H3                   | Kanninchen          | polyclonal           | 1:1000     | Abcam (ab1791)         |
| TAL1 (BTL73)         | Maus                | monoclonal           | 1:500      | Millipore (04-123)     |
| E47 (G-2)            | Maus                | monoclonal           | 1:500      | Santa Cruz (sc-133075) |
| HEB/TCF12            | Kanninchen          | monoclonal           | 1:1000     | Cell Signaling (11825) |
| LDB1                 | Maus                | monoclonal           | 1:1000     | Santa Cruz (sc-365074) |

Tabelle 2. 22 Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.

| Name                          | Ursprungsorganismus | Verdünnung | Hersteller            |
|-------------------------------|---------------------|------------|-----------------------|
| Anti-Kaninchen<br>IRDye 800CW | Esel                | 1:15000    | Li-cor<br>(926-32213) |
| Anti-Maus IRDye<br>800CW      | Esel                | 1:15000    | Li-cor<br>(926-32212) |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 4x Proteinladepuffer: | 500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerol, 40 mM DTT, 5% (v/v), $\beta$ -Mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau |
| SDS-Laufpuffer:       | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS   |
| Towbin-Puffer:        | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3   |
| 1x Roti-Block:        | 5 ml 10x Roti-Block, ad 50 ml H <sub>2</sub> O  |
| TBS:                  | 50 mM Tris-Cl, pH 7,6, 150 mM NaCl  |
| TBS/T:                | 1x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20   |

#### 2.4.4 Luciferase-Reportergen-Assay

Ein Luciferase-Reportergen-Assay eignet sich für die Analyse eines Promotors und lässt Rückschlüsse auf die Promotorstärke sowie die Genaktivität zu. Dazu wird ein Luciferasegen, das natürlicherweise in dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* vorkommt, in einen Plasmid Vektor hinter den zu untersuchenden Promotor kloniert. Dadurch steht das Luciferasegen unter der Kontrolle des Promotors, was eine Analyse der Promotorstärke erlaubt. Die Kotransfektion weiterer Plasmide, die für bestimmte Transkriptionsfaktoren kodieren, erlauben es, den Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren auf die Promotoraktivität zu untersuchen.

Für die Transfektion des Luciferase-Konstruktes sowie der Transkriptionsfaktoren wurden entweder K562- oder HEK293T-Zellen, die deutlich leichter zu transfizieren sind, verwendet. Zunächst wurden  $1 \times 10^5$  HEK293T-Zellen in DMEM- oder  $2,5 \times 10^5$  K562-Zellen in RPMI-Medium in einer 24-well Platte ausgesät. Die K562-Zellen konnten 4 Stunden später transfiziert werden, die HEK293T-Zellen mussten 24 Stunden inkubieren, um adhärent an den Boden der Zellkulturflasche zu binden, bevor sie transfiziert werden konnten. Die Plasmide wurden auf eine Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l verdünnt, um eine einheitliche Plasmidkonzentration für die Transfektion zu erhalten. HEK293T-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz PEI, K562-Zellen mit Metafectene transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Lyse-Puffer auf Eis lysiert. Nach der Lyse wurden die Proben für 15 min bei 15000 x g und 4°C herunterzentrifugiert, um Zellrückstände aus dem Lysat zu entfernen. Von den HEK293T-Lysaten wurden 5  $\mu$ l pro Probe und von den K562-Lysaten 15  $\mu$ l pro Probe als Doppelbestimmung in eine

weiße 96-*well* flachboden Mikroplatte (Greiner) pipettiert. Der Lyse-Puffer fungierte als Nullprobe. Die Luciferase-Aktivität konnte durch Zugabe des Luciferase-Puffers, der das Substrat sowie alle notwendigen Reagenzien für die Reaktion enthält, mithilfe eines Plattenlesegeräts bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen werden. Das Substrat Luciferin wird von der Luciferase unter Verwendung von ATP und Magnesium zu Oxyluciferin umgebaut, was zu einer Lichtreaktion führt.

Um auszuschließen, dass die Zellen unterschiedlich stark transfiziert wurden, wurde nach dem Luciferase-Assay ein  $\beta$ -Galactosidase-Assay durchgeführt bei dem die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase proportional zur Transfektionseffizienz ist. Dafür wurde zeitgleich jedes *Well* zusätzlich mit einem  $\beta$ -Galactosidase Vektor transfiziert. Dazu wurden 5  $\mu$ l des HEK293T-Lysats und 15  $\mu$ l K562-Lysats als Doppelbestimmung in eine klare 96-*well* Platte pipettiert und 100  $\mu$ l  $\beta$ -Galactosidase-Puffer hinzugegeben. Dieser enthält o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG), was in der Gegenwart von  $\beta$ -Galactosidase zu Galactose und ortho-Nitrophenol katalysiert wird und in einer Gelbfärbung resultiert. Bei K562-Lysaten wurde die 96-*well* Platte zunächst vor der Messung für 45 min bei 37°C inkubiert. Bei HEK293T-Lysaten erfolgt die Gelbfärbung sofort. Die Absorption wurde am Plattenlesegerät bei 420 nm gemessen.

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Lyse-Puffer:                     | 50 mM Tris (pH 7,4), 1% Triton X-100, 50 mM NaCl   |
| Luciferase-Puffer:               | 21,625 mM Glycylglycine (Gly Gly), 1 mM ATP, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,075 mM Luciferin                            |
| $\beta$ -Galactosidase-Puffer:   | 11,1 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 3,25 mM ONPG, 74,4 mM Natrium-Phosphat (pH 7,5)          |
| Natrium-Phosphat-Lösung (0,1 M): | 82 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 18 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O |
| ONPG:                            | 3,28 mM in 0,1 M Natrium-Phosphat-Lösung   |
| PBS:                             | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>             |

#### 2.4.5 Chromatin-Immunopräzipitations-Assay

Mit einem Chromatin-Immunopräzipitations-Assay (ChIP-Assay) können Interaktionen zwischen DNA und Proteinen in bestimmten Zellen analysiert werden. Er ermöglicht es, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifischen Bereichen in Promotorregionen zu identifizieren sowie Histonmodifikationen im Chromatin zu detektieren. Die Durchführung des Assays basiert auf dem X-ChIP Protokoll von Abcam. Dafür wurden zunächst  $1 \times 10^7$  K562-, Jurkat- oder CD34<sup>+</sup>-Zellen in 10 ml Medium aufgenommen. Durch die tropfenweise Zugabe von 203  $\mu$ l 37% Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 0,75% und einer anschließenden 15-minütigen Inkubation auf der Wippe bei Raumtemperatur wurden die Proteine und die DNA quervernetzt (*Crosslink*). Anschließend wurde die *Crosslink*-Reaktion durch die tropfenweise Zugabe von 1250  $\mu$ l Glycin (1 M) zu einer Endkonzentration von 125 mM und einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln

abgestoppt. Daraufhin wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und das Zellpellet schließlich in 1 ml ChIP-Lysepuffer resuspendiert und 45 - 60 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen alle 10 min gevortext. Nach der Lyse wurden jeweils 500 µl des Lysats in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 16 Zyklen (high, 30 sek on/off) mit einem Bioruptor sonifiziert um DNA Fragmente von einer Größe zwischen 300 und 1000 Basenpaaren zu erhalten. Die Fragment Größe wurde auf einem 1% Agarosegel überprüft. Dafür wurden 15 µl Lysat mit 15 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl RNase und 1 µl Proteinase K gemischt und für 4 Stunden bei 65°C und 700 rpm geschüttelt, um den *Crosslink* aufzuheben. Anschließend konnte die Probe mit 6x DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Gel aufgetragen werden (Kapitel 2.3.3). Nach der Sonifikation wurden die Lysate bei 15000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in frische 1,5 µl Reaktionsgefäße aliquotiert und schockgefroren und bei -80°C gelagert oder sofort verwendet. Für die Immunopräzipitation wurden *Dynabeads* Protein G von Life Technologies verwendet, an die der Antikörper mit seinen spezifischen Zielproteinen bindet. Diese mussten zunächst blockiert werden. Dafür wurden 50 µl Beads in 300 µl RIPA-Puffer ohne SDS aufgenommen und mit 3 µl Lachssperma DNA (10 µg/µl) für 30 min auf dem Drehrad bei 4°C blockiert. Daraufhin wurde der alte RIPA-Puffer entfernt und die Beads in 270 µl frischem RIPA-Puffer ohne SDS aufgenommen und mit 30 µl 10x Roti-Block für 30 min auf dem Drehrad bei 4°C blockiert. Zum Schluss wurden die Beads in 300 µl frischem RIPA-Puffer mit 0,1% SDS aufgenommen und konnten verwendet werden. Für die Reaktion wurden 50 – 80 µl ChIP-Lysat mit 3 – 4 µg Antikörper, 4 µl 100x PI und 20 µl Beads zu einem Endvolumen von 400 µl mit RIPA-Puffer mit 0,1% SDS verdünnt. Als Negativkontrolle fungierte eine Probe mit Immunglobulin G (IgG). Die Proben wurden über Nacht bei 4°C auf dem Drehinkubator inkubiert. Eine *Input* Kontrolle ohne Beads und Antikörper wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden die Beads dreimal mit Waschpuffer für 10 min auf dem Drehinkubator gewaschen. Anschließend wurden die Beads in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und dreimal für 10 min mit finalem Waschpuffer auf dem Drehinkubator gewaschen. Durch die Waschschrte wird ungebundenes Chromatin entfernt. Die Beads, die nur noch spezifisch gebundene Proteine binden, wurden in 120 µl Elutionspuffer aufgenommen und für 30 min bei 30°C und 1000 rpm geschüttelt, um die DNA zu eluieren. Daraufhin wurden die Beads entfernt und der Überstand mit 5 µl Proteinase K versetzt und für 4 – 5 h bei 65°C und 700 rpm inkubiert, um den *Crosslink* aufzuheben. Dabei wurde die *Input* Probe mitgeführt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA mithilfe des ChIP DNA Clean & Concentrator Kit von Zymo Research nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 40 µl Elutionspuffer eluiert. Die DNA konnte anschließend bei 4°C für maximal eine Woche gelagert und für qRT-PCR Messungen verwendet werden. Die Proben wurden als Triplikate in weiße 96-*well* Platten von Kisker pipettiert (Tabelle 2. 23) und kurz herunterzentrifugiert. Die qRT-PCR Messungen wurden mit dem LightCycler 480 von Roche durchgeführt. Das PCR



Programm ist in Tabelle 2. 24 aufgeführt. Die verwendeten ChIP-Primer sind in Tabelle 2. 25 aufgelistet. Die %-Input Werte wurden mit den Ct-Werten der qRT-PCR mit der Formel  $\% \text{ Input} = 100 * 2^{(CT \text{ 100\% Input} - CT \text{ ChIP-IP})}$  berechnet.

ChIP-Lysepuffer: 50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), 1% Triton X-100, 0,1% Natrium Deoxycholate, 0,4% SDS, 100x PI (frisch)  
 RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8), 1% NP-40, 0,5% Natrium Deoxycholate, mit und ohne 0,1% SDS  
 Waschpuffer: 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA (pH 8), 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8)  
 Finaler Waschpuffer: 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA (pH 8), 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8)  
 Elutionspuffer: 1% SDS, 100 mM NaHCO<sub>3</sub>

**Tabelle 2. 23 Pipettierschema für eine Reaktion einer qRT-PCR mit ChIP-DNA.**

| Komponente                    | Menge   |
|-------------------------------|---------|
| SYBR Green                    | 12,5 µl |
| <i>Forward</i> Primer (10 µM) | 0,5 µl  |
| <i>Reverse</i> Primer (10 µM) | 0,5 µl  |
| RNase-freies Wasser           | 10,5 µl |
| ChIP-DNA                      | 1 µl    |

**Tabelle 2. 24 Übersicht über das verwendete qRT-PCR Programm bei einer ChIP-PCR mit dem LightCycler480 von Roche.**

| Programmschritt        | Temperatur | Zeit                         | Anmerkung                  |
|------------------------|------------|------------------------------|----------------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C       | 10 min                       |                            |
| Denaturierung          | 95°C       | 20 sek                       | 60 Zyklen                  |
| <i>Annealing</i>       | 58°C       | 20 sek                       |                            |
| Elongation             | 72°C       | 20 sek                       |                            |
| Messung                | 78°C       | 1 sek                        |                            |
| Schmelzkurvenmessung   | 60 - 95°C  | 0,11°C/sek<br>5 Messungen/°C | Kontinuierliche<br>Messung |

Tabelle 2. 25 Übersicht über die verwendeten ChIP-Primer in der qRT-PCR.

| Genname         | Primersequenz            | Schmelztemperatur |
|-----------------|--------------------------|-------------------|
| GAPDH-Exon 6 F  | GCCAAGGCTGTGGGCAAGGT     | 67,8°C            |
| GAPDH-Exon 6 R  | CCTCCGACGCCTGCTTCACC     | 67,1°C            |
| Chromosom 18 F  | ACTCCCCTTTCATGCTTCTG     | 65°C              |
| Chromosom 18 R  | GGTGTTAGAGGTCCCAGGAC     | 67°C              |
| Glykophorin A F | CAGGCGCTTAACAACCTTGCATCA | 63,7°C            |
| Glykophorin A R | CATACATCCTGAGATCATGAGCTG | 60°C              |
| MIR17HG myc F   | GAGTGGGGCTTGTCCGTATTT    | 59,8°C            |
| MIR17HG myc R   | CCTCGAAGGACCATGTGGGT     | 61,4°C            |
| MIR17HG-4000 F  | CCCAGCCCAGCTGTACTTTAC    | 59,4°C            |
| MIR17HG-4000 R  | CCCAGCCCAGCTGTACTTTAC    | 61,8°C            |
| MIR17HG-P1 F    | CGTACACGTTCGAGTCCCAGG    | 59°C              |
| MIR17HG-P1 R    | CACGCCCTCCGTTAACAAGC     | 59°C              |
| MIR17HG-P2 F    | CTAATGAGGGAGTGGGGCTT     | 59,4°C            |
| MIR17HG-P2 R    | CGAAGGACCATGTGGGTGAAT    | 59,8°C            |
| MIR17HG-P3 F    | AAGATGGTGGCGGCTACTCC     | 61°C              |
| MIR17HG-P3 R    | ACACAACAGGTTTCCCTCCGT    | 60°C              |
| MIR17HG-P4 F    | TTGCAGCCACGAGGTCTTGA     | 59°C              |
| MIR17HG-P4 R    | AGCAGCAATCACCGACTCCA     | 59°C              |

Tabelle 2. 26 Übersicht über die im ChIP-Assay verwendeten Antikörper.

| Name           | Ursprungsorganismus | Mono-/ Polyclonal | Konzentration | Hersteller                     |
|----------------|---------------------|-------------------|---------------|--------------------------------|
| TAL1 (GAT)     | Kaninchen           | polyclonal        | 4 µg          | OriGene (BioCat) (TA590662-OR) |
| E47 (TCF3/E2A) | Kaninchen           | polyclonal        | 4 µg          | Abcam (ab11176)                |
| E2A (TCF3)     | Kaninchen           | polyclonal        | 4 µg          | Abcam (ab228699)               |
| H3             | Kaninchen           | polyclonal        | 3 µg          | Abcam (ab1791)                 |
| H3K4trime      | Maus                | monoclonal        | 3 µg          | Abcam (ab12209)                |

|                    |           |            |      |                         |
|--------------------|-----------|------------|------|-------------------------|
| H3K9ac             | Kaninchen | polyclonal | 3 µg | Abcam<br>(ab10812)      |
| Normal goat<br>IgG | Ziege     | -          | 3 µg | Santa Cruz<br>(sc-2028) |

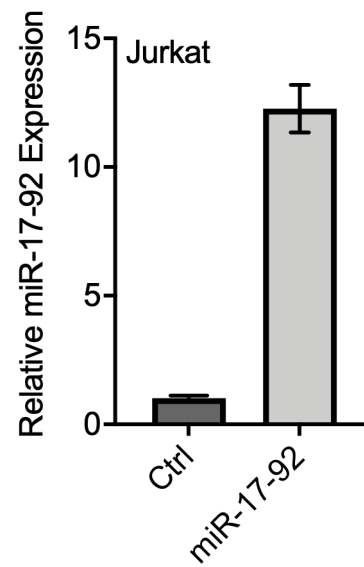
## 2.5 Auswertung

Alle Ergebnisse in den Abbildungen werden als Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Abbildungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.1 verbildlicht und statistisch analysiert. Die P-Werte wurden aus mindestens drei unabhängigen Messwerten mit dem Student's t-Test berechnet. Für die Quantifizierung der Western Blots wurde die Odyssey Software verwendet. Um Proteininteraktionen der in der Massenspektrometrie analysierten Proteine herauszufinden, wurde die bioinformatische Datenbank String verwendet. Potentielle microRNA Bindestellen auf der TAL1-3'-UTR wurden mithilfe des Webservers TargetScan identifiziert.

## 3 Ergebnisse

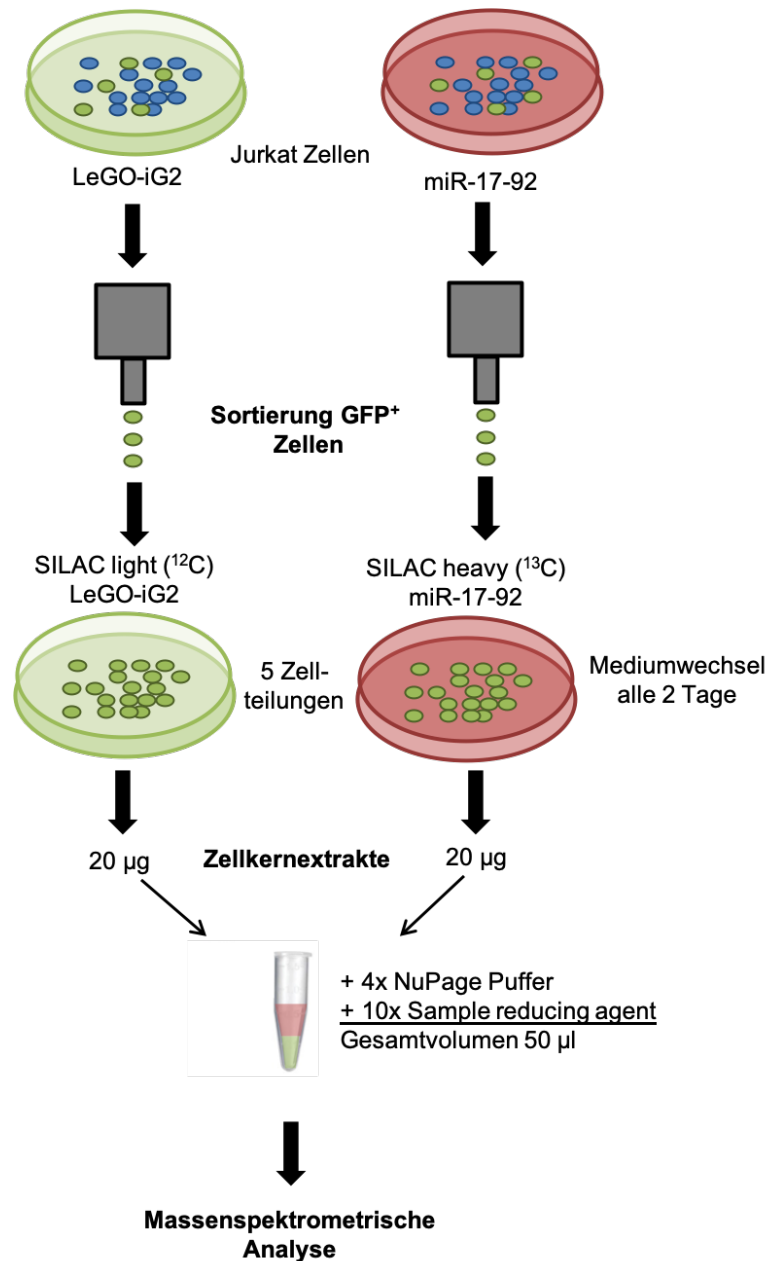
### 3.1 Identifikation von miR-17-92-Zielgenen

MiRNAs regulieren Genexpression, indem sie an die 3'-UTR ihres Zielgens binden und diese entweder direkt degradieren, oder die Translation der mRNA inhibieren (Bai et al. 2019). So können sie auch riesige regulatorische Netzwerke mit Transkriptionsfaktoren bilden, in denen die miRNAs die Expression der Transkriptionsfaktoren regulieren, und die Transkriptionsfaktoren die Expression der miRNAs kontrollieren. MiR-17-92 ist eines der meist erforschten miRNA Cluster und ist insbesondere für seine onkogene Rolle in vielen Tumorarten bekannt. Allerdings übernimmt es auch unverzichtbare Funktionen in der embryonalen Entwicklung und der Hämatopoese. Welche Zielgene miR-17-92 insbesondere während der hämatopoetischen Entwicklung hat und inwieweit das miRNA Cluster regulatorische Schleifen mit möglichen Transkriptionsfaktoren ausbildet, ist bisher wenig erforscht. Um herauszufinden, welche hämatopoetischen Zielgene miR-17-92 bindet, wurde auf SILAC basierende Massenspektrometrie angewandt. Dazu wurde in der T-ALL Zelllinie Jurkat das miRNA Cluster oder der Leervektor LeGO-iG2 als Kontrolle überexprimiert. Die positiv transduzierten Zellen, die GFP exprimierten, wurden mithilfe von Durchflusszytometrie sortiert. Die Effizienz der miR-17-92 Überexpression wurde durch qRT-PCR Messung bestimmt und ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Anschließend wurden die Kontrollzellen in SILAC-Medium, welches mit leichten Isotopen markiert ist (*light*), und die miR-17-92 überexprimierenden Zellen in SILAC-Medium mit schweren Isotopen (*heavy*) für mindestens fünf Zellteilungen (14 Tage) kultiviert. Die SILAC markierten Zellen wurden zu Zellkernlysaten verarbeitet. Anschließend wurden die miR-17-92 exprimierenden Zellen mit den Kontrollzellen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und zur Massenspektrometrie geschickt (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.1. Überprüfung der miR-17-92 Expression mittels qRT-PCR.**

Die Expression von miR-17-92 wurde nach erfolgreicher Transduktion und durchflusszytometrischer Sortierung mittels qRT-PCR überprüft. (n=3)

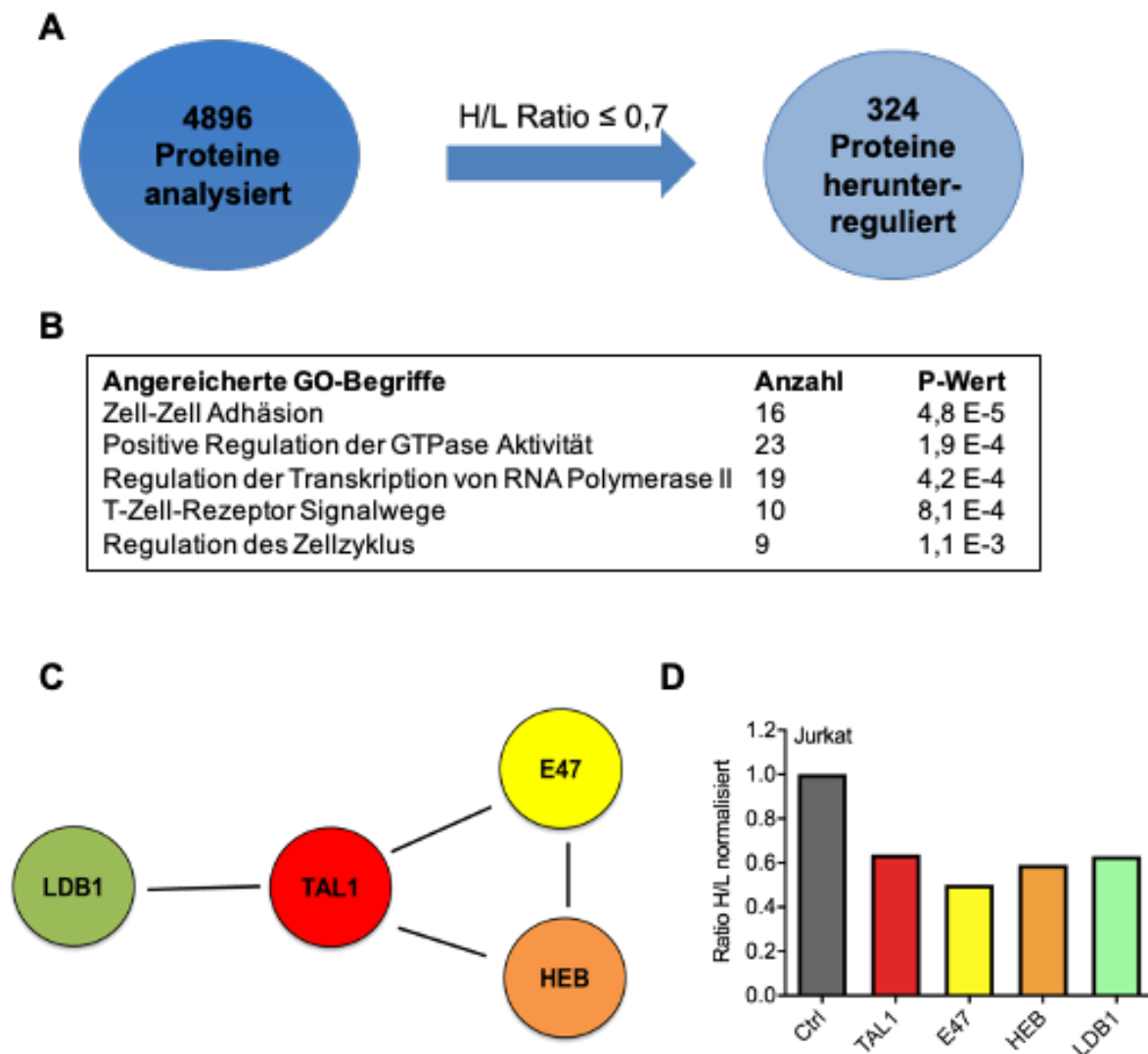


**Abbildung 3.2. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der SILAC-basierten Massenspektrometrie zur Identifikation von miR-17-92 *Downstream* Zielproteinen.**

Jurkat-Zellen wurden mit miR-17-92 oder dem Leervektor LeGO-iG2 transduziert und mittels durchflusszytometrischer Sortierung anhand des GFP Signals sortiert. Die positiv transduzierten Zellen wurden in SILAC-Medium aufgenommen und für fünf Zellteilungen kultiviert. Dabei wurden die Kontrollzellen in light SILAC-Medium aufgenommen, das leichte Aminosäuren mit 12 Neutrons am Kohlenstoffatom des Arginins besitzt, und die miR-17-92 exprimierenden Zellen in heavy SILAC-Medium, welches schwere Aminosäuren mit 13 Neutrons am Kohlenstoffatom des Arginins besitzt. Nach fünf Zellteilungen sind alle Peptide mit den entsprechenden Aminosäuren markiert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Anschließend wurden 20  $\mu\text{g}$  von jeder Probe in einem Reaktionsgefäß vereinigt und mit 4x NuPage Puffer und 10x Sample reducing agent in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  zur Massenspektrometrie geschickt. Mit dieser Methode konnte die Expression verschiedener Proteine anhand der unterschiedlichen Masse durch das SILAC-Medium zwischen den beiden Proben verglichen werden.

Die massenspektrometrische Analyse wurde im Labor von Thomas Öllerich, Frankfurt am Main, durchgeführt.

In der Massenspektrometrie wurden insgesamt 4896 Proteine analysiert. Näher betrachtet wurden dabei nur die 324 Proteine, die mindestens um einen Faktor von 0,7 im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle herunterreguliert vorlagen (Abbildung 3.3 A), da diese Proteine eine hohe Wahrscheinlichkeit hatten, direkte Ziele von miR-17-92 zu sein. Um herauszufinden, in welche biologischen Prozesse die veränderten Proteine involviert sind, wurde eine Gen-Ontologie-Analyse (*GO-term*) durchgeführt (Abbildung 3.3 B). Gen-Ontologie bezeichnet eine internationale Bioinformatik-Initiative, die es ermöglicht, biologische Daten übersichtlich darzustellen. Die daraus resultierende Ontologie-Datenbank wird mittlerweile weltweit von vielen biologischen Datenbanken genutzt und fortwährend weiterentwickelt. Die Analyse ergab, dass nach miR-17-92 Überexpression die meisten veränderten Proteine an Prozessen der Zell-Zell Adhäsion, der positiven Regulation der GTPase Aktivität, der Regulation der Transkription von RNA-Polymerase II, der T-Zell-Rezeptor Signalwege und der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Um die in der Massenspektrometrie identifizierten möglichen Zielproteine weiter zu kategorisieren, wurde eine weitere Analyse mit STRING durchgeführt. Dies ist eine biologische Datenbank, die Hinweise auf Proteininteraktionen gibt. Ihre Informationen sammelt sie aus anderen Datenbanken, Publikationen und experimentellen Daten. STRING offenbarte, dass sich unter den analysierten Proteinen unter anderem der hämatopoetische Transkriptionsfaktor TAL1 finden lässt zusammen mit seinen Interaktionspartnern E47, HEB und LDB1. Dies lässt darauf schließen, dass miR-17-92 möglicherweise eine regulatorische miRNA des transkriptionellen TAL1-Komplexes ist (Abbildung 3.3 C). Diese Proteine, die in Interaktion miteinander stehen, lagen in der Massenspektrometrie alle um etwa einen Faktor vor 0,6 herunterreguliert vor (Abbildung 3.3 D). TAL1 bildet bekanntlich Heterodimere mit den E-Proteinen E47 und HEB aus, was dem Komplex eine höhere Stabilität verleiht (H. L. Hsu et al. 1994). Darüber hinaus bindet LDB1 zusammen mit LMO2 während der erythroiden Differenzierung an den TAL1/E2A-Komplex (Wadman et al. 1997) wodurch die Expression von spezifischen terminalen erythroiden Genen aktiviert wird (Z. Xu et al. 2003; Lahlil et al. 2004).



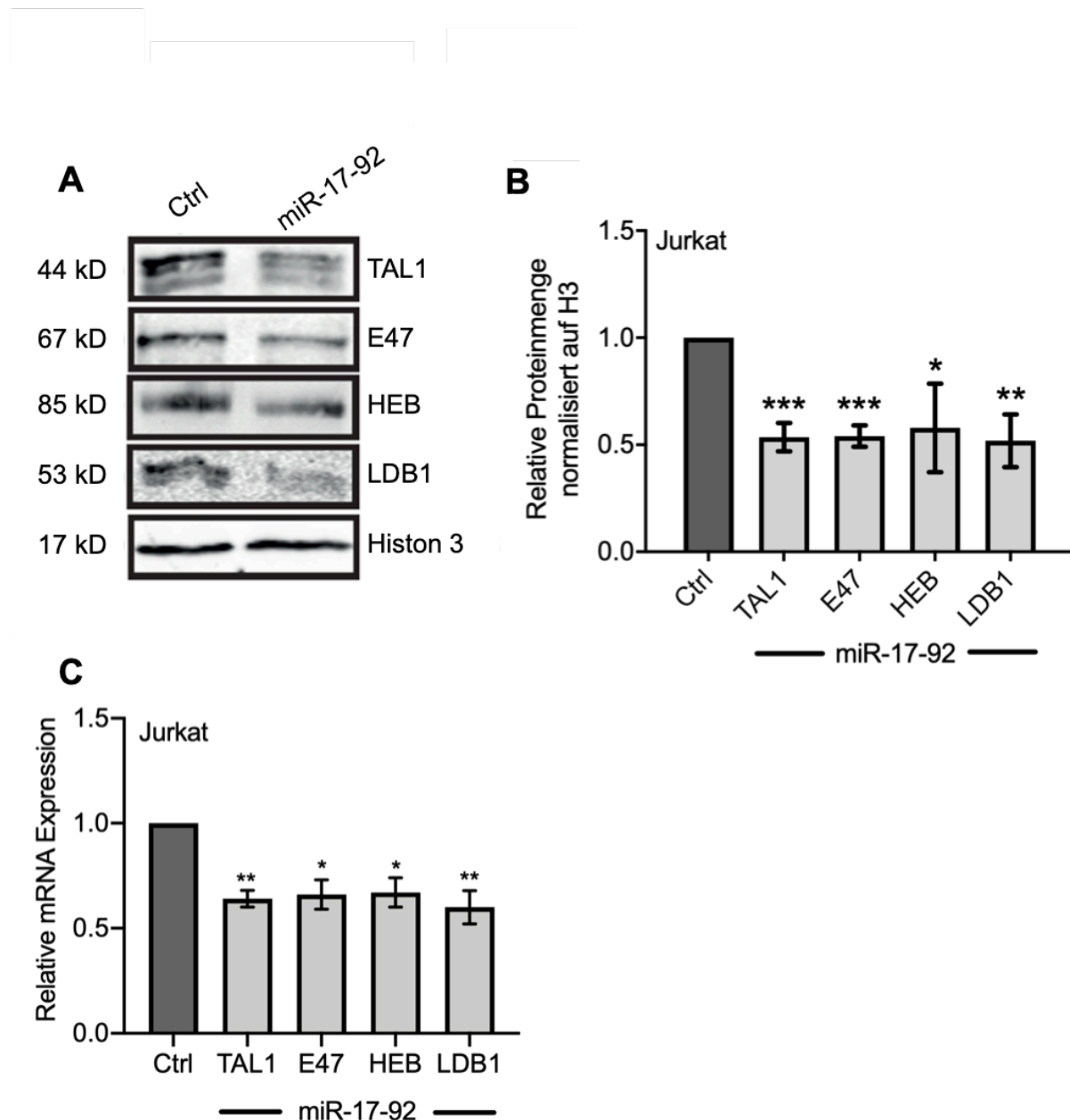
**Abbildung 3.3. Identifikation von miR-17-92 Zielproteinen mithilfe von SILAC-basierter Massenspektrometrie.**

(A) Insgesamt 4896 Proteine wurden mithilfe der Massenspektrometrie analysiert. Davon wurden nur die 324 Proteine näher betrachtet, die um eine H/L Ratio von mindestens 0,7 herunterreguliert waren. (B) Die 324 herunterregulierten Proteine wurden mit der GO-Term Analyse genauer beobachtet. (C) Die STRING Analyse ergab, dass das gesamte Interaktionsnetzwerk um TAL1, bestehend aus den E-Proteinen E47 und HEB sowie LDB1, herunterreguliert vorlag. (D) Graphische Darstellung der durch STRING identifizierten herunterregulierten Proteine TAL1, E47, HEB und LDB1. Diese Faktoren waren im Vergleich zur Kontrolle um eine H/L Ratio von mindestens 0,6 herunterreguliert. Die Werte wurden gebildet aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.

Um dieses Interaktionsnetzwerk weiter zu untersuchen und um die Ergebnisse der Massenspektrometrie zu verifizieren, wurden Jurkat-Zellen ohne SILAC Bedingungen mit miR-17-92 und dem Kontrollvektor transduziert. Anschließend wurden die Proteinlevel von TAL1 und seinen Interaktionspartnern im Western Blot überprüft. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie konnten bestätigt werden. In der Western Blot Analyse lagen TAL1, E47, HEB und LDB1 nach miR-17-92 Überexpression



herunterreguliert vor (Abbildung 3.4 A). Histon 3 diente als Ladekontrolle. Auch die Quantifizierung des Western Blots mit der Odyssey Software zeigte signifikant reduzierte Proteinlevel durch miR-17-92 Überexpression (Abbildung 3.4 B). Darüber hinaus konnte eine signifikant reduzierte Menge an mRNA von *TAL1*, *E47*, *HEB* und *LDB1* detektiert werden (Abbildung 3.4 C).



**Abbildung 3.4. Überexpression von miR-17-92 in Jurkat-Zellen führte zur Reduktion des mRNA und Proteinlevels von TAL1 und seinen Interaktionspartnern.**

(A) Jurkat-Zellen wurden ohne SILAC-Medium mit miR-17-92 und dem Leervektor LeGO-iG2 transduziert und sortiert. Die Western Blot Analyse zeigte eine Abnahme des Proteinlevels von TAL1, E47, HEB und LDB1 nach miR-17-92 Überexpression. Histon 3 diente als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung des Western Blots mithilfe des Odyssey Systems. (C) qRT-PCR zeigte auch eine Reduktion des mRNA Levels der untersuchten Faktoren. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001. (n=3)

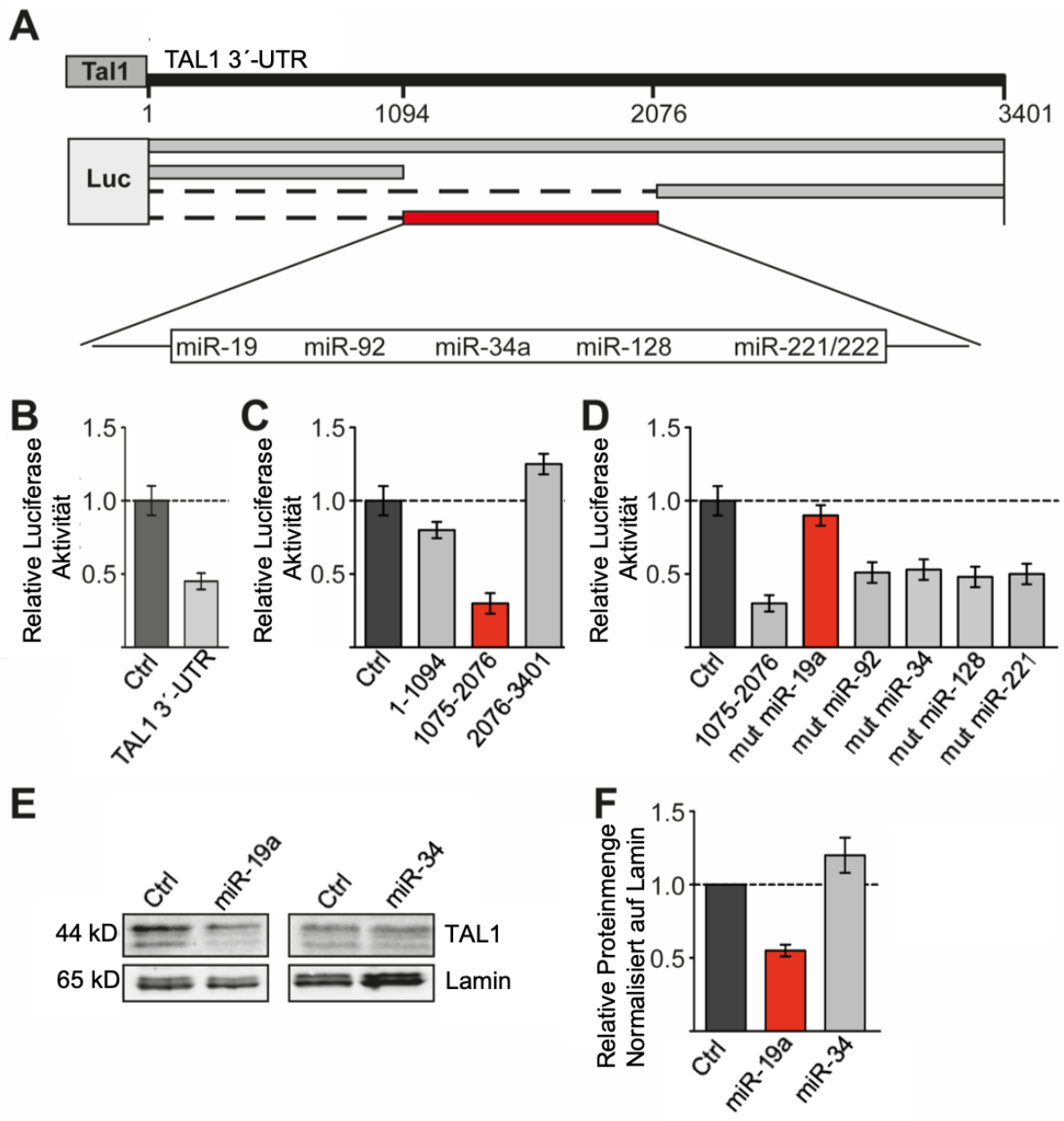
### 3.2 *TAL1* ist ein direktes Zielgen von miR-17-92 und wird von miR-19 reprimiert

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4 zeigen, scheint miR-17-92 einen reprimierenden Einfluss auf *TAL1*, *E47*, *HEB* und *LDB1* zu nehmen. Ob diese Faktoren nun direkte Zielgene von miR-17-92 sind, oder über sekundäre Effekte beeinflusst werden, kann zunächst nicht gesagt werden. Daher wurde eine Analyse mit TargetScan durchgeführt. TargetScan ist ein Webserver, der miRNA Bindestellen auf der mRNA bestimmter Zielgene vorhersagt, indem er nach Sequenzen sucht, die komplementär zur *Seed*-Sequenz der miRNAs sind. Interessanterweise konnte auf der 3'-UTR von *TAL1* eine Vielzahl von potentiellen miRNA Bindestellen gefunden werden, unter anderem auch Bindestellen für miRNAs des miR-17-92 Clusters. *HEB*, *E47* und *LDB1* hingegen, wiesen keine Bindestellen für miRNAs des miR-17-92 Clusters auf. Dies deutet darauf hin, dass *TAL1* möglicherweise direkt von miR-17-92 beeinflusst wird, während die reprimierenden Effekte von *E47*, *HEB* und *LDB1* indirekt durch *TAL1* verursacht sein könnten.

Um die posttranskriptionelle Regulation von *TAL1* genauer zu analysieren, wurde die 3'-UTR von *TAL1* in einem Luciferase-Reportergen-Assay untersucht. Dazu wurde die gesamte *TAL1*-3'-UTR mit einer Länge von 3401 Basenpaaren in den pMirTarget Vektor hinter das Luciferasegen kloniert (Abbildung 3.5 A). Zusätzlich wurden drei Deletionskonstrukte von Position 1 - 1094, 1075 - 2076 und 2076 - 3401 hergestellt. Da sich Jurkat-Zellen sehr schlecht transfizieren lassen, wurde dieses Experiment in K562-Zellen durchgeführt.

Im Luciferase-Assay zeigte die Volllänge der *TAL1*-3'-UTR eine etwa 50%ige Reduktion der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (Abbildung 3.5 B). Daraufhin wurde der Luciferase-Assay mit den Deletionskonstrukten wiederholt (Abbildung 3.5 C). Das vordere Fragment von Position 1-1094 sowie das hintere Fragment von Position 2076-3401 zeigten keinen Unterschied zur Kontrolle. Das mittlere Fragment jedoch von Position 1075-2076, welches unter anderem auch potentielle Bindestellen für miR-19 und miR-92 enthält, wies eine deutliche Verringerung der Luciferase-Aktivität auf. Entsprechend lag die Vermutung nahe, dass in diesem mittleren Bereich der *TAL1*-3'-UTR miRNAs binden, die zur Repression der Genexpression führen. Folglich wurden in einem nächsten Schritt die potentiellen Bindestellen der in Abbildung 3.5 A aufgeführten miRNAs mutiert, sodass diese nicht mehr binden können, da ihre *Seed*-Sequenz nicht mehr komplementär zur mutierten Bindestelle ist. Während der inhibitorische Effekt auf die Luciferase-Aktivität bei einer Mutation der miR-92a, miR-34, miR-128 und miR-221/222 Bindestelle bestehen blieb, wurde die Repression durch die Mutation der miR-19 Bindestelle komplett aufgehoben (Abbildung 3.5 D). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass miR-19 tatsächlich im mittleren Bereich der *TAL1*-3'-UTR bindet und einen inhibitorischen Effekt auf die Genaktivität ausübt. Um diese Theorie weiter zu verifizieren, wurde miR-19

beziehungsweise eine miR-blank Kontrolle in K562-Zellen überexprimiert und ein Western Blot mit einem gegen TAL1 gerichteten Antikörper ausgeführt. In Abbildung 3.5 E ist dargestellt, dass TAL1 nach miR-19 Überexpression deutlich abnimmt im Vergleich zur miR-blank Kontrolle. Dieser Effekt ist nach Überexpression von miR-34a, eine andere miRNA, die eine potentielle Bindestelle im mittleren Fragment der TAL1-3'-UTR aufweist, nicht zu sehen. Durch Normalisierung auf die Lamin-Bande zeigt die Quantifizierung des Western Blots den Effekt noch einmal deutlich (Abbildung 3.5 F).



**Abbildung 3.5. TAL1 ist ein direktes Zielgen von miR-17-92.**

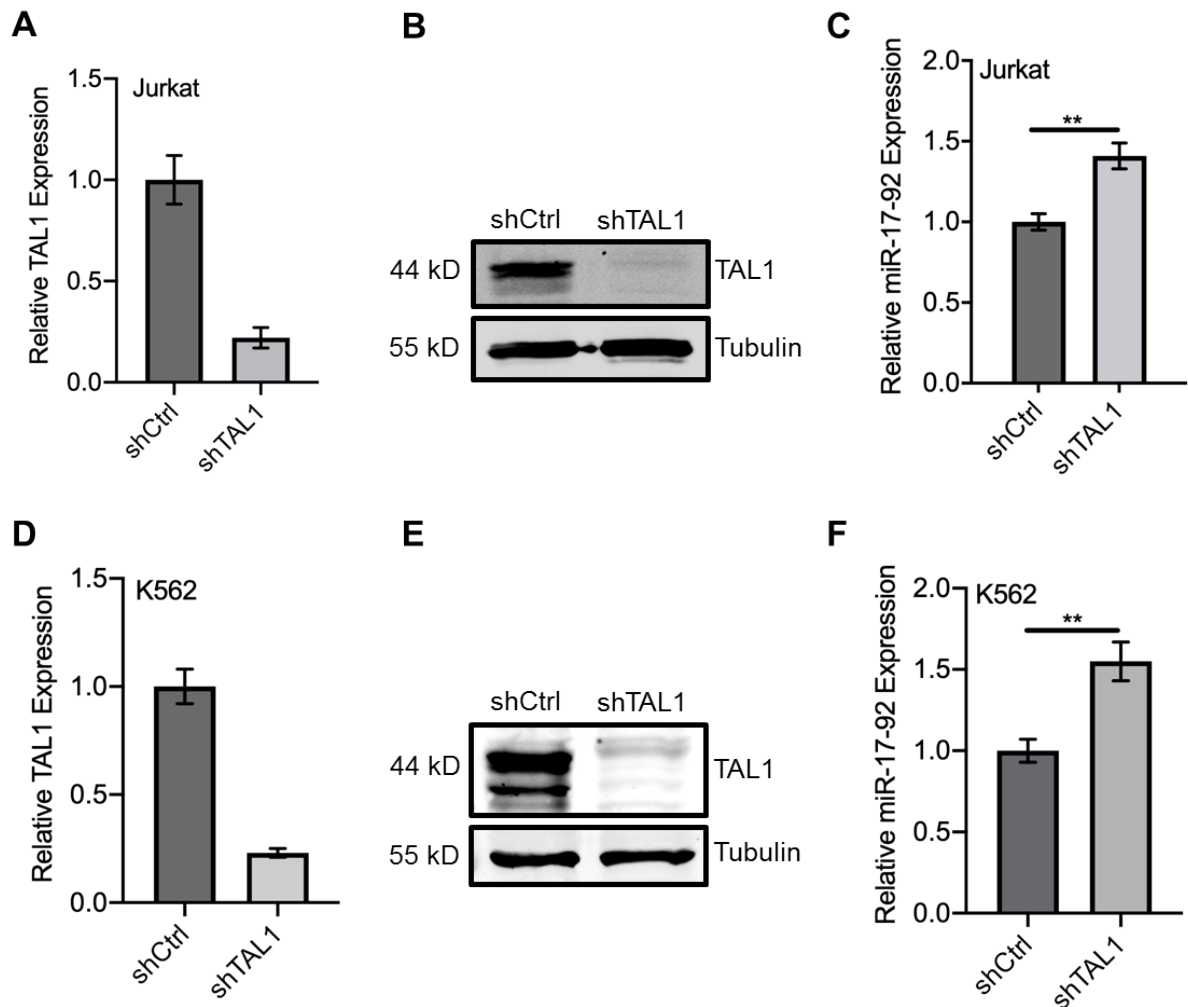
(A) Schematische Darstellung der 3'-UTR von TAL1. Diese wurde in den pMirTarget Vektor hinter das Luciferase-Reportergen kloniert. Anschließend wurde die 3'-UTR in drei Fragmente von Position 1 - 1094, 1075 - 2076 und 2076 - 3401 unterteilt und ebenfalls hinter das Luciferase-Reportergen kloniert. Im Bereich des mittleren Fragments (rot dargestellt) lassen sich laut TargetScan die gezeigten

miRNA Bindestellen finden. (B) Im Luciferase-Assay mit K562-Zellen zeigte die Volllänge der TAL1-3'-UTR eine etwa 50%ige Reduktion der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle. (C) Das mittlere Fragment zeigte eine signifikant verringerte Luciferase-Aktivität (rot dargestellt). (D) Die miRNA Bindestellen auf der TAL1-3'-UTR wurden mutiert. Die Mutation der Bindestelle für miR-19 hob den reprimierenden Effekt auf. (E) MiR-19 wurde in K562-Zellen überexprimiert. Eine Western Blot Analyse zeigte, dass TAL1 nach miR-19 Überexpression herunterreguliert vorliegt. Dieser Effekt konnte für miR-34a nicht beobachtet werden. Lamin diente als Ladekontrolle. (F) Quantifizierung des Western Blots. (n=3)

Diese Experimente wurden von Julia Ringleb und Stefanie Herkt im Georg-Speyer Haus in Frankfurt am Main durchgeführt.

### 3.3 TAL1 und miR-17-92 regulieren sich gegenseitig

Wie die Ergebnisse aus Abbildung 3.5 bestätigten, binden einzelne miRNAs aus dem miR-17-92 Cluster auf dem Transkriptionsfaktor TAL1 und inhibieren diesen. Um herauszufinden, ob zwischen miR-17-92 und TAL1 eine Art regulatorische Schleife besteht, wie sie zwischen miRNAs und Transkriptionsfaktoren häufiger beschrieben sind, wurde analysiert, ob mit einer Veränderung der TAL1 Expression auch eine Veränderung der miR-17-92 Expression eintritt. Dazu wurde TAL1 in Jurkat- und K562-Zellen mittels shRNA herunterreguliert. Die *Knockdown*-Effizienz in Jurkat-Zellen wurde fünf Tage nach Transduktion in der qRT-PCR überprüft und ergab eine Reduktion der *TAL1*-mRNA um etwa 80% (Abbildung 3.6 A). Abbildung 3.6 B zeigt, dass auch das Proteinsignal von TAL1 im Western Blot deutlich verringert ist. Interessanterweise stieg die miR-17-92 Expression nach TAL1 *Knockdown* in Jurkat-Zellen um einen Faktor von 0,4 (Abbildung 3.6 C). Ähnliches konnte in K562-Zellen beobachtet werden. Nach Transduktion mit einer gegen TAL1 gerichteten shRNA konnte eine TAL1 Reduktion von etwa 80% erzielt werden (Abbildung 3.6 D). Auch die Proteinexpression ist bis auf ein Minimum herunterreguliert (Abbildung 3.6 E). Die miR-17-92 Expression konnte nach TAL1 *Knockdown* in K562-Zellen sogar um 55% ansteigen (Abbildung 3.6 F). Daraus lässt sich schließen, dass TAL1 und miR-17-92 sich gegenseitig inhibitorisch regulieren und möglicherweise eine regulatorische Schleife bilden.



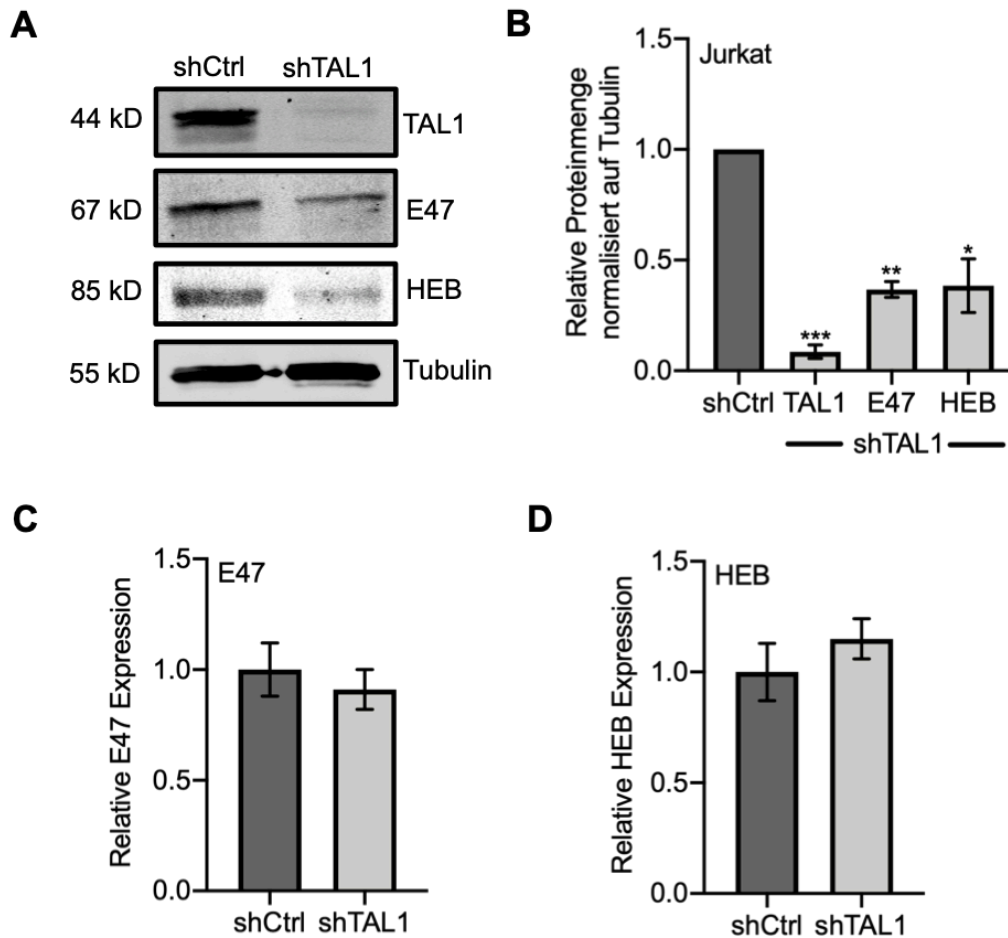
**Abbildung 3.6. Ein *Knockdown* von TAL1 in Jurkat- und K562-Zellen führte zu einer Erhöhung der miR-17-92-mRNA Expression.**

Jurkat- sowie K562-Zellen wurden mittels lentiviralem Gentransfer mit einer gegen TAL1 gerichteten shRNA sowie mit einer gegen das *lacZ*-Gen gerichteten Kontroll-shRNA transduziert. (A) Vier Tage nach Transduktion wurde die *Knockdown*-Effizienz durch qRT-PCR auf mRNA Level kontrolliert. (B) Es wurden Zellkernlysate hergestellt und der *Knockdown* mithilfe eines TAL1 Antikörpers überprüft. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen Tubulin verwendet. (C) Die miR-17-92 Expression nach TAL1 *Knockdown* wurde durch qRT-PCR überprüft. (D) Die *Knockdown*-Effizienz von TAL1 in K562-Zellen wurde vier Tage nach Transduktion durch qRT-PCR ermittelt. (E) Der *Knockdown* wurde auf Proteinebene mittels Western Blot mit einem TAL1 Antikörper und einem Tubulin Antikörper als Ladekontrolle bestätigt. (F) Die miR-17-92 Expression nach TAL1 *Knockdown* in K562-Zellen wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001. (n=3)

### 3.4 TAL1 *Knockdown* führt zur Destabilisierung der E-Proteine

Die Massenspektrometrie (Abbildung 3.3) zeigte, dass durch miR-17-92 Überexpression nicht nur TAL1 herunterreguliert wird, sondern auch seine Heterodimerisierungspartner E47 und HEB. Allerdings konnten nur auf der *TAL1*-mRNA Bindestellen für miRNAs des miR-17-92 Clusters gefunden werden, nicht jedoch auf *E47* oder *HEB*. Daraus lässt sich schließen, dass *TAL1* ein direktes Zielgen von miR-17-92 ist, die Veränderungen, die E47 und HEB durchlaufen jedoch sekundären Effekten geschuldet sein könnten. Entsprechend wurde das Verhalten von E47 und HEB nach *TAL1 Knockdown* in Jurkat-Zellen untersucht, um herauszufinden, inwiefern TAL1 Einfluss auf die Expression seiner Bindungspartner nimmt. In Abbildung 3.7 A ist deutlich erkennbar, dass nach Herunterregulation von TAL1 nicht nur das TAL1 Protein stark reduziert ist, sondern auch E47 und HEB signifikant weniger werden. Die Quantifizierung erfolgte durch Normalisierung gegen die Ladekontrolle Tubulin und bestätigte, dass eine signifikante Veränderung des Proteinlevels verglichen mit den Kontrollzellen vorliegt (Abbildung 3.7 B). Interessanterweise konnte bei näherer Betrachtung des *E47*- und *HEB*-mRNA Levels in der qRT-PCR keine Veränderung nach *TAL1 Knockdown* festgestellt werden (Abbildung 3.7 C-D).

Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass nicht nur der reduzierte E47 und HEB Proteingehalt durch den *TAL1 Knockdown* verursacht wurde, sondern auch die Proteinverminderung, wie sie nach miR-17-92 Überexpression beobachtet werden konnte, zumindest teilweise durch die Inhibition von TAL1 hervorgerufen wird. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine Heterodimerisierung von TAL1 mit einem E-Protein bevorzugt eingegangen wird und eine höhere Stabilität aufweist, als ein Homodimer (H. L. Hsu et al. 1994). Folglich scheint der Verlust von TAL1 zu einer verstärkten Proteindegradation bei E47 und HEB zu führen.



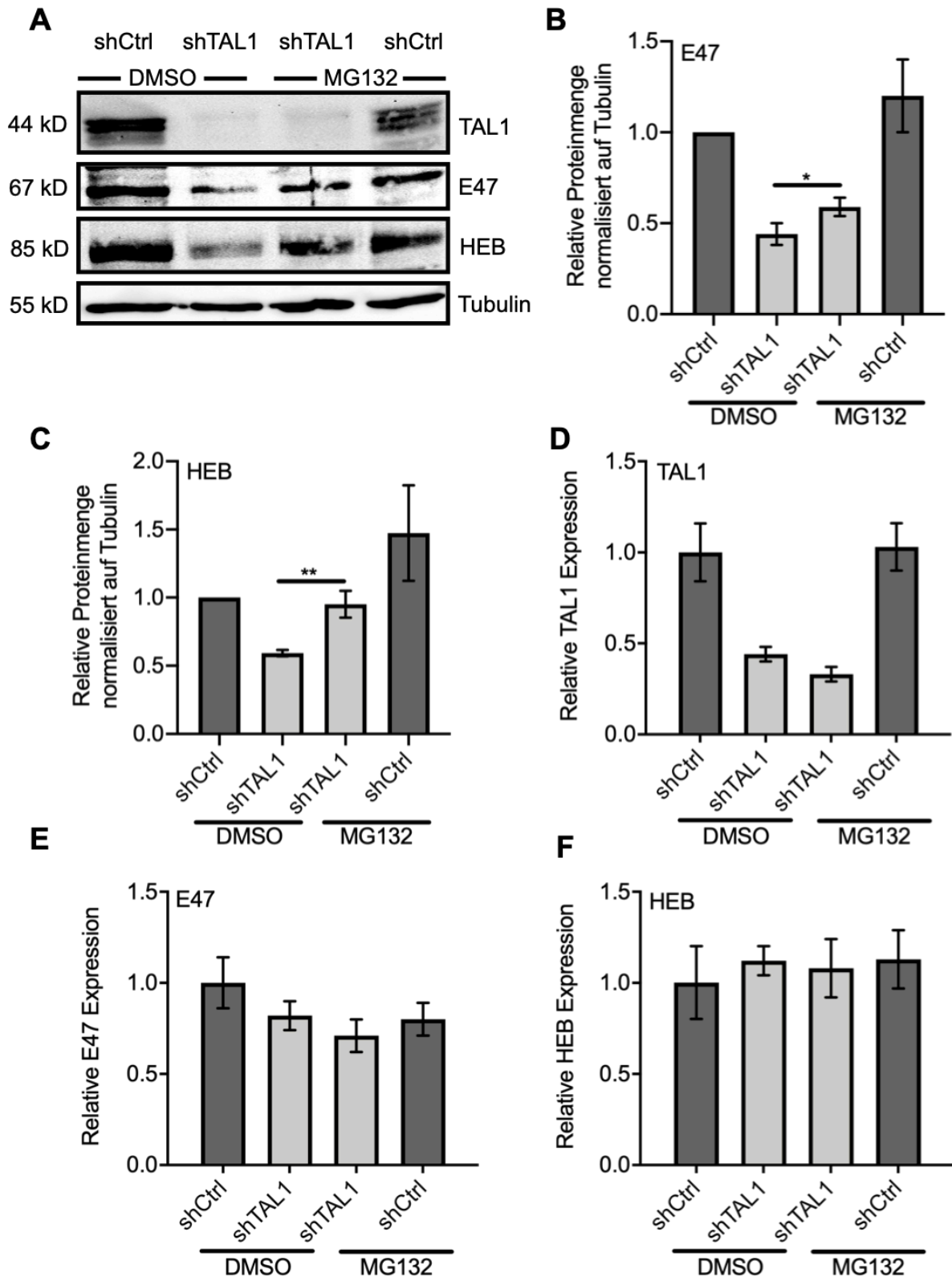
**Abbildung 3.7. Knockdown von TAL1 führt zu einer Reduktion des Proteinlevels der Bindungspartner.**

Jurkat-Zellen wurden durch lentiviralen Gentransfer mit einer gegen TAL1 gerichteten shRNA und einer shControl (shCtrl) transduziert. (A) Eine Western Blot Analyse zeigte, dass neben TAL1 die E-Proteine E47 und HEB, die die STRING Analyse als Interaktionspartner von TAL1 identifiziert hat, herunterreguliert werden. Tubulin fungierte als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse mithilfe der Odyssey Software. (C) Die qRT-PCR ergab, dass die *E47*-mRNA unverändert bleibt nach TAL1 *Knockdown*. (D) qRT-PCR ergab, dass die *HEB*-mRNA unverändert bleibt nach TAL1 *Knockdown*. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001. (n=3)

Um näher zu analysieren, ob ein *Knockdown* von TAL1 tatsächlich die Proteinstabilität von E47 und HEB beeinträchtigt, wurden die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Dieser Inhibitor verhindert die Proteasom-Aktivität und somit die Degradation von Proteinen. Die Jurkat-Zellen wurden eine Woche nach Transduktion für acht Stunden mit 1  $\mu$ M MG132 oder als Kontrolle mit DMSO behandelt und anschließend geerntet um RNA zu extrahieren und Zellkernlysate herzustellen. Der *Knockdown* von TAL1 blieb sowohl auf Protein- (Abbildung 3.8 A) als auch auf mRNA-Ebene (Abbildung 3.8 D) unangetastet nach MG132 Behandlung. Die Proteinmenge von E47 und HEB stieg jedoch signifikant an durch die Proteasom-Inhibitor-Zugabe

(Abbildung 3.8 A-C). Abbildung 3.8 E-F veranschaulichen noch einmal, dass die mRNA von *E47* und *HEB* wie schon zuvor in Abbildung 3.7 C-D gezeigt, ohne Veränderung vorliegt. Der zu beobachtende Proteinabbau von *E47* und *HEB* nach *TAL1 Knockdown* scheint also in der Tat lediglich die Proteinebene zu betreffen und aus einer Destabilisierung wegen dem Verlust der E-Proteine von *TAL1* zu resultieren.





**Abbildung 3.8. Der Proteasom-Inhibitor MG132 verhindert den E-Proteinabbau nach TAL1 Knockdown.**

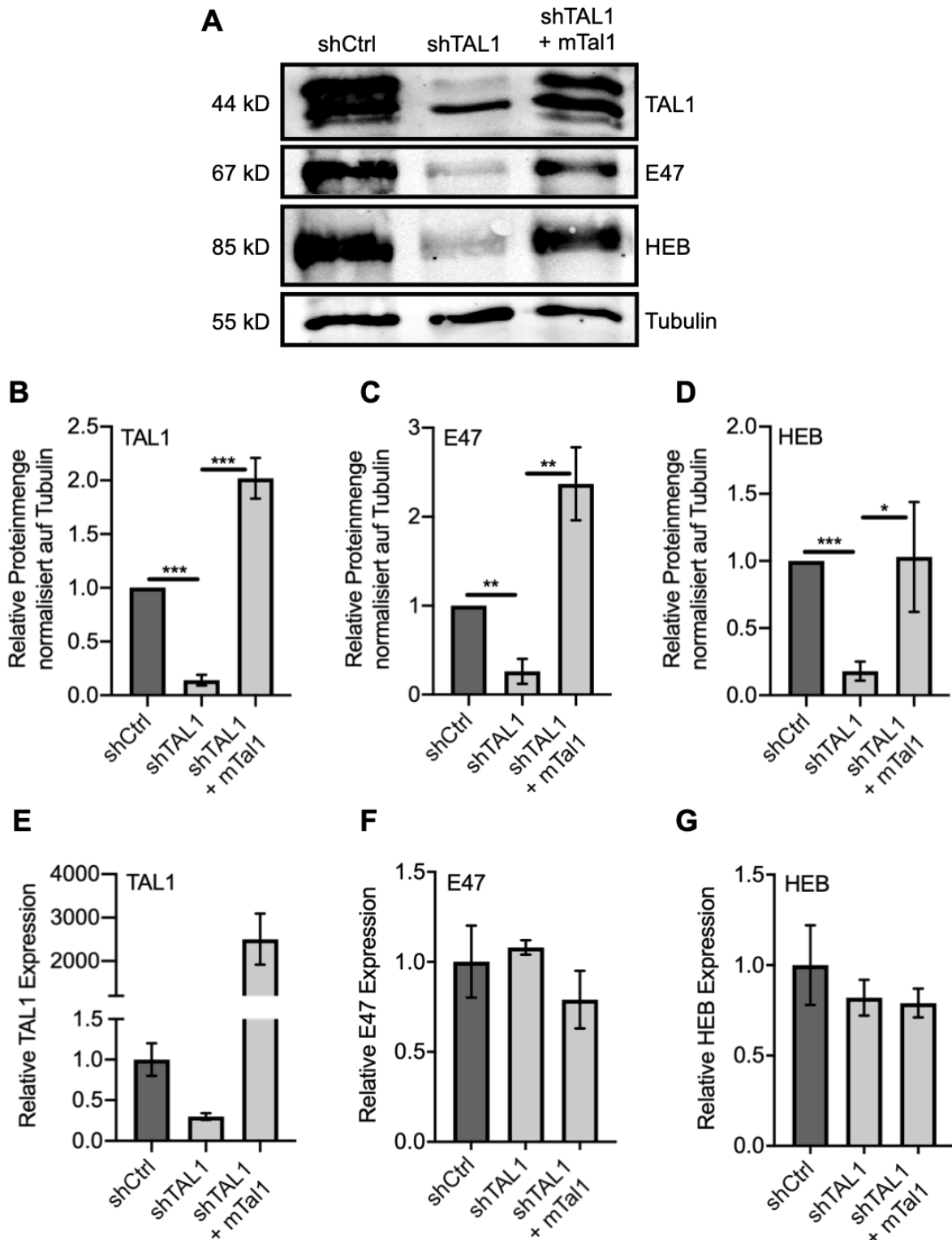
Jurkat-Zellen wurden mit einer shRNA gegen TAL1 und einer Kontroll-shRNA transduziert und eine Woche später für acht Stunden mit 1  $\mu$ M MG132 beziehungsweise DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und zu Zellkernlysaten verarbeitet, beziehungsweise die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. (A) Western Blot Analyse der mit DMSO oder MG132 behandelten Zellen mit

Antikörpern gegen TAL1, E47 und HEB. Tubulin fungierte als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der E47-Bande des Western Blots normalisiert auf Tubulin. (C) Quantifizierung der HEB-Bande des Western Blots normalisiert auf Tubulin. (D) Überprüfung der TAL1 *Knockdown* Stabilität nach der DMSO und MG132 Behandlung mittels qRT PCR. (E) Überprüfung des *E47*-mRNA Levels nach Behandlung mit MG132 und DMSO. (F) Überprüfung des *HEB*-mRNA Levels nach Behandlung mit MG132 und DMSO. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001. (n=3)

In einem weiteren Ansatz wurden die TAL1 *Knockdown* Zellen zusätzlich mit murinem Tal1 transduziert, um zu untersuchen, ob TAL1 der ausschlaggebende Faktor für die Proteinstabilisierung ist, und der Proteinabbau durch murine Tal1 Überexpression rückgängig gemacht werden kann. Zuvor wurde sichergestellt, dass die shRNA, die das humane TAL1 bindet, keine Bindekapazität für die murine *Tal1* mRNA aufweist. Das Protein ist jedoch in beiden Systemen nahezu identisch.

Sowohl die Western Blot Analyse (Abbildung 3.9 A-B) als auch die Messung der *TAL1*-mRNA (Abbildung 3.9 E) bestätigten eine erfolgreiche Transduktion der Jurkat-Zellen. Wie in Abbildung 3.9 A deutlich zu erkennen ist, führte die Überexpression von murinem Tal1 zu einer Neubildung des Proteins von E47 und HEB. Dieser signifikante Effekt wurde zur Verifizierung noch einmal durch Normalisierung auf die Ladekontrolle Tubulin quantifiziert und graphisch dargestellt (Abbildung 3.9 C-D). Wie bereits in den vorherigen Experimenten gezeigt, konnte auch dieses Mal keine Veränderung der *E47*- und *HEB*-mRNA festgestellt werden (Abbildung 3.9 F-G).

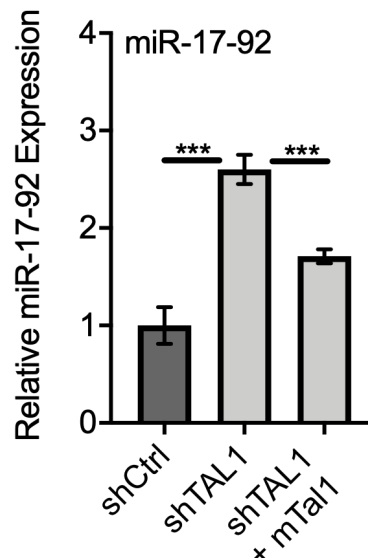
Darüber hinaus wurde die miR-17-92 Expression mittels qRT-PCR nach muriner Tal1 Überexpression in den Jurkat-Zellen gemessen. Es zeigte sich, dass wie bereits in vorherigen Daten gezeigt (Abbildung 3.6 C), der *Knockdown* von TAL1 zu einer signifikanten Aktivierung der *miR-17-92*-mRNA führt (Abbildung 3.10). Die darauffolgende Überexpression von murinem Tal1 verringerte die miR-17-92 Expression jedoch wieder deutlich. Diese Beobachtungen unterstützen erneut die Vermutung, dass miR-17-92 und TAL1 in einer regulatorischen Schleife in Interaktion miteinander stehen und sich gegenseitig inhibieren.



**Abbildung 3.9. Durch Überexpression von murinem Tal1 kann der inhibitorische Effekt des TAL1 *Knockdowns* auf E47 und HEB aufgehoben werden.**

Nachdem TAL1 mithilfe einer shRNA herunterreguliert wurde, wurde murines Tal1 in die Zellen eingebracht. Doppelt positiv transduzierte Zellen wurden entsprechend ihrer GFP/ Tomato Expression sortiert und wieder in Kultur genommen. (A) Es wurden Zellkernlysate hergestellt und ein Western Blot mit einem TAL1 Antikörper, der sowohl humanes als auch murines Tal1 detektiert, durchgeführt. Zusätzlich wurden Antikörper gegen E47 und HEB verwendet. Tubulin fungierte als Ladekontrolle. (B)

Quantifizierung der TAL1 Proteinmenge normalisiert auf Tubulin. (C) Quantifizierung der E47 Proteinmenge normalisiert auf Tubulin. (D) Quantifizierung der HEB Proteinmenge normalisiert auf Tubulin. (E) Darüber hinaus wurde die RNA der Zellen isoliert. Die Überprüfung der *TAL1*-mRNA Expression mittels qRT-PCR bestätigte sowohl den *TAL1 Knockdown* als auch die Überexpression mit murinem Tal1. (F) Überprüfung der *E47*-mRNA Expression mittels qRT-PCR. (G) Überprüfung der *HEB*-mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001. (n=3)

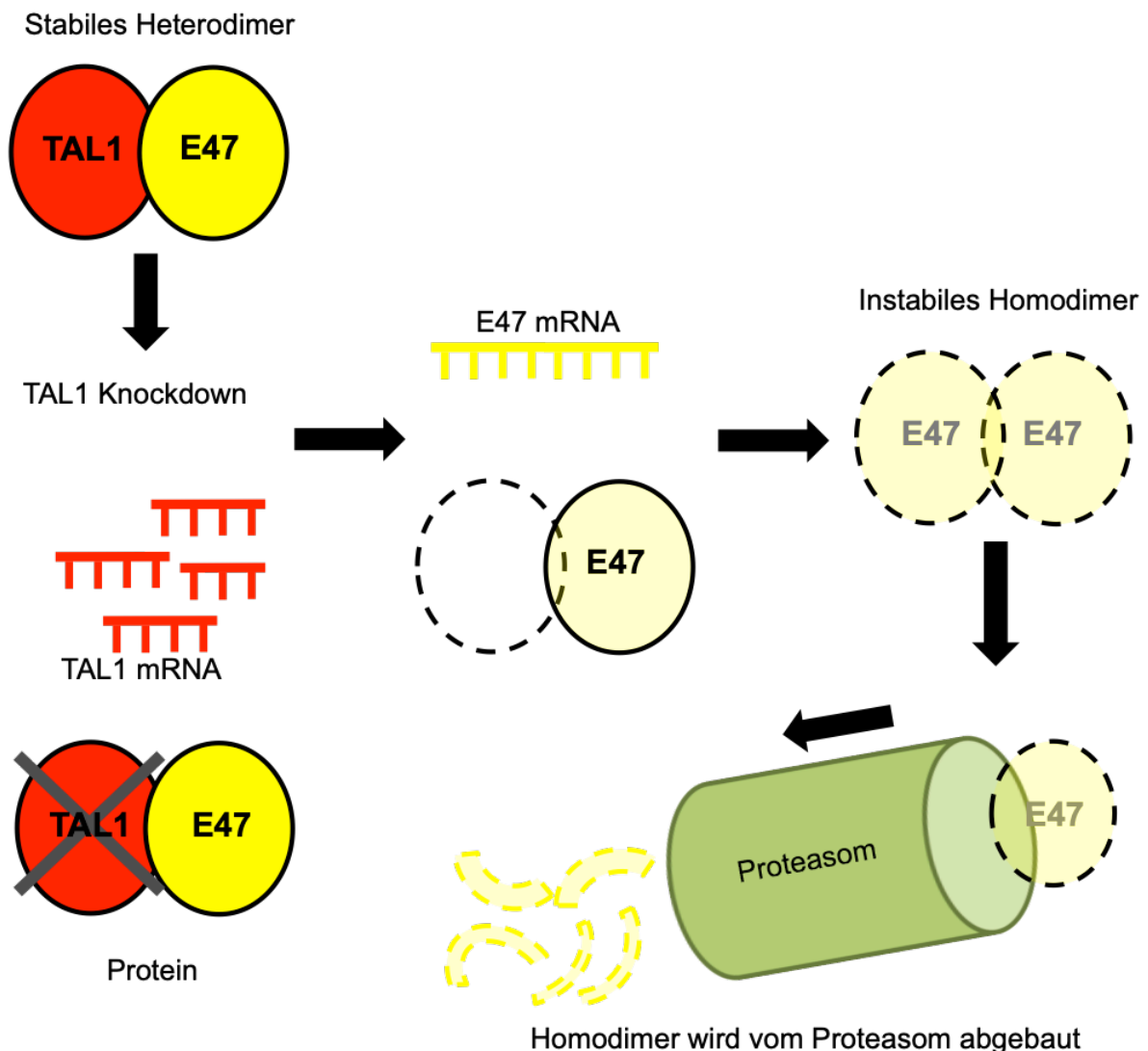


**Abbildung 3.10. TAL1 inhibiert *miR-17-92*-mRNA Expression.**

Jurkat-Zellen wurden mit einer shRNA gegen TAL1 transduziert und anschließend zusätzlich mit muriner Tal1 cDNA überexprimiert. Die *miR-17-92*-mRNA Expression stieg nach *TAL1 Knockdown* (Abbildung 3.6 C). Dieser Effekt konnte durch die Überexpression von murinem Tal1 aufgehoben werden. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001. (n=3)

Zur besseren Visualisierung ist der hypothetische Ablauf der E-Protein Destabilisierung nach *TAL1 Knockdown* in Abbildung 3.11 noch einmal schematisch dargestellt. TAL1 selbst kann nicht allein an seine Erkennungssequenz, CANNTG, an die DNA binden. Es benötigt die Bildung eines Dimers. Dabei geht es bevorzugt eine Heterodimerisierung mit einem E-Protein, wie E12, E47, E2-2 oder HEB ein. Da der Fokus der Experimente in dieser Arbeit auf die Interaktion von TAL1 mit E47 und HEB liegt, ist die schematische Darstellung exemplarisch mit E47 dargestellt. Das Heterodimer bestehend aus TAL1 und E47, kann effizient an die E-Box an der DNA binden. Nachdem ein *Knockdown* von TAL1 herbeigeführt wurde, ist die *TAL1*-mRNA degradiert. Folglich kann kein TAL1 Protein translatiert werden. Die mRNA von *E47* bleibt jedoch vom *TAL1 Knockdown* unangetastet wie in Abbildung 3.7 C dargestellt, und das Protein kann gebildet werden. Allerdings hat das E47 Protein mit TAL1 seinen Bindungspartner verloren und muss infolgedessen ein Homodimer mit sich selbst

eingehen, da es einen Dimerisierungspartner braucht. Das Homodimer ist aber offensichtlich relativ instabil und wird vom Proteasom-Komplex abgebaut, was durch das geringe Proteinsignal im Western Blot (Abbildung 3.7 A) verdeutlicht wird.



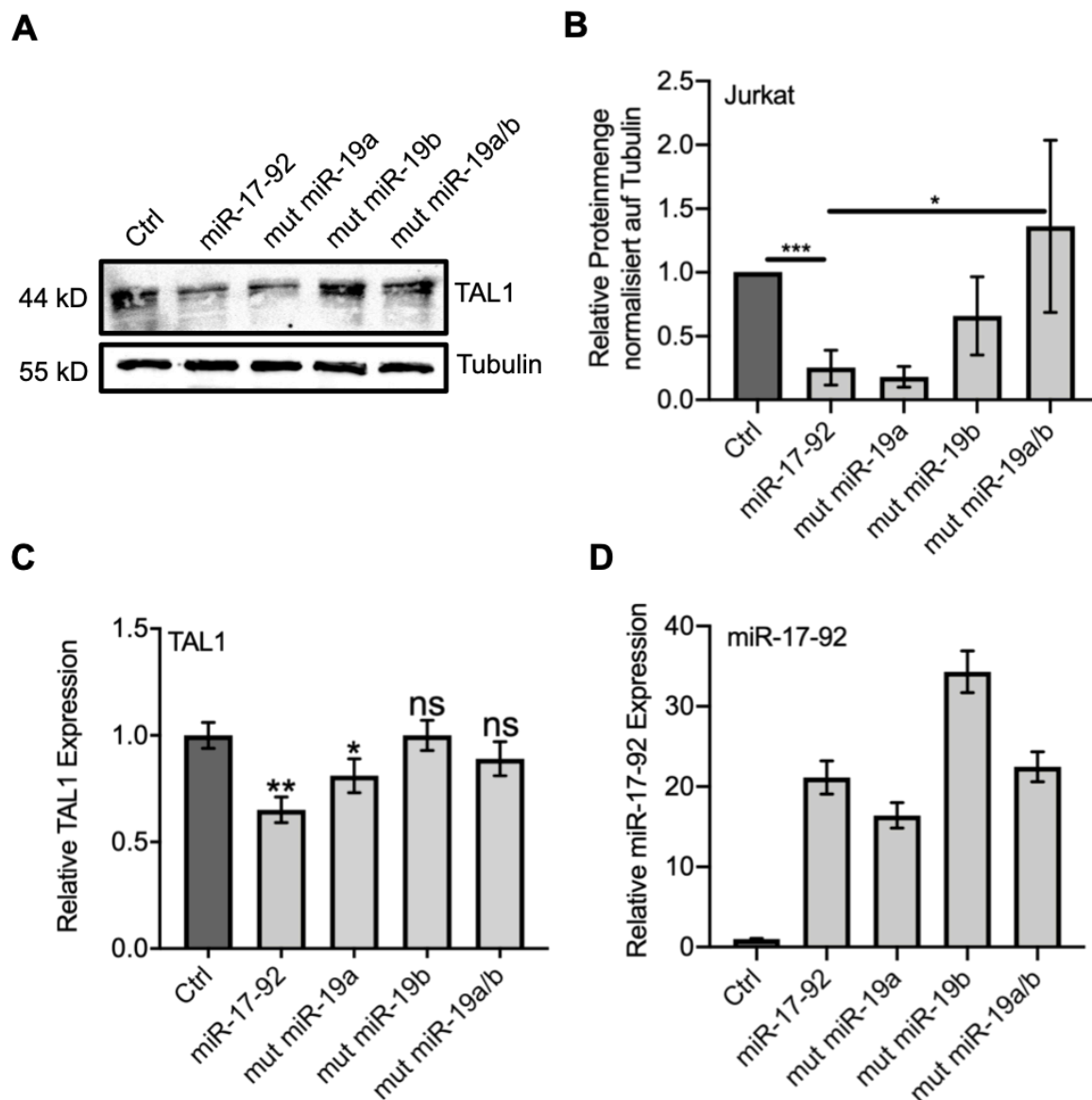
**Abbildung 3.11. Hypothetische Darstellung der E-Protein Destabilisierung nach TAL1 Knockdown.**

Der hypothetische Ablauf der E-Protein Destabilisierung nach TAL1 *Knockdown* ist beispielhaft mit E47 dargestellt. Der gleiche Ablauf gilt auch für HEB. TAL1 und E47 bilden ein stabiles Heterodimer. Nach TAL1 *Knockdown* wird keine *TAL1*-mRNA und folglich auch kein Protein mehr gebildet. Die *E47*-mRNA bleibt aber unberührt. Das Protein von E47 würde folglich ohne Dimerisierungspartner sein. Da E-Proteine aber einen Bindungspartner brauchen, bildet E47 in der Hypothese ein Homodimer mit sich selbst oder HEB. Dieser scheint nicht so stabil zu sein, wie das Heterodimer mit TAL1, der von dem Komplex favorisiert wird. Folglich kommt es zu einer Proteindegradation durch den Proteasom-Komplex. Wird dieser Proteasom-Komplex durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 inhibiert, bleibt das Protein des E47 Homodimers bestehen.

### 3.5 MiR-19 spielt eine essentielle Rolle während der Inhibition von TAL1 durch miR-17-92

Aus dem unreifen miR-17-92 Cluster gehen sechs reife miRNAs hervor, die alle unterschiedliche Zielgene haben und entsprechend unterschiedliche Funktionen ausüben. So konnte bereits demonstriert werden, dass miR-92a im Mausmodell zu einem erythroleukämischen Phänotyp führt, während miR-19a als Lymphom-induzierender Faktor identifiziert werden konnte (Yanmei Li et al. 2012). MiR-17 hingegen inhibiert die onkogene Aktivität von miR-92a und reguliert Tumorsuppressorgene wie p53 (Yanmei Li et al. 2012). In der Analyse der TAL1-3'-UTR mithilfe des Luciferase-Reportergen-Assays wurde ersichtlich, dass miR-19 eine entscheidende Rolle bei der Inhibition von TAL1 durch miR-17-92 einnimmt (Abbildung 3.5 D). MiR-19a und miR-19b unterscheiden sich in ihrer Sequenz in nur einem Nukleotid und haben die gleiche *Seed*-Sequenz. Folglich haben sie möglicherweise auch viele gleiche Zielgene. Um die Rolle von miR-19 im Zusammenhang mit TAL1 näher zu untersuchen, wurde die *Seed*-Sequenz von miR-19a beziehungsweise miR-19b mutiert. Darüber hinaus wurde eine Doppelmutante hergestellt, die eine Mutation beider *Seed*-Sequenzen enthielt. Jurkat-Zellen wurden erneut mit miR-17-92, aber auch mit den neu generierten Mutanten transduziert. In Abbildung 3.12 A wird zunächst die Reduktion des TAL1 Proteins durch miR-17-92 im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle ersichtlich, wie es bereits in vorherigen Daten gezeigt werden konnte (Abbildung 3.4 A). Bei Überexpression der miR-19a Mutante bleibt dieser Effekt zunächst bestehen. Wurde jedoch miR-19b beziehungsweise die miR-19a/b Doppelmutante überexprimiert, ließ sich ein Anstieg des TAL1 Proteinsignals verzeichnen. Die Quantifizierung mit Normalisierung auf die Tubulin-Bande bestätigte einen signifikanten Anstieg von TAL1 zwischen miR-17-92 und mut miR-19a/b exprimierenden Jurkat-Zellen (Abbildung 3.12 B). Auch auf mRNA Ebene zeigten die Zellen mit miR-19b und miR-19a/b Mutation keinen Unterschied mehr in ihrer *TAL1* Expression im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle, während die Inhibition bei miR-17-92 und der miR-19a Mutante signifikant blieb (Abbildung 3.12 C). Abbildung 3.12 D bestätigt eine erfolgreiche Transduktion der Zellen anhand einer 20-30-fachen miR-17-92 Expression in allen transduzierten Proben.

Wie bereits die Ergebnisse der miR-19 Überexpression in K562-Zellen, die zu einem verminderten TAL1 Signal führte (Abbildung 3.5 E), zeigten, unterstützen auch diese Daten die Theorie, dass miR-19 die entscheidende miRNA des miR-17-92 Cluster ist, die einen reprimierenden Effekt auf TAL1 ausübt. Interessanterweise zeigte miR-19a in diesem Experiment in Jurkat-Zellen keinen Effekt auf TAL1, wobei ihre Zielgene aufgrund der identischen *Seed*-Sequenz mit denen der miR-19b übereinstimmen sollten.

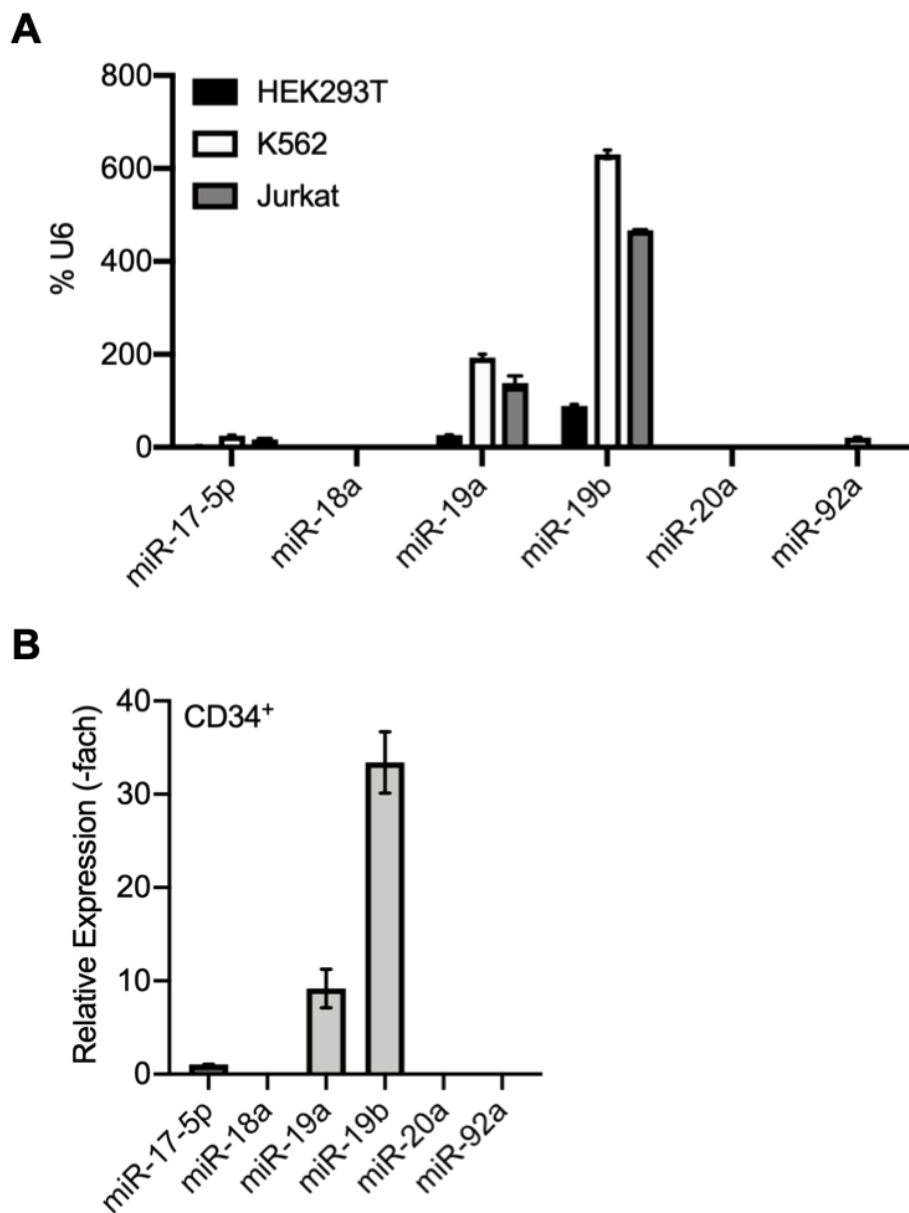


**Abbildung 3.12. Der inhibitorische Effekt von miR-17-92 auf TAL1 kann durch Mutation der miR-19 Seed-Sequenzen aufgehoben werden.**

Jurkat-Zellen wurden mit miR-17-92 und einem Kontrollvektor transduziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit miR-17-92 Konstrukten transduziert, bei denen zuvor entweder die *Seed*-Sequenz der miR-19a, der miR-19b oder beider miRNAs mutiert wurden. Positiv transduzierte Jurkat-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert. (A) Western Blot Analyse mit einem gegen TAL1 gerichteten Antikörper. Tubulin fungierte als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der Western Blot Analyse. (C) *TAL1*-mRNA Expression nach miR-17-92 Überexpression beziehungsweise der jeweiligen Mutanten von miR-17-92. (D) Überprüfung der *miR-17-92*-mRNA Expression in den jeweiligen Proben mittels qRT-PCR. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001; ns=nicht signifikant. (n=3)

Um einen Überblick über das Expressionslevel der verschiedenen reifen miRNAs des miR-17-92 Clusters zu bekommen, wurde das miR-17-92 Cluster *Real-Time* PCR Assay Kit von Signosis verwendet. Dieses ermöglicht eine Detektion aller reifen miR-

17-92 miRNAs in einer bestimmten Probe. Der Assay offenbarte, dass miR-19b deutlich stärker in HEK293T-, K562-, Jurkat- (Abbildung 3.13 A) und humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen (Abbildung 3.13 B) exprimiert ist als miR-19a, welches etwa ein Drittel des miR-19b Expressionslevels erreicht. Im Vergleich zu miR-17-5p, miR-18a, miR-20a und miR-92a, die gar nicht oder nur in sehr geringem Maße detektiert werden konnten, stellen miR-19a und miR-19b die mit Abstand größte Gruppe des Clusters dar. Diese Daten könnten erklären, warum nur die Mutation der miR-19b *Seed*-Sequenz, jedoch nicht die der miR-19a einen Unterschied auf die TAL1 Expression im Vergleich zu miR-17-92 zeigt (Abbildung 3.12). Als interne Kontrolle wird U6 verwendet, eine nicht kodierende kleine nukleäre RNA (*small nuclear RNA* (snRNA)), die zusammen mit anderen Proteinen den Spliceosom-Komplex bildet.





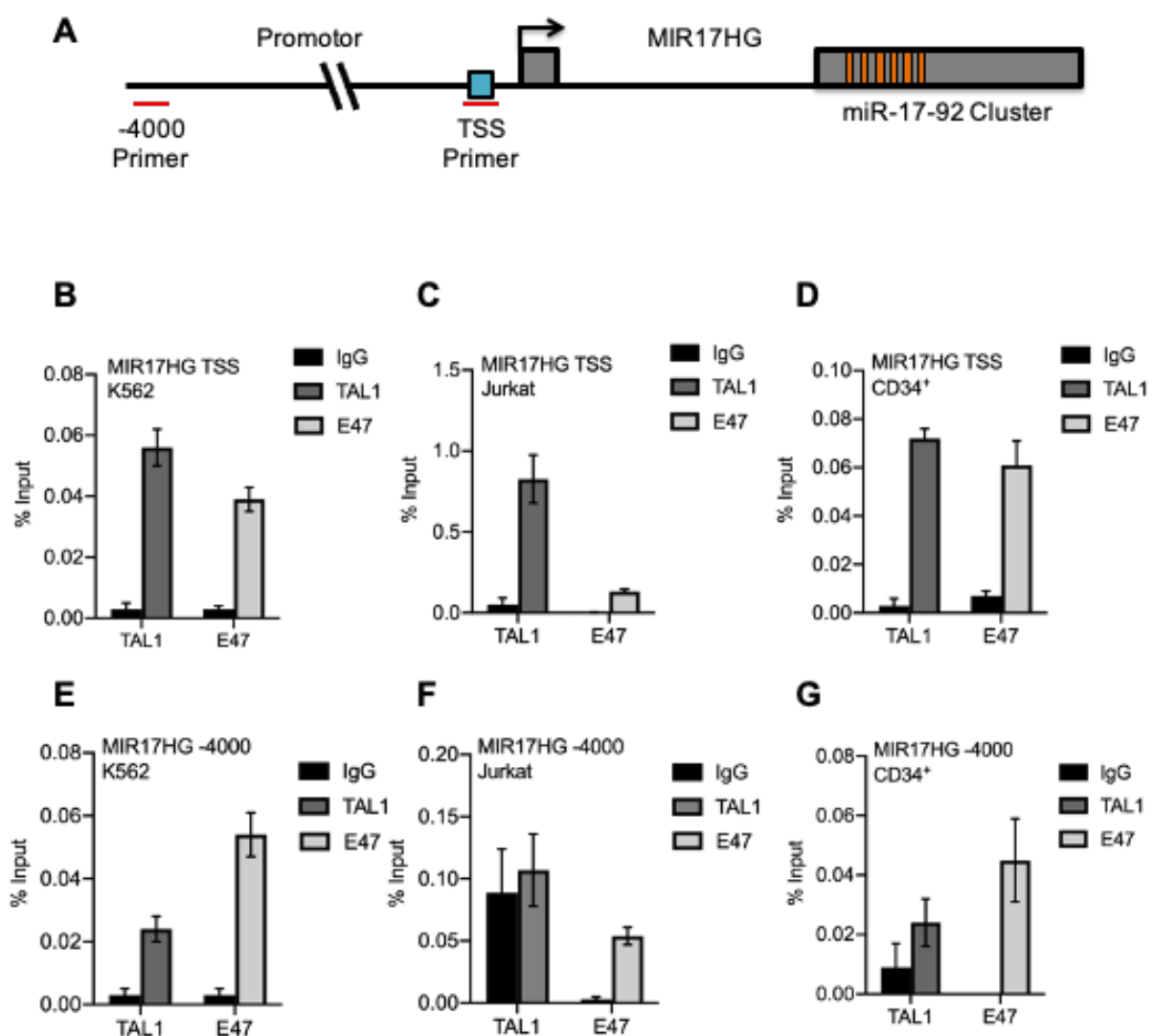
**Abbildung 3.13. MiR-19a und miR-19b sind die am stärksten exprimierten miRNAs des miR-17-92 Cluster in den analysierten Zellen.**

Das miR-17-92 Cluster *Real-Time* PCR Assay Kit von Signosis ermöglichte es, das Expressionslevel der verschiedenen reifen miRNAs, die von miR-17-92 exprimiert werden, zu bestimmen. (A) Die Expression von miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a und miR-92a in HEK293T-, K562- und Jurkat-Zellen ist gezeigt. Die Werte wurden normalisiert auf die prozentuale Expression von U6. (B) Die Expression von miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a und miR-92a in CD34<sup>+</sup>-Zellen ist gezeigt. Die Werte wurden auf die prozentuale Expression von U6 normalisiert und sind dargestellt als relative Expression (-fach) mit miR-17-5p = 1. (n=3)

### 3.6 TAL1 und E47 binden auf dem *MIR17HG*-Promotor

Nachdem gezeigt werden konnte, dass einzelne miRNAs des miR-17-92 Clusters die TAL1 Expression reprimieren (Abbildung 3.5) und darüber hinaus Daten generiert werden konnten, die darauf hinweisen, dass TAL1 ebenfalls miR-17-92 reguliert (Abbildung 3.10), sollte anschließend der Promotor des *MIR17HG*-Gens analysiert werden. In Abbildung 3.14 A ist der Promotor schematisch dargestellt. Die kleine graue Box zeigt das erste nicht kodierende Exon, während die große graue Box das zweite Exon darstellt, welches das miR-17-92 Cluster enthält, das für den unreifen Vorläufer der miR-17-92 kodiert (orange Balken). Kurz vor dem Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil) befindet sich eine E-Box mit der Sequenz CACATG (blaue Box). E-Boxen sind bekannte Binderegionen für E-Proteine wie TAL1 und E47. Daher wurde ein Primerpaar konzipiert, welches im Bereich dieser E-Box bindet (roter Balken, TSS). Darüber hinaus wurde als Kontrolle ein Primerpaar generiert, welches -4000 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstarts bindet (roter Balken, -4000). Mithilfe eines ChIP-Assays sollte herausgefunden werden, ob TAL1 und E47 im Bereich des Transkriptionsstartes von *MIR17HG* binden. Daher wurden ChIP-Lysate aus unbehandelten K562-, Jurkat- und CD34<sup>+</sup>-Zellen hergestellt. Es konnte in allen drei Zelllysaten sowohl TAL1-, als auch E47-Bindung kurz vor dem Transkriptionsstart detektiert werden (Abbildung 3.14 B-D), wobei in Jurkat-Zellen deutlich mehr TAL1-Bindung im Vergleich zu E47 beobachtet werden konnte sowie das insgesamt stärkste Bindungssignal mit 0,8% Input bei TAL1 beziehungsweise 0,2% Input bei E47 (Abbildung 3.14 C). In K562-Zellen konnte auch der -4000 Primer ein Signal für TAL1 und E47 detektieren (Abbildung 3.14 D), während in Jurkat-Zellen (Abbildung 3.14 E) und CD34<sup>+</sup>-Zellen (Abbildung 3.14 F) nur E47-Bindung beobachtet werden konnte. Diese Daten zeigen zunächst, dass der TAL1/E47-Komplex in verschiedenen Bereichen des *MIR17HG*-Promotors bindet. Da der TAL1/E47-Komplex abhängig von den Kofaktoren, die er rekrutiert, sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen während der Genexpression einnehmen kann (O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C 2004), sollte in einem weiteren Ansatz ermittelt werden, ob die Bereiche, in denen der Komplex auf *MIR17HG* bindet, aktive oder inaktive Regionen sind. Dies

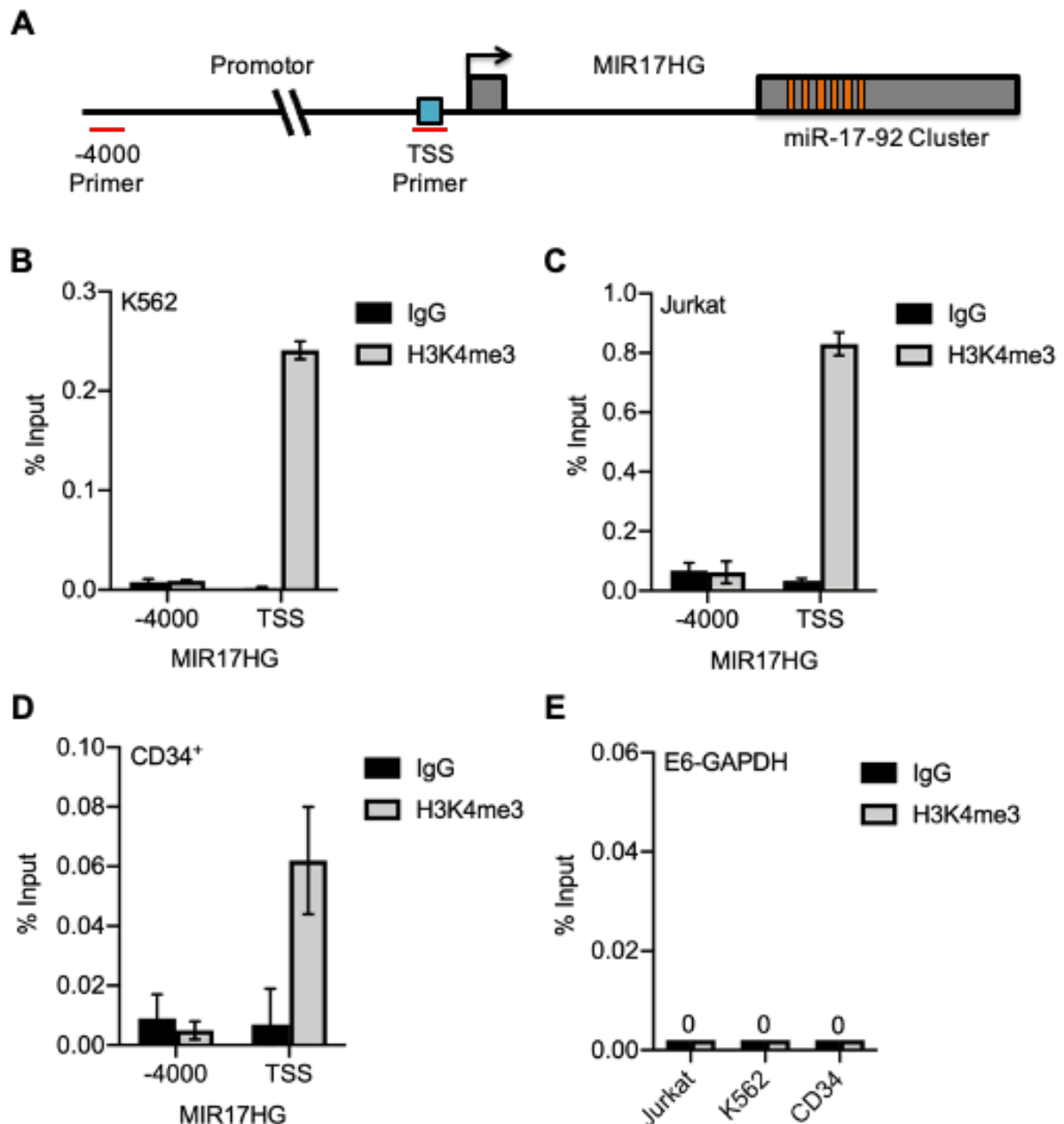
wurde durch Detektion von H3K4me3, eine Histonmodifikation, die aktive Histonbereiche markiert, durchgeführt. In Abbildung 3.15 A ist, wie bereits in Abbildung 3.14 A beschrieben, der Promotorbereich von *MIR17HG* abgebildet. In K562- (Abbildung 3.15 B), Jurkat- (Abbildung 3.15 C) und CD34<sup>+</sup>-Zellen (Abbildung 3.15 D) ist eine deutliche Erhöhung von H3K4me3 im Bereich des Transkriptionsstarts zu verzeichnen, während im *Upstream* Bereich (-4000) keinerlei H3K4me3 detektiert werden kann. Als Negativ-Kontrolle wurde H3K4me3 auf Exon6-GAPDH gemessen. Dort ist jedoch keinerlei Signal zu beobachten (Abbildung 3.15 E). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der TAL1/E47-Komplex zwar in verschiedenen Bereichen des *MIR17HG*-Promotors bindet, jedoch unterschiedliche Aktivität ausübt.



**Abbildung 3.14. Der TAL1/E47-Komplex bindet an den *MIR17HG*-Promotor.**

Die Bindung von TAL1 und E47 am *MIR17HG*-Promotor wurde mit zwei verschiedenen Primerpaaren ermittelt, die zum einen kurz vor dem Transkriptionsstart und zum anderen -4000 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstarts binden. (A) Schematische Darstellung des *MIR17HG*-Promotors, ein nicht-kodierendes Exon (kleine graue Box) und das zweite Exon (große graue Box), dass das miR-17-92 Cluster (orange) enthält. Vor dem Transkriptionsstart befindet sich eine E-Box mit der Sequenz

CANNTG (blaue Box). Die Position der ChIP-Primer wird durch die roten Balken dargestellt. (B-D) TAL1- und E47-Bindung auf dem *MIR17HG*-Promotor im Bereich des Transkriptionsstarts in (B) K562-, (C) Jurkat-, (D) CD34<sup>+</sup>-Zellen. (E) In K562-Zellen ist im *Upstream* Bereich des *MIR17HG*-Promotors TAL1- und E47-Bindung zu erkennen. (F) In Jurkat-Zellen konnte -4000 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstarts keine TAL1, aber E47-Bindung festgestellt werden. (G) CD34<sup>+</sup>-Zellen zeigen ein schwaches Signal für TAL1-Bindung, während ein wenig E47-Bindung -4000 Basenpaare *upstream* zu erkennen ist. (n=3)



**Abbildung 3.15. Der Bereich des Transkriptionsstarts des *MIR17HG*-Promotors zeigt hohe H3K4me3 in allen getesteten Zelllinien.**

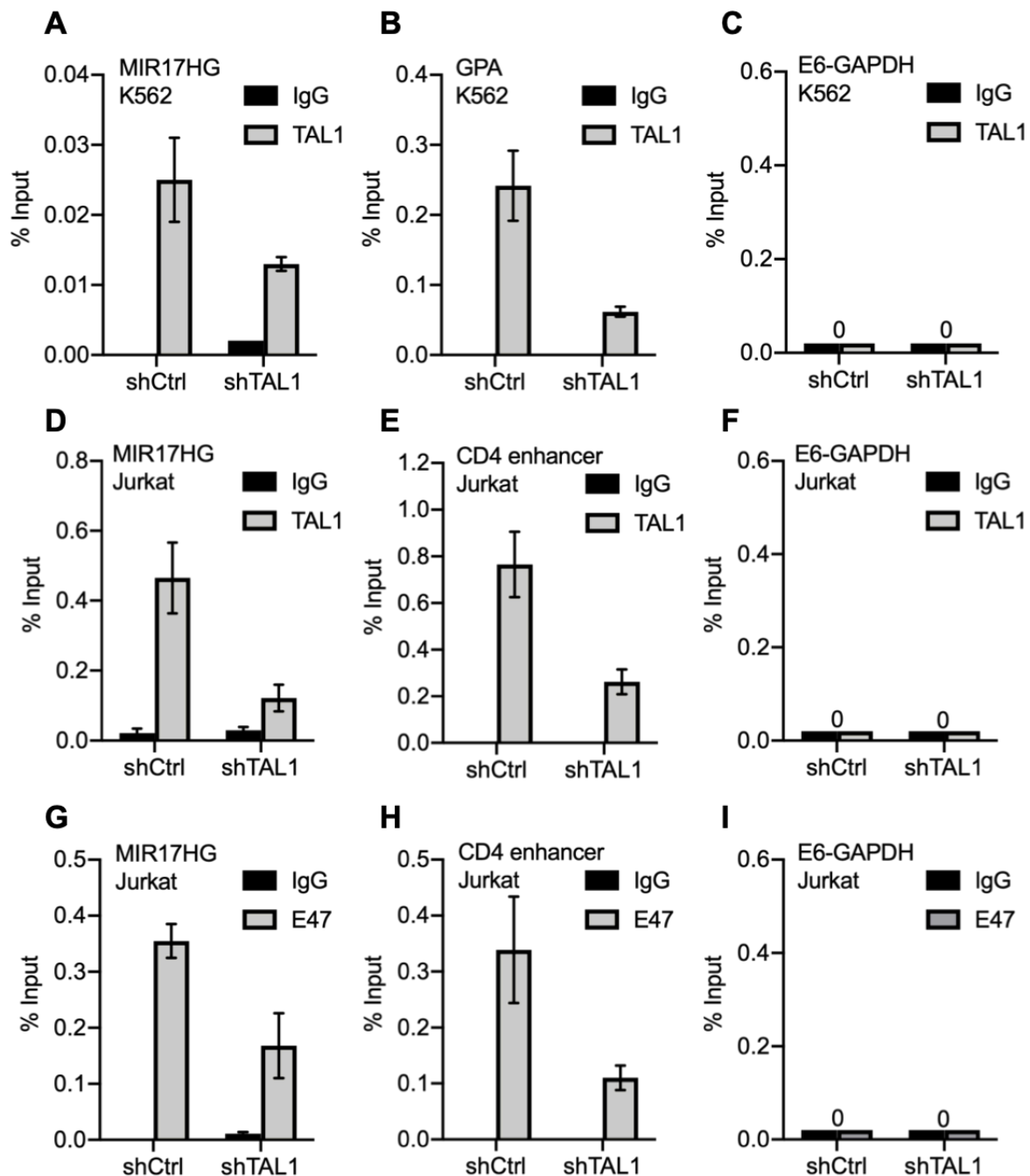
(A) Schematische Darstellung des *MIR17HG*-Promotors, ein nicht-kodierendes Exon (kleine graue Box) und das zweite Exon (große graue Box), welches das miR-17-92 Cluster (orange) enthält. Vor dem Transkriptionsstart befindet sich eine E-Box mit der Sequenz CANNTG (blaue Box). Die ChIP-Primer

(roter Balken) binden zum einen kurz vor dem Transkriptionsstart (TSS), sowie im *Upstream* Bereich des Promotors (-4000). (B) In K562-Zellen, (C) Jurkat-Zellen, und (D) CD34<sup>+</sup>-Zellen konnte ein hohes Maß an H3K4me<sub>3</sub>, welche aktive Promotorregionen markiert, im Bereich des Transkriptionsstarts detektiert werden, jedoch nicht -4000 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstarts. (E) In der negativen Kontrollregion Exon6-GAPDH ist keinerlei H3K4me<sub>3</sub> zu finden. (n=3)

Nachdem Bindung von TAL1 und E47 kurz vor dem Transkriptionsstart des *MIR17HG*-Promotors in K562-, Jurkat- und CD34<sup>+</sup>-Zellen gemessen werden konnte, wurde anschließend ein TAL1 *Knockdown* in K562- und Jurkat-Zellen induziert und die Chromatin-Immunopräzipitation wiederholt, um festzustellen, ob der Verlust von TAL1 zu einer Veränderung der E47-Bindung führt, und zum anderen einen Effekt auf die Aktivität des Promotorbereichs ausübt. Wie erwartet, konnte eine reduzierte TAL1-Bindung auf dem *MIR17HG*-Promotor nach TAL1 *Knockdown* in K562-Zellen gezeigt werden (Abbildung 3.16 A). Als positiv Kontrolle für TAL1-Bindung in K562-Zellen fungierte der *GPA*-Promotor. Hier konnte deutlich stärkere Bindung beobachtet werden (Abbildung 3.16 B), während in einer inaktiven Region von Exon6-GAPDH, welche als Negativ-Kontrolle diente, keinerlei TAL1-Bindung detektiert werden konnte (Abbildung 3.16 C). In Jurkat Zelllysaten konnten insgesamt höhere % Input Werte mit dem TAL1 Antikörper erzielt werden (Abbildung 3.16 D-F). Auch hier ist ein verringertes TAL1 Signal nach der Herabregulation von TAL1 auf dem *MIR17HG*-Promotor erkennbar (Abbildung 3.16 D). Da der *CD4-Enhancer* als bereits bekanntes TAL1- und E47-Zielgen beschrieben wurde (Sawada and Littman 1993; O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C 2004), und darüber hinaus mehrere E-Boxen im Bereich des ChIP-Primers aufweist (Abbildung 3.22 A), wurde dieser Bereich als Positiv-Kontrolle für TAL1- als auch für E47-Bindung verwendet. Eine Messung der ChIP-DNA mit dem *CD4-Enhancer* Primerpaar bestätigte die verringerte TAL1-Bindung nach TAL1 *Knockdown* (Abbildung 3.16 E). Der inaktive Bereich von Exon6-GAPDH wies keinerlei Bindung auf (Abbildung 3.16 F). Da TAL1 und E47 bekanntlich Heterodimerisierungspartner sind und in vorherigen Daten gezeigt werden konnte, dass TAL1 und E47 häufig synergistisch agieren (Abbildung 3.7 A und Abbildung 3.11), sollte auch überprüft werden, wie E47 sich nach TAL1 *Knockdown* auf dem *MIR17HG*-Promotor verhält. Wie zu erwarten, konnte auch E47-Bindung in Jurkat Zelllysaten nach der Induktion des TAL1 *Knockdowns* vermindert vorgefunden werden (Abbildung 3.16 G). Die positive Kontrollregion auf dem *CD4-Enhancer* wies ebenfalls eine verringerte E47-Bindung nach TAL1 *Knockdown* auf (Abbildung 3.16 H), während der negative Kontrollbereich, Exon6-GAPDH, keine Bindung vorweisen konnte (Abbildung 3.16 I).

Diese Daten indizieren erneut, dass nicht nur miR-17-92 einen Einfluss auf TAL1 hat und dessen Expression reguliert, sondern umgekehrt TAL1 auch auf dem *MIR17HG*-Promotor zu binden scheint und somit Einfluss auf die Expression von miR-17-92 nehmen kann. Darüber hinaus verifizieren die Daten noch einmal, dass TAL1 und E47

gemeinsam agieren und ein Verlust von TAL1 auch eine Verringerung von E47 mit sich bringt (Abbildung 3.16 G-H), wie es bereits anschaulich in Abbildung 3.7 bis Abbildung 3.9 sowie Abbildung 3.11 gezeigt werden konnte.



**Abbildung 3.16. TAL1- und E47-Bindung am *MIR17HG*-Promotor in K562- und Jurkat-Zellen nach *TAL1 Knockdown*.**

(A) Die TAL1-Bindung auf dem *MIR17HG*-Promotor nimmt nach *TAL1 Knockdown* in K562-Zellen ab. (B) *GPA* fungierte in K562-Zellen als Positiv-Kontrolle. Auf dem *GPA*-Promotor ist ebenfalls eine Reduktion der TAL1-Bindung nach *Knockdown* erkennbar. (C) Ein Bereich auf dem *Exon6-GAPDH*-Promotor fungierte als Negativ-Kontrolle. Dort konnte in K562-Zellen keine Bindung detektiert werden. (D) In Jurkat-Zellen ist nach *TAL1 Knockdown* eine verringerte TAL1-Bindung zu finden. (E) Der Promotorbereich des *CD4-Enhancers* fungierte in Jurkat-Zellen als Positiv-Kontrolle. Eine Reduktion

der TAL1-Bindung nach *Knockdown* kann beobachtet werden. (F) Ein Bereich auf dem Exon6-*GAPDH*-Promotor fungierte als Negativ-Kontrolle. Dort konnte in Jurkat-Zellen keine Bindung detektiert werden. (G) E47-Bindung verringert sich nach TAL1 *Knockdown* auf dem *MIR17HG*-Promotor in Jurkat-Zellen. (H) Auf dem Promotorbereich des *CD4-Enhancers*, der als Positiv-Kontrolle fungierte, liegt die E47-Bindung nach TAL1 *Knockdown* ebenfalls reduziert vor. (I) E47 zeigte keine Bindung auf Exon6-*GAPDH*, welches als Negativ-Kontrolle fungierte. Signifikanz wurde ab  $P < .05$  angenommen. (n=3)

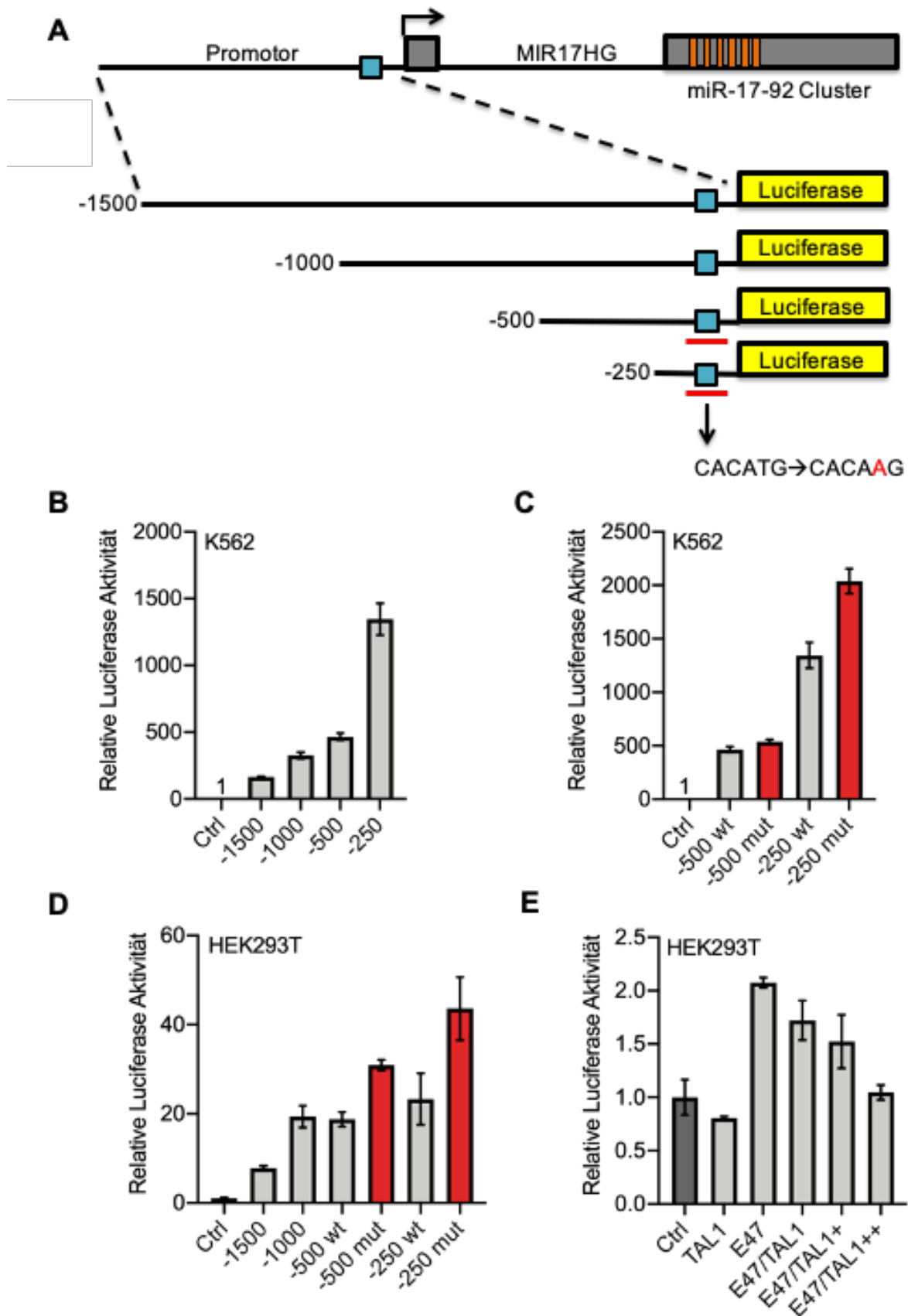
### 3.7 Promotor-Analyse des *MIR17HG*-Promotors

Da die ChIP-Assays erste Beweise dafür lieferten, dass TAL1 und E47 auf dem Promotor des *MIR17HG*-Gens binden und diesen regulieren, wurden der Promotorbereich vor dem ersten Exon und dem Transkriptionsstart und insbesondere die E-Box genauer angeschaut. Die Promotoraktivität wurde in einem Luciferase-Reportergen-Assay detaillierter untersucht. Dazu wurden Promotor-Fragmente mit einer Länge von 1500, 1000, 500 und 250 Basenpaaren in den pGL4.10 Vektor vor das Luciferasegen kloniert (Abbildung 3.17 A). Das Luciferasegen steht somit unter der Kontrolle des einklonierten Promotors, wodurch die Luciferase-Intensität auf die Aktivität des Promotors schließen lässt.

Die verschiedenen Deletionsfragmente des *MIR17HG*-Promotors wurden in K562-Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor. Es stellte sich heraus, dass die Luciferase-Aktivität mit abnehmender Fragmentlänge zunahm, wobei das kürzeste Fragment mit 250 Basenpaaren mit Abstand die höchste Luciferase-Aktivität hervorrief mit einer etwa 8-fachen Steigerung im Vergleich zum 1500-Basenpaar-Fragment (Abbildung 3.17 B). Um die E-Box vor dem Transkriptionsstart genauer zu analysieren, wurde die Sequenz CACATG im 500- und 250-Basenpaar-Konstrukt mutiert zu CACAAG, wodurch die Bindekapazität nicht mehr gewährleistet ist (Abbildung 3.17 A, roter Balken). Der Luciferase-Reportergen-Assay in K562-Zellen zeigte, dass die Mutation der E-Box im 500-Basenpaar-Fragment keine unterschiedliche Luciferase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Fragment aufwies, während bei der Mutation der E-Box im 250-Basenpaar-Fragment eine etwa 50%ige Steigerung im Vergleich zum Wildtyp erreicht werden konnte (Abbildung 3.17 C). Anschließend wurde das Experiment in HEK293T-Zellen durchgeführt, die deutlich leichter zu transfizieren sind und ein artifizielles Zellsystem darstellen. In diesem Versuchsaufbau zeigte sowohl die Mutante des 500-Basenpaar-Fragments als auch die des 250-Basenpaar-Fragments eine Steigerung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Fragmenten (Abbildung 3.17 D). Da HEK293T-Zellen kein endogenes TAL1 besitzen (Abbildung 9.7), konnten diese Zellen verwendet werden, um den Einfluss von TAL1 und E47 auf die *MIR17HG*-Promotoraktivität genauer zu analysieren. Dazu wurde TAL1 und E47 sowohl einzeln als auch zusammen mit dem 500-Basenpaar-Fragment des *MIR17HG*-Promotors in HEK293T-Zellen transfiziert. Als Kontrolle fungierte das 500-Basenpaar-Fragment ohne Kotransfektion eines weiteren Faktors.

Wie in Abbildung 3.17 E beobachtet werden kann, zeigte die Kotransfektion von TAL1 allein mit dem 500-Basenpaar-Fragment keinen Unterschied zur Kontrolle. Eine Kotransfektion von E47 allein führte zu einer deutlichen Steigerung der Luciferase-Aktivität. Eine Kotransfektion von E47 zusammen mit einer schrittweisen Erhöhung der TAL1 Konzentration führte zu einer Reduktion der Aktivität.

Diese Ergebnisse bestätigen, wie bereits beschrieben, dass TAL1 im Gegensatz zu E47 kein Homodimer bilden kann (H. L. Hsu et al. 1994) und folglich allein nicht an den *MIR17HG*-Promotor bindet. Darüber hinaus unterstützen die Daten, dass ein E47 Homodimer deutlich aktiver ist, als ein Heterodimer mit TAL1 (Park and Sun 1998), welcher aber bevorzugt gebildet wird, wenn TAL1 verfügbar ist (H. L. Hsu et al. 1994).



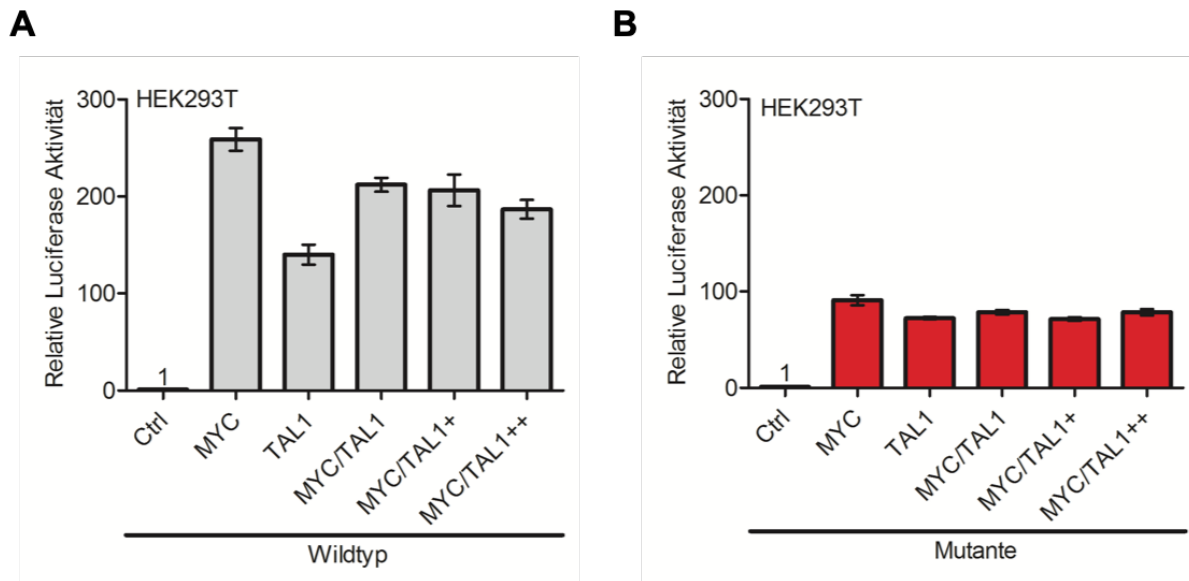
**Abbildung 3.17. Der TAL1/E47-Komplex bindet an den *MIR17HG*-Promotor.**

(A) Schematische Darstellung des *MIR17HG*-Promotors, ein nicht-kodierendes Exon (kleine graue Box) und das zweite Exon (große graue Box), welches das miR-17-92 Cluster (orange) enthält. Vor dem



Transkriptionsstart befindet sich eine E-Box mit der Sequenz CANNTG (blaue Box). Luciferase-Konstrukte des *MIR17HG*-Promotors mit einer Länge von 1500, 1000, 500 und 250 Basenpaaren wurden in den pGL4.10 Vektor vor ein Luciferase-Reportergen kloniert. (B) In einem Luciferase-Assay wurden die verschiedenen Längen der Promotor-Konstrukte in K562-Zellen transfiziert und die relative Luciferase-Aktivität bestimmt. (C) In dem 500- und 250-Basenpaar-langen Konstrukt wurde die E-Box mutiert und anschließend ein Luciferase-Assay in K562-Zellen durchgeführt, um den Effekt der TAL1-Bindung an dem *MIR17HG*-Promotor auf die Luciferase-Aktivität zu bestimmen. (D) In einem artifiziierten Ansatz wurden die verschiedenen Promotor-Konstrukt-längen sowie die mutierten Konstrukte in HEK293T-Zellen transfiziert und ein Luciferase-Assay durchgeführt. (E) Das 500-Basenpaar-lange *MIR17HG* Konstrukt wurde verwendet, um TAL1 oder E47, beziehungsweise E47 zusammen mit einer steigenden Konzentration von TAL1 in HEK293T-Zellen zu kotransfizieren. (n=4)

Die E-Box auf dem *MIR17HG*-Gen, die sich kurz vor dem Transkriptionsstart befindet, ist als eine bekannte MYC Bindestelle beschrieben (O'Donnell et al. 2005). Da in Abbildung 3.17 E gezeigt werden konnte, dass TAL1 und E47 Einfluss auf die Promotoraktivität von *MIR17HG* nehmen, sollte nun analysiert werden, inwiefern MYC die Promotoraktivität verändert. Dazu wurde das 250-Basenpaar-Konstrukt, das im Luciferase-Assay in K562- und HEK293T-Zellen die höchste Aktivität zeigte (Abbildung 3.17 B und D), für einen weiteren Reporter-Gen-Assay verwendet und gemeinsam mit MYC, TAL1 oder beiden Konstrukten in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Eine Transfektion von MYC allein steigert die Luciferase-Aktivität beträchtlich, während durch TAL1-Transfektion nur etwa die Hälfte der Aktivität erreicht wird (Abbildung 3.18 A). Eine Kotransfektion von MYC und TAL1 führt zu einer wiederum höheren Promotoraktivität, erreicht allerdings nicht die Werte, die eine Transfektion von MYC allein hervorruft. Auch eine steigende Menge von TAL1 bei gleichbleibender MYC Konzentration ändert die Promotoraktivität nicht. TAL1 kann folglich, anders als zuvor bei E47 (Abbildung 3.17 E), die aktivierende Wirkung von MYC nur teilweise antagonisieren, selbst wenn TAL1 in doppelter oder dreifacher Menge im Vergleich zu MYC vorhanden ist. Anschließend wurde das gleiche Experiment mit dem mutierten 250-Basenpaar-Konstrukt durchgeführt, bei dem das E-Box Motiv zerstört wurde (Abbildung 3.17 A und Abbildung 9.8). Wie erwartet ist kein Unterschied zwischen MYC, TAL1 oder MYC/TAL1 Transfektion zu sehen, da die Erkennungssequenz nicht mehr vorhanden ist (Abbildung 3.18 B).



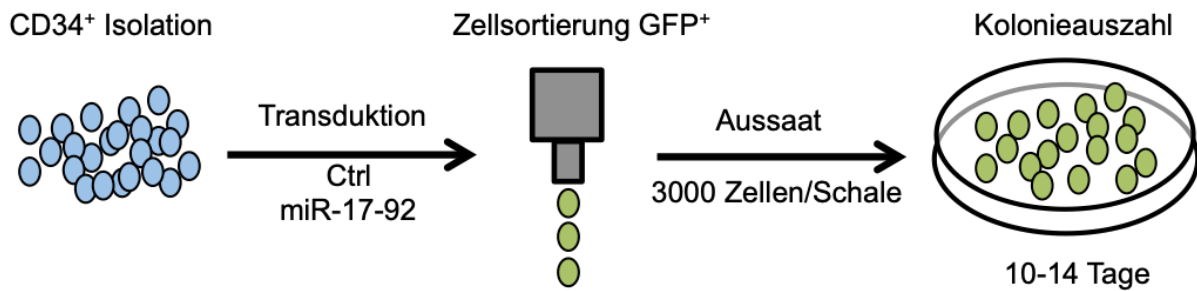
**Abbildung 3.18. MYC bindet an den *MIR17HG*-Promotor.**

(A) Das 250-Basenpaar-Konstrukt wurde in HEK293T-Zellen transfiziert zusammen mit MYC oder TAL1. Außerdem wurden MYC und TAL1 koexprimiert mit steigender Konzentration von TAL1. (B) Das gleiche Experiment wurde mit dem mutierten 250-Basenpaar-Konstrukt durchgeführt. Als Kontrolle diente der Leervektor pGI4.10. Die Werte wurden als relative Werte dargestellt, normalisiert auf die Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde. (n=4)

### 3.8 MiR-17-92 beeinflusst die Erythropoese in CD34<sup>+</sup>-Zellen

MiR-17-92 und TAL1 sind beides wichtige Parameter in der Hämatopoese. TAL1 ist ein wichtiger Regulator in der Linienentscheidung zwischen dem megakaryozytären und dem erythrozytären Entscheidungspunkt. TAL1 ist während der gesamten Erythropoese in hoher Konzentration vorhanden (Y. Zhang et al. 2005; N. C. Correia et al. 2016) und beeinflusst die Expression bestimmter Gene, welche die terminale erythroide Differenzierung begünstigen (Lahlil et al. 2004). Da miR-17-92 TAL1 herunterreguliert, lag die Vermutung nahe, dass auch durch die Überexpression von miR-17-92 die Differenzierung und insbesondere die Erythropoese verändert werden könnte. Um dies zu analysieren, wurde ein CFU-Assay durchgeführt.

In Abbildung 3.19 ist der Versuchsablauf des CFU-Assays mit humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen schematisch dargestellt. Zunächst wurden humane CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Knochenmarkfiltern isoliert und mit miR-17-92 beziehungsweise dem Leervektor als Kontrolle transduziert. Drei bis fünf Tage nach Transduktion wurden die GFP<sup>+</sup>-Zellen mithilfe von Durchflusszytometrie steril sortiert. Anschließend wurden 3000 Zellen pro Schale in Methylzellulose ausgesät. Die Kolonien konnten nach 10 - 14 Tagen ausgezählt werden.

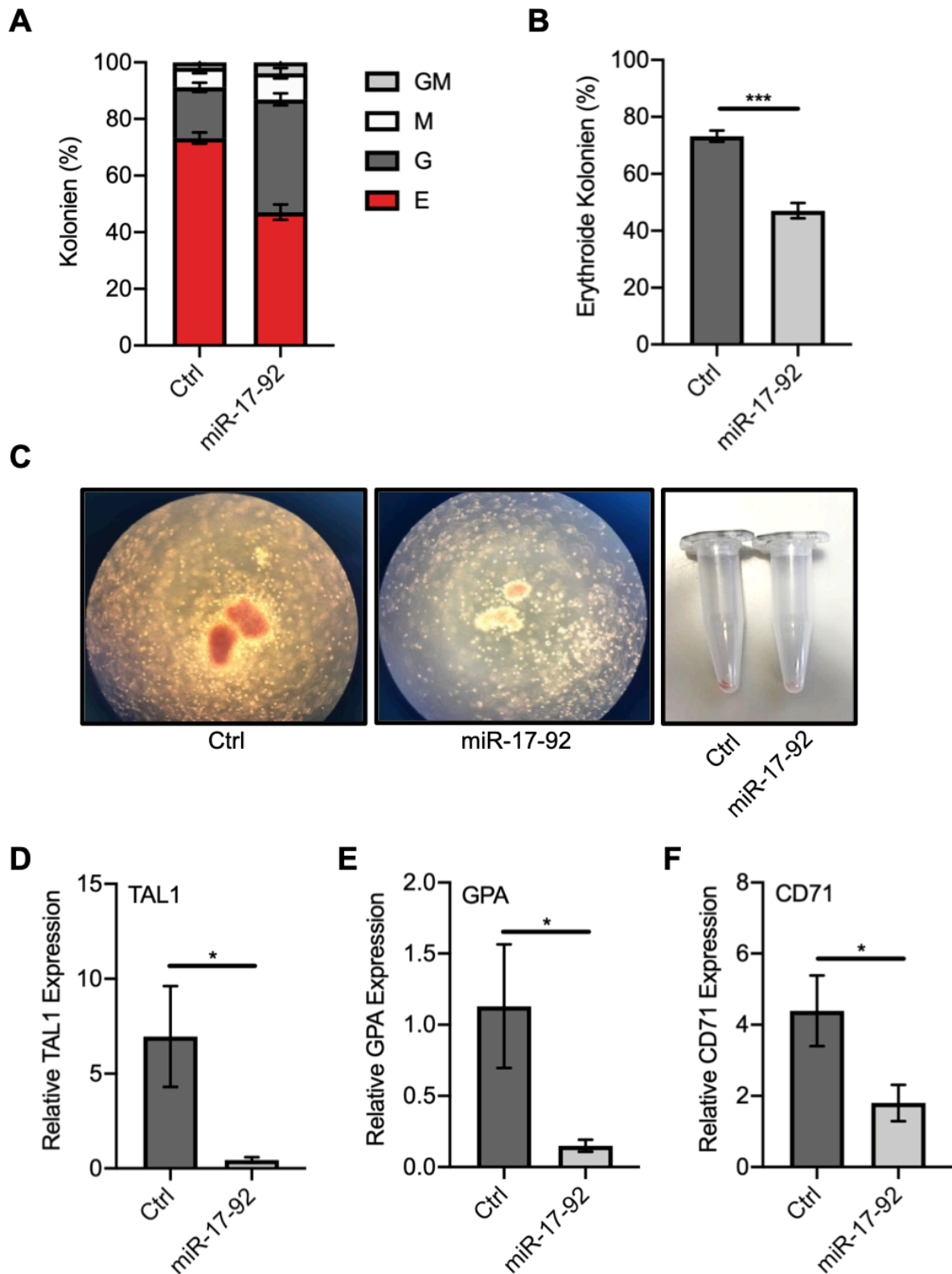


**Abbildung 3.19. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für den CFU-Assay mit CD34<sup>+</sup>-Zellen.**

Humane CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden aus Knochenmark isoliert und mit miR-17-92 beziehungsweise dem Kontrollvektor transduziert. Anschließend wurde eine durchflusszytometrische Sortierung der positiv transduzierten Zellen vorgenommen. Danach wurden 3000 Zellen pro 3 cm Schale in Methylzellulose ausgesät. Nach 10 - 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt und für die RNA-Isolation geerntet.

In Abbildung 3.20 A wird ersichtlich, dass miR-17-92 positive CD34<sup>+</sup>-Zellen deutlich weniger erythroide Kolonien bilden, als die Kontrollzellen. Der prozentuale Anteil der granulozytären Kolonien ist dafür höher in miR-17-92 positiven Kolonien. Betrachtet man die monozytären und granulozytären-megakaryozytären Kolonien, so wird dort zwischen Kontrollzellen und miR-17-92 Zellen kein signifikanter Unterschied deutlich. Bei den Erythrozyten-Kolonien ist die Reduktion jedoch hoch signifikant (Abbildung 3.20 B). Nicht nur hinsichtlich der Anzahl der Kolonien war ein deutlicher Trend zu erkennen. Auch die Rotfärbung und Größe der Kolonien variierte. Erythroide Kolonien aus Kontrollzellen zeigten eine intensive, für Erythrozyten typische, rote Farbe, während die miR-17-92 exprimierenden Zellen deutlich blassere und auch kleinere Erythrozyten-Kolonien bildeten (Abbildung 3.20 C, links und mitte). Die Kolonien wurden aus der Methylzellulose mit warmem PBS gelöst und pelletiert. Die Farbe des Kolonien-Pellets demonstriert ebenfalls deutlich, dass die Kontrollzellen mehr erythroide Kolonien aufwiesen als die miR-17-92 exprimierenden Kolonien (Abbildung 3.20 C, rechts). Aus den Pellets der Kolonien wurde RNA gewonnen. Die TAL1 Expression lag, wie erwartet, in den miR-17-92 Zellen reduziert vor (Abbildung 3.20 D). Um eine Kontrolle für erythroide Differenzierung zu haben, wurde zusätzlich die GPA als auch die CD71 Expression gemessen, beides positive Marker, die während der Erythropoese hochreguliert werden (Loken et al. 1987; Dong, Wilkes, and Yang 2011). Sowohl GPA (Abbildung 3.20 E) als auch CD71 (Abbildung 3.20 F) verringerten sich bei miR-17-92 Überexpression, ein deutlicher Hinweis auf reduzierte erythroide Differenzierung.

Diese Daten lassen die Hypothese zu, dass durch Überexpression von miR-17-92 in der Tat Einfluss auf die Erythropoese genommen werden kann, zumindest teilweise durch die Inhibition von TAL1 durch miR-17-92.



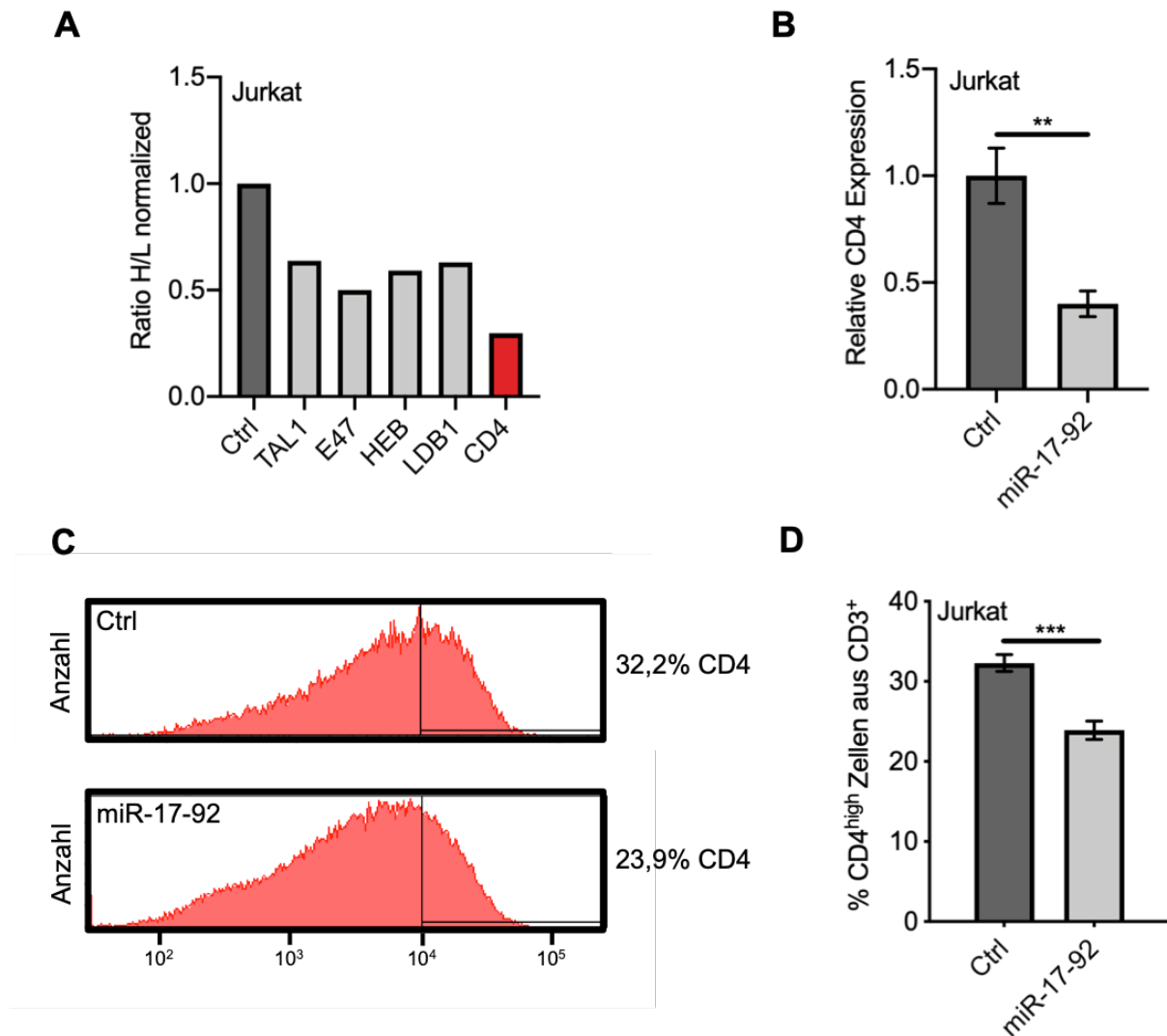
**Abbildung 3.20. MiR-17-92 Expression beeinflusst die erythroide Differenzierung in einem CFU-Assay.**

(A) Prozentuale Darstellung aller gezählten Kolonien. G: Granulozyten-Kolonie, M: Monozyten-Kolonie, GM: Granulozyten-Monozyten Kolonie, E: Erythrozyten-Kolonie. (B) Prozentuale Darstellung aller erythroiden Kolonien. (C) Rotfärbung einer erythroiden Kolonie aus Kontroll- und miR-17-92 Zellen (links und mitte). Die Kolonien wurden aus der Methylzellulose gelöst und pelletiert. Das Pellet der

Kontrollzellen zeigt eine deutliche Rotfärbung im Vergleich zum Pellet der miR-17-92 Kolonien (rechts). (D) qRT-PCR Messung der *TAL1*-mRNA Expression der gesamten Kolonien. (E) qRT-PCR Messung der *GPA*-mRNA Expression der gesamten Kolonien. (F) qRT-PCR Messung der *CD71*-mRNA Expression der gesamten Kolonien. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet (n=3). \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001.

### 3.9 Der T-Zell Marker CD4 wird durch miR-17-92 Überexpression inhibiert

Während der Massenspektrometrie (Abbildung 3.3) wurden insgesamt 324 Proteine um eine H/L Ratio von mindestens 0,7 herunterreguliert vorgefunden. Abgesehen von den bereits analysierten Proteinen TAL1, E47, HEB und LDB1 war interessanterweise der Immunzellmarker CD4, der von T-Helferzellen auf ihrer Oberfläche präsentiert wird, um eine H/L Ratio von 0,3 das am stärksten herunterregulierte Protein in den Resultaten der Massenspektrometrie (Abbildung 3.21 A). MiR-17-92 wurde ohne SILAC Bedingungen in Jurkat-Zellen überexprimiert und die *CD4*-mRNA Expression überprüft. Eine etwa 50%ige Reduktion des CD4 Signals in miR-17-92 überexprimierenden Zellen bestätigte die SILAC Daten (Abbildung 3.21 B). Da CD4 auf der Oberfläche präsentiert wird, wurde die Expression des Markers darüber hinaus mittels Durchflusszytometrie gemessen. Hierzu wurden zunächst alle CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen ausgewählt. Daraus wurden CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen gemessen. Das Histogramm der durchflusszytometrischen Auswertung zeigte, dass nach miR-17-92 Überexpression ein Abfall der CD4<sup>+</sup>-Zellen aus CD3<sup>+</sup>-Zellen zu beobachten ist (Abbildung 3.21 C). Betrachtet man die CD4<sup>high</sup> Population aus CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, so wird ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und miR-17-92 deutlich (Abbildung 3.21 D). Diese Daten wurden sieben Tage nach Transduktion produziert. Eine Kontrollmessung wurde einen Tag nach Transduktion durchgeführt, an dem die Jurkat-Zellen schon eine über 90%ige Transduktionseffizienz zeigten. Zu diesem Zeitpunkt konnte noch kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den miR-17-92 Zellen bezüglich der CD4 Expression ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die inhibitorischen Effekte von miR-17-92 auf die CD4 Expression sekundärer Natur sind.

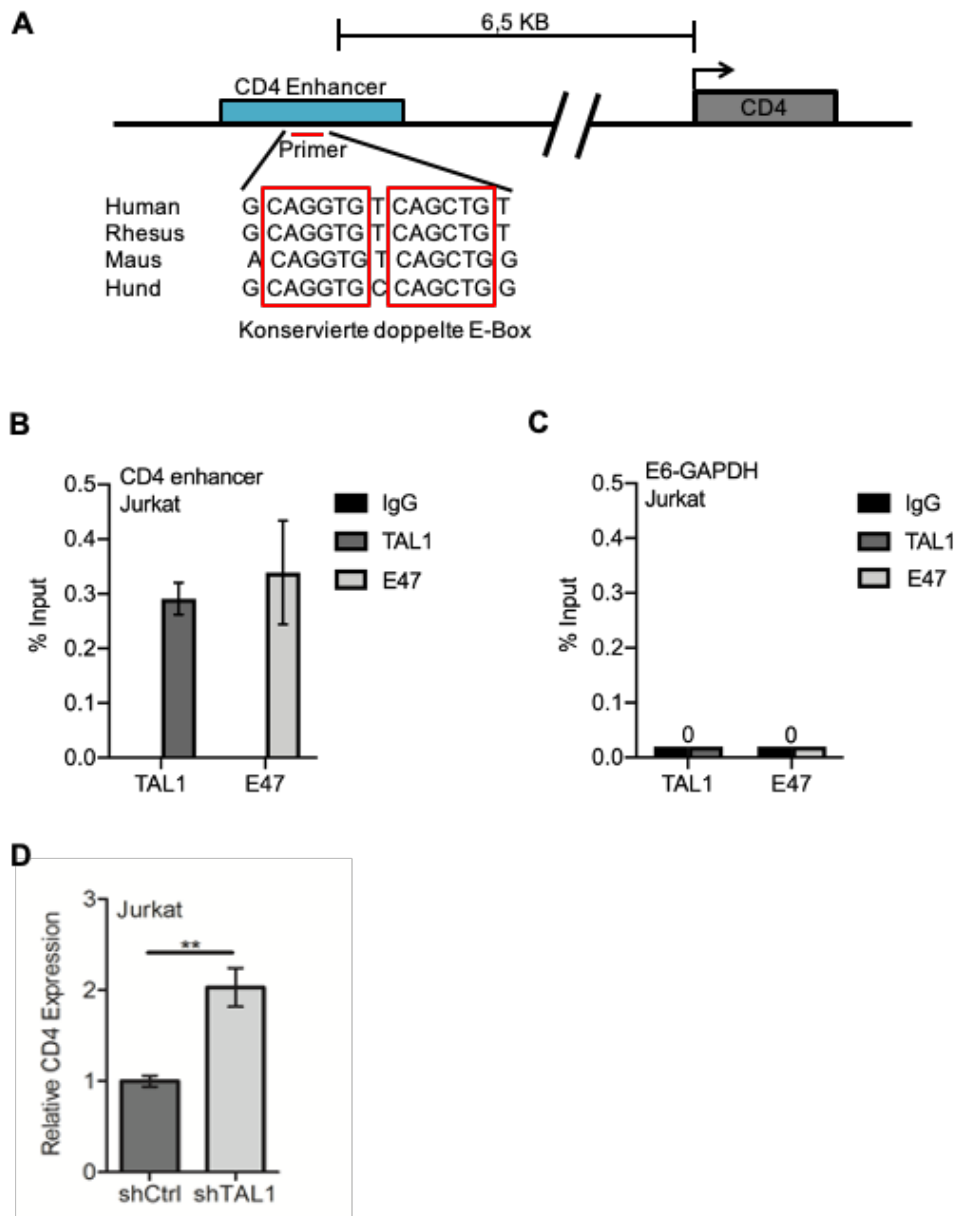


### Abbildung 3.21. MiR-17-92 Überexpression inhibiert den Oberflächenmarker CD4.

(A) In der Massenspektrometrie unter SILAC Bedingungen wurde zusätzlich zu den bereits analysierten Proteinen TAL1, E47, HEB und LDB1, CD4 stark herunterreguliert vorgefunden. (B) Nach miR-17-92 Überexpression in Jurkat-Zellen ohne SILAC Bedingungen konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der *CD4*-mRNA in der qRT-PCR ermittelt werden (n=3). (C) Da CD4 ein Oberflächenmarker der T-Helferzellen ist, wurde die Expression des Markers in der Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen aus CD3<sup>+</sup>-T-Zellen bestimmt. Das Histogramm zeigt eine leichte Reduktion der CD4<sup>+</sup> aus CD3<sup>+</sup> Events bei miR-17-92 exprimierenden Jurkat-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. (D) Der prozentuale Anteil der CD4<sup>high</sup>-Zellen aus den CD3<sup>+</sup>-Zellen zeigte eine hoch signifikante Verringerung der CD4 Expression bei miR-17-92 Zellen (n=3). Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001.

Das *CD4*-Gen wurde näher betrachtet (Abbildung 3.22 A). Dabei war auffällig, dass die Sequenz im Bereich des *CD4-Enhancers* zwei E-Boxen kurz hintereinander enthält. Diese Region ist konserviert zwischen Human, Rhesus, Maus und Hund. Es sollte ermittelt werden, ob TAL1 und E47 an ihre Erkennungssequenz CANNTG im Bereich des *CD4-Enhancers* auf dem *CD4*-Gen binden. Es wurde ein ChIP-Primer

konzipiert, der sich über die Region der E-Boxen erstreckt. Der ChIP-Assay ergab, dass sowohl TAL1 als auch E47 auf dem *CD4-Enhancer* binden (Abbildung 3.22 B). Auf Exon6-GAPDH, welches als Negativkontrolle gemessen wurde, war keine TAL1- oder E47-Bindung zu erkennen (Abbildung 3.22 C). Eine qRT-PCR Analyse zeigt, dass *CD4* nach TAL1 *Knockdown* hochreguliert wird (Abbildung 3.22 D).



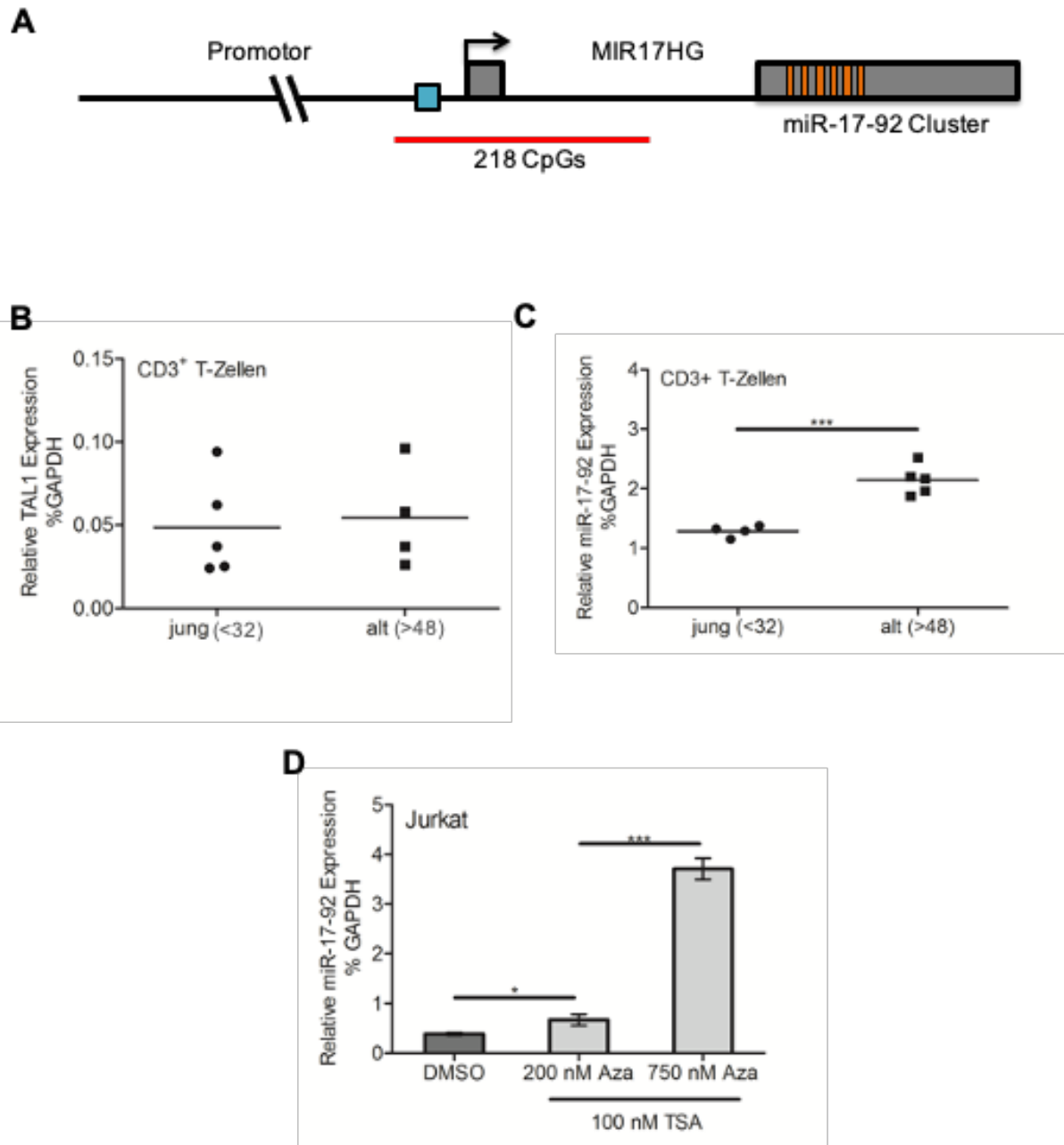
**Abbildung 3.22. Das *CD4*-Gen besitzt eine doppelte E-Box im Bereich seiner *Enhancer* Region und wird von TAL1 und E47 gebunden.**

(A) Schematisch Darstellung des *CD4*-Gens. In blau dargestellt ist der *CD4-Enhancer* Bereich, dessen Sequenz eine doppelte E-Box beinhaltet, die konserviert vorliegt (rote Boxen). Der ChIP-Primer bindet genau über diesen beiden E-Boxen. (B) In einem ChIP-Assay konnte gezeigt werden, dass TAL1 und E47 an dem *CD4-Enhancer* binden. (C) Im negativen Kontrollbereich Exon6-GAPDH findet keine Bindung von TAL1 und E47 statt. (D) Eine qRT-PCR Analyse zeigt die *CD4*-mRNA Expression nach TAL1 Knockdown in Jurkat Zellen. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet (n=3). \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001.

### 3.10 Altersabhängige Methylierung des *MIR17HG*-Gens beeinflusst die miR-17-92 Expression

Im Promotorbereich des *MIR17HG*-Gens liegt eine etwa 800 Basenpaar-lange, konservierte CpG-Insel, die sich über den Transkriptionsstartpunkt (TSS), das erste Exon, sowie einen Teil des ersten Introns erstreckt (Abbildung 3.23 A). Laut ENCODE liegen in diesem Bereich viele potentiell methylierte CpGs vor. Da DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen in Wechselwirkung miteinander stehen (Kapitel 1.3.2 und 1.3.3), besteht die Möglichkeit, dass eine Veränderung der epigenetischen Umgebung am *MIR17HG*-Promotor einen entscheidenden Einfluss auf die miR-17-92 Expression und somit möglicherweise auch auf die TAL1 Expression nimmt. Da sich der Methylierungszustand im Laufe des Lebens stetig verändert und altersabhängig ist, wurden zunächst CD3<sup>+</sup>-T-Zellen von gesunden Spendern unterschiedlichen Alters auf ihre TAL1 und miR-17-92 Expression untersucht. Dabei wurden die Proben unterteilt in junge Spender, die zum Zeitpunkt der Spende jünger als 32 Jahre alt waren, und alte Spender, die über 48 Jahre alt waren. Die Expression von TAL1 konnte in keinen Zusammenhang mit dem Spenderalter gebracht werden, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen alten und jungen Spendern erkennen ließen (Abbildung 3.23 B). Die miR-17-92 Expression jedoch wies in Proben von Spendern über 48 Jahren eine signifikante Steigerung auf (Abbildung 3.23 C). Dies ließ darauf schließen, dass es zwar keine altersabhängige Korrelation zwischen der TAL1 und miR-17-92 Expression gibt, die veränderte miR-17-92 Expression mit höherem Alter aber durchaus dem alternierenden Methylierungsstatus der CpG-Insel im *MIR17HG*-Promotorbereich zuzuschreiben sein könnte. Um dieser Vermutung weiter auf den Grund zu gehen, wurde ein artifizielles Experiment durchgeführt, das die *in vivo* Situation simulieren sollte. Jurkat-Zellen wurden für 24 Stunden mit dem HDAC Inhibitor TSA und simultan für 48 Stunden entweder mit 200 nM oder 750 nM des DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin (Aza) behandelt. Durch die Behandlung mit den beiden Inhibitoren kann die DNA nicht mehr methyliert werden und die Histonumgebung bleibt acetyliert und behält ihren aktiven Chromatinstatus bei. Eine qRT-PCR Analyse ergab, dass sich die miR-17-92 Expression mit steigender DNA-Methyltransferase-Inhibitor-Konzentration erhöht (Abbildung 3.23 D). Entsprechend kann man vermuten, dass die verstärkte miR-17-92 Expression in älteren T-Zellspendern auch auf eine verringerte Methylierung des Promotors zurückzuführen ist.





**Abbildung 3.23. Altersabhängige miR-17-92 Expression in CD3<sup>+</sup>-T-Zellen scheint durch den Methylierungszustand des *MIR17HG*-Promotors beeinflusst zu werden.**

(A) Im *MIR17HG*-Gen befindet sich eine CpG-Insel mit insgesamt 218 CpGs (roter Balken), die sich über den Transkriptionsstart, das erste Exon und einen Teil des ersten Introns erstreckt. (B) Aus Thrombozyten von gesunden Spendern wurden CD3<sup>+</sup>-T-Zellen isoliert und altersabhängig in zwei Gruppen (jung (<32) und alt (>48)) eingeteilt. Die TAL1 Expression wurde mittels qRT-PCR mit einer spezifischen TAL1 *TaqMan*-Sonde bestimmt (n=9). (C) Die miR-17-92 Expression der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurde mittels qRT-PCR mit einer miR-17-92 spezifischen *TaqMan*-Sonde bestimmt (n=9). (D) Jurkat-Zellen wurden für 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des DNA-Methyltransferase Inhibitors 5-Azacytidin (Aza) und für 24 Stunden mit 100 nM des HDAC Inhibitors Trichostatin-A (TSA) behandelt. Die Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt. Die miR-17-92 Expression wurde mittels SYBR-Green basierter qRT-PCR ermittelt (n=3). Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001.

## 4 Diskussion

Transkriptionsfaktoren und miRNAs bilden komplexe regulatorische Interaktionsnetzwerke während der Genregulation, die durch die Rekrutierung von Kofaktoren und epigenetischen Modifikationen dazu beitragen, dass die Transkription spezifischer Gene zur richtigen Zeit am richtigen Ort und in der benötigten Menge stattfindet. Während der Hämatopoese sorgen diese essentiellen regulatorischen Schleifen zwischen Transkriptionsfaktoren und miRNAs dafür, dass bestimmte Gene, die für eine entsprechende Linienentscheidung notwendig sind, exprimiert werden, während die Transkription von Genen, die die Differenzierung in eine andere hämatopoetische Linie spezifizieren, stillgelegt wird. Ebenso gewährleisten diese Netzwerke den Erhalt des Stammzellpotentials von HSCs und Progenitorzellen und inhibieren die Genexpression von Differenzierungsgenen so lange, bis die HSCs und Vorläuferzellen ein Signal zur Differenzierung erhalten (Lausen 2013).

Das miR-17-92 Cluster hat unverzichtbare Funktionen während der normalen Hämatopoese und spielt insbesondere bei der korrekten Entwicklung der Lunge und des Herzens eine wichtige Rolle (Ventura et al. 2008). Seiner häufig aberranten Expression in vielen Leukämien sowie soliden Tumoren verdankt es den Namen Onkomir-1 (He et al. 2005; Lu et al. 2005; Ota et al. 2004; Tagawa and Seto 2005; Hayashita et al. 2005). TAL1 ist ein Masterregulator der hämatopoetischen Differenzierung, ohne dessen Funktion die Entwicklung aller hämatopoetischen Linien nicht vonstattengehen kann (Porcher et al. 1996), insbesondere die primitive Erythropoese wird komplett außer Kraft gesetzt (Shivdasani, Mayer, and Orkin 1995; Robb et al. 1995). TAL1 hat allerdings auch, ähnlich wie miR-17-92, ein hohes onkogenes Potential und wird häufig durch Translokationen, wie t(1;14) (Finger et al. 1989) oder chromosomale Neuarrangements und Deletionen, wie der SIL-TAL1 Deletion (Peter D. Aplan, Raimondi, and Kirsch 1992; J. W. G. Janssen et al. 1993) in T-ALL aberrant exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte TAL1 als direktes Zielgen des miR-17-92 Clusters identifiziert, sowie eine gegenseitige negative Regulation der beiden Faktoren aufeinander festgestellt werden.

### 4.1 MiR-17-92 reguliert TAL1 und dessen Interaktionsnetzwerk

Da der Transkriptionsfaktor TAL1 und das miR-17-92 Cluster unverzichtbar für die Differenzierung während der Hämatopoese sind, beide Faktoren aber auch, wenn sie fehlreguliert sind, im Zusammenhang mit Leukämie auftauchen, lag die Vermutung nahe, dass eine Korrelation in der Regulierung der hämatopoetischen Entwicklung besteht. Um dies herauszufinden, wurde zunächst getestet, ob *TAL1* ein direktes Zielgen von miR-17-92 ist. Mithilfe von SILAC-basierter Massenspektrometrie konnten

zahlreiche potentielle Zielgene des miRNA Clusters bestimmt werden. Darunter befand sich auch der für diese Arbeit interessante Transkriptionsfaktor TAL1 (Abbildung 3.3). Interessanterweise stellte sich heraus, dass die TAL1-Interaktionspartner E47, HEB und LDB1 ebenfalls durch miR-17-92 herunterreguliert werden (Abbildung 3.3 C-D; Abbildung 3.4). Um diese Beobachtung weiter zu verfolgen, wurde ein *Knockdown* von TAL1 in Jurkat-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Heterodimerisierungspartner von TAL1, E47 und HEB, zwar auf Proteinebene herunterreguliert werden, nicht jedoch auf mRNA-Ebene (Abbildung 3.7). Dieses unerwartete Ergebnis deutete darauf hin, dass die Proteinstabilität von E47 und HEB durch den *Knockdown* von TAL1 geschwächt ist und es zu einem vermehrten Proteinabbau kommt. Um diese Vermutung weiter zu verfolgen, wurden weitere Experimente mit einem Proteasom-Inhibitor durchgeführt, die bestätigten, dass die Proteinstabilität der E-Proteine in der Tat durch den TAL1 *Knockdown* beeinträchtigt wird (Abbildung 3.8). In diesem Zusammenhang wurde ein *Rescue*-Experiment durchgeführt, bei dem murines Tal1 in den shTAL1-Zellen überexprimiert wurde. In einem Western Blot konnte gezeigt werden, dass sich die Proteinbildung von E47 und HEB durch die Überexpression des murinen TAL1 regeneriert, was die Vermutung verifiziert, dass die vorhandene TAL1 Menge ausschlaggebend für die Proteinstabilität von E47 und HEB ist (Abbildung 3.9).

Diese Ergebnisse werden durch eine Studie unterstützt, bei der gezeigt werden konnte, dass die Proteinstabilität des pentametrischen Komplexes von TAL1 von den beteiligten Faktoren bedingt wird. Durch die Bindung von LMO2 an das TAL1/E47 Heterodimer kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch neue Wasserstoffbrückenbindungen entstehen und die Stabilität der Heterodimer-Bindung erhöht wird. Durch die stärkere TAL1/E47-Bindung verändert sich der Winkel des Heterodimers, was wiederum die Bindung zwischen der *Basic*-Region des Dimers und der DNA schwächt. Die erhöhte Proteinstabilität zwischen TAL1 und E47 gemeinsam mit der geringeren DNA-Bindekapazität bedingen eine strukturelle Dynamik des pentametrischen Komplexes, der zu einer höheren transkriptionellen Aktivität führt (ElOmari et al. 2013). Der Komplex kann so zu anderen genomischen Bereichen durch Assoziation mit DNA-bindenden Faktoren wie RUNX1, ETS1 und GATA3 wandern (Palii et al. 2011; Sanda et al. 2012). Eine andere Arbeitsgruppe führte ebenfalls ein Experiment mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 durch und konnte demonstrieren, dass die Interaktion zwischen TAL1 und LMO1/2 die Proteinstabilität erhöht und den proteosomalen Abbau der LMO-Proteine verhindert (Lécuyer et al. 2007).

Eine weitere Studie postulierte, dass die Proteinstabilität von LDB1 und LMO2 durch einzelsträngige DNA-Bindeproteine gewährleistet wird, welche die Proteine vor Ubiquitinierung und proteosomalem Abbau schützen. Eine Veränderung der Expression der DNA-Bindeproteine könnte zu einer veränderten Stöchiometrie des gesamten pentametrischen Komplexes und somit zu veränderten Genexpression führen (Zhixiong Xu et al. 2007).

Für die Regulation des TAL1-Komplexes scheint die Proteinstabilität sowie die Konformation der einzelnen Faktoren zueinander ein wichtiger Bestandteil der transkriptionellen Aktivität zu sein, die von diesem Komplex ausgeht. Durch die beschriebenen Studien wird deutlich, dass nicht nur das E-Protein/TAL1 Dimer selbst, sondern auch die anderen Faktoren des pentametrischen Komplexes sowie weitere Kofaktoren und DNA-Bindeproteine Einfluss auf die Struktur des Komplexes und die Interaktionen der Proteine untereinander nehmen. Durch eine veränderte Bindung an die DNA wird diese für weitere Transkriptionsfaktoren zugänglicher oder weniger zugänglich gemacht, wodurch Einfluss auf die myeloide Genexpression genommen wird.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass miR-17-92 einen Faktor der Hämatopoese darstellt, der die Expression von TAL1 inhibiert und dadurch den gesamten Kernkomplex von TAL1 verändert. In dem experimentellen Aufbau dieser Arbeit konnten Veränderungen von E47, HEB und LDB1 als Bestandteil des TAL1-Komplexes beobachtet werden. In weiterführenden Experimenten könnte analysiert werden, ob miR-17-92 auch noch weitere Zielproteine des Kernkomplexes bindet wie beispielsweise LMO, GATA oder Kofaktoren, die rekrutiert werden können. Dafür wäre es sinnvoll ein anderes Zellsystem zu verwenden, bei dem die genannten erythroiden Gene exprimiert werden wie beispielsweise erythroleukämische K562-Zellen oder humane CD34<sup>+</sup>-Zellen.

Abschließend bleibt die Frage offen, warum die mRNA und das Protein der Bindungspartner von TAL1, E47, HEB und LDB1 nach miR-17-92 Überexpression herunterreguliert sind (Abbildung 3.4), die mRNA aber nach TAL1 *Knockdown* unverändert bleibt, während nur das Protein degradiert wird (Abbildung 3.7). Dass die Proteindegradation durch den TAL1 *Knockdown* und die damit verbundene Instabilität hervorgerufen wird, konnte bereits gezeigt werden. Fraglich ist nun jedoch, ob *E47*, *HEB* und *LDB1* möglicherweise auch direkte Zielgene von miR-17-92 sein könnten und dadurch das mRNA Level reduziert wird. Entsprechend wurden die 3'-UTRs von E47, HEB und LDB1 mithilfe von *TargetScan* auf mögliche miR-17-92 Bindestellen kontrolliert. Tatsächlich fand sich eine schwach konservierte Bindestelle für miR-19 auf der 3'-UTR von HEB (Abbildung 9.6), jedoch nicht auf den 3'-UTRs von E47 und LDB1 (Abbildung 9.6). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Degradation von E47 und LDB1 sekundär durch die Herunterregulation von TAL1 durch miR-17-92 verursacht wurde. Um herauszufinden, ob die Repression von HEB wirklich durch eine direkte miR-19-Bindung hervorgerufen wird, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Man könnte beispielsweise durch eine gegen HEB gerichtete shRNA einen *Knockdown* herbeiführen und mithilfe einer qRT-PCR überprüfen, ob dies eine Auswirkung auf die miR-17-92 Expression hat.

Aus den Daten dieser Arbeit geht hervor, dass miR-17-92 einen inhibitorischen Effekt auf TAL1 ausübt, mit dem eine Reduktion der TAL1 Bindungspartner E47 und HEB sowie dem Interaktionspartner LDB1 einhergeht. Diese Veränderungen führen zu

Konformationsänderungen des pentametrischen Komplexes, wodurch eine veränderte Regulation der Genexpression bewirkt wird.

## 4.2 TAL1 bindet an den *MIR17HG*-Promotor und reguliert die miR-17-92 Expression

Nachdem festgestellt werden konnte, dass der TAL1-Komplex unter der Kontrolle von miR-17-92 steht, sollte analysiert werden, welche Auswirkungen TAL1 auf die miR-17-92 Expression und dessen Promotoraktivität hat. Ein *Knockdown* von TAL1 führte zu einem Anstieg der miR-17-92 Expression (Abbildung 3.6 C und F) in unterschiedlichen Zellsystemen (Jurkat und K562). Durch Überexpression von murinem Tal1 konnte dieser Anstieg aufgehoben werden (Abbildung 3.10), was TAL1 als reprimierenden Faktor von miR-17-92 in leukämischen Zellen identifiziert. Im Gegensatz dazu zeigte eine Gruppe kürzlich, dass TAL1 in Glioblastom-Zellen einen aktivierenden Effekt auf miR-17-92 zu haben scheint (Cao et al. 2019).

ChIP-Assays dieser Arbeit zeigten, dass TAL1 und E47 in K562-, Jurkat- und CD34<sup>+</sup>-Zellen auf dem *MIR17HG*-Promotor insbesondere im Bereich der TSS, wo sich eine E-Box befindet, aber auch teilweise in einem *Upstream*-Bereich -4000 Basenpaare der TSS binden (Abbildung 3.14). Dabei ist der Bereich kurz vor dem Transkriptionsstart mit aktiven Histonmodifikationen gekennzeichnet (Abbildung 3.15 B-D). An dieser Stelle konnte auch bereits eine MYC Bindestelle identifiziert werden (O'Donnell et al. 2005). *MYC* ist ein bekanntes Zielgen von miR-17-92 und fördert dessen Expression. Die simultane Expression von *MYC* und miR-17-92 tragen zu einem neoplastischen Phänotyp bei. Dieser wird durch die Suppression des pro-apoptotischen Gens *BIM* und anderer regulatorischer Gene begünstigt (Yulin Li et al. 2014). Durch die Promotoranalyse mithilfe eines Luciferase-Reporter-Gen-Assays mit Deletionskonstrukten von 1000, 500 und 250 Basenpaaren Länge konnte demonstriert werden, dass die letzten 250 Basenpaare vor der E-Box die höchste Luciferase-Aktivität hervorrufen (Abbildung 3.17 B und D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in dem kurzen Bereich vor dem Transkriptionsstart aktivierende Faktoren an das *MIR17HG*-Gen binden und dessen Promotoraktivität steigern. Diese Beobachtungen werden durch die aktive H3K4me3 Markierung in diesem Promotorbereich unterstützt (Abbildung 3.15 B-D). Betrachtet man die starke Luciferase-Aktivität, die durch *MYC*-Transfektion induziert wird und selbst durch dreifache TAL1-Konzentration nicht gänzlich inhibiert werden kann (Abbildung 3.18 A), könnte man spekulieren, dass die starke Aktivität des *MIR17HG*-Promotors durch *MYC*-Bindung an der beschriebenen *MYC* Bindestelle in dem kurzen 250 Basenpaar-Promotor-Fragment induziert wird und die TAL1-Bindung an dieser Stelle nicht ausreicht, um die aktivierende Wirkung von *MYC* zu mildern. In den längeren Promotor-Konstrukten hingegen scheinen weitere Faktoren zu binden, die einen inhibitorischen Effekt auf die Promotoraktivität ausüben,

zu denen auch TAL1 beitragen könnte. Die Chromatin-Immunopräzipitation, die TAL1-Bindung an verschiedenen Stellen entlang des gesamten *MIR17HG*-Gens zeigt (Abbildung 9.1), unterstützt diese Vermutung. Außerdem wurde ein ähnliches Experiment von einer Gruppe in Glioblastom-Zellen durchgeführt, das mehrere potentielle Bindestellen für TAL1 auf dem *MIR17HG*-Promotor 1000 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart beschreibt (Cao et al. 2019).

Interessanterweise führte eine Mutation der E-Box in den kürzeren Promotor-Fragmenten, die das Bindemotiv für TAL1 zerstörte, zu einer höheren Luciferase-Aktivität als bei dem Wildtyp-Konstrukt (Abbildung 3.17 C und D). Es lässt sich vermuten, dass durch die TAL1-Bindung an der E-Box vor dem Transkriptionsstart eine leicht inhibitorische Funktion auf die *MIR17HG*-Promotoraktivität ausgeht, die durch die Mutation der E-Box und folglich den Verlust der TAL1-Bindung aufgehoben wird. Eine Mutation der E-Box im 500-Basenpaar-Konstrukt in K562-Zellen weist keinen Unterschied in der Luciferase-Aktivität auf (Abbildung 3.17 C), während die Aktivität in HEK293T-Zellen bei einer Mutation der E-Box sowohl im 500 Basenpaar-Konstrukt als auch im 250-Basenpaar-Konstrukt erhöht wird (Abbildung 3.17 D). Dieser Unterschied zwischen den beiden Zellsystemen ist ein Hinweis darauf, dass die Aktivierung von *MIR17HG* durch weitere intrinsische Faktoren verursacht werden könnte, die im Promotorbereich binden und in diesem Versuchsaufbau nur in K562-Zellen vorhanden sind. HEK293T-Zellen stellen ein recht artifizielles System dar, da sie kein endogenes TAL1 exprimieren.

In einer weiterführenden Promotoranalyse konnte festgestellt werden, dass E47 die Promotoraktivität steigert, während diese durch Kotransfektion von TAL1 dosisabhängig wieder verringert werden konnte (Abbildung 3.17 E). Es ist bekannt, dass in Anwesenheit von TAL1 die Bildung eines Heterodimers von E-Proteinen favorisiert wird (H. L. Hsu et al. 1994). Außerdem wurde von einer anderen Arbeitsgruppe postuliert, dass das TAL1/E47-Heterodimer transkriptionell weniger aktiv ist, verglichen mit einem E47/E47 Homodimer (Park and Sun 1998). Folglich scheint TAL1 einen reprimierenden Effekt auf E47 zu haben, was auch dazu beiträgt, dass TAL1 eine tumorfördernde Wirkung hat, während E47 mit tumorsupprimierenden Eigenschaften in Verbindung gebracht wird (Bain et al. 1997; W. Yan et al. 1997).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der Transkriptionsfaktor TAL1 durch Bindung auf dem *MIR17HG*-Promotor Einfluss auf die Expression des miR-17-92 Clusters nimmt und dessen Transkription hemmt, was zumindest teilweise mit einem Eingriff in die Aktivität des E47/E47 Homodimers einhergeht. Außerdem inhibiert miR-17-92 die TAL1 Expression sowie dessen Interaktionspartner des pentametrischen Komplexes, was zu Veränderungen der Proteinkonformationen führt und folglich zu einer veränderten Expression von TAL1-Zielgenen. Folglich beeinflussen sich TAL1 und miR-17-92 gegenseitig, indem sie die Expression des jeweils anderen hemmen.

Dass miR-17-92, so wie viele andere miRNAs, regulatorische Schleifen mit anderen Proteinen bildet, konnte bereits in weiteren Studien belegt werden. Das Homeobox-Protein NKX3-1, ein Tumorsuppressor in Prostatakrebs, wurde beispielsweise als direktes miR-17-92-Zielgen identifiziert. In einer Promotoranalyse von *MIR17HG* reprimierte NKX3-1 die transkriptionelle Aktivität von *MIR17HG*, während ein *Knockdown* von NKX3-1 zu einer erhöhten miR-17-92 Expression führte. Des Weiteren hat TAL1 eine aktivierende Wirkung auf NKX3-1. Weiterhin konnte dieses Protein die Proliferation von verschiedenen T-ALL Zelllinien teilweise wiederherstellen, nachdem sie durch TAL1 *Knockdown* beeinträchtigt wurde (Kusy et al. 2010). Im Anbetracht dieser publizierten Daten ist es nicht überraschend, dass NKX3-1 auch in den Ergebnissen der Massenspektrometrie der vorliegenden Arbeit herunterreguliert vorgefunden werden konnte (Abbildung 9.2).

Eine regulatorische Schleife zwischen TAL1 und einer miRNA konnte auch in anderen Studien bereits belegt werden. MiR-146b ist beispielsweise eine miRNA, die negativ von TAL1 reguliert wird und antitumorigene Eigenschaften mit sich bringt, wie geringere Invasion und Migration. In TAL1 positiven T-ALL Proben ist miR-146b herunterreguliert, während sie in gesunden T-Zellen und CD34<sup>+</sup>-Zellen stärker exprimiert ist (Nádia C. Correia et al. 2016). In diesem Zusammenhang konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden, dass miR-17-92 in T-Zellen von verschiedenen gesunden Spendern deutlich höher exprimiert ist als TAL1, während in der T-ALL Zelllinie Jurkat der umgekehrte Fall vorliegt, nämlich hohe TAL1 und geringe miR-17-92 Expression (Abbildung 9.3). Entsprechend könnte man vermuten, dass TAL1 in T-ALL-Zellen hochreguliert wird, was wiederum zu einer Repression von miR-17-92 führt. Dadurch könnte die normale T-Zell-Differenzierung beeinträchtigt werden, was die Progression eines malignen T-Zell-Phänotyps fördern würde. Diese Vermutung wird durch eine Veröffentlichung unterstützt, die miR-17-92 als einen wichtigen Regulator in verschiedenen Stadien der T-Zell-Entwicklung beschreibt (Regelin et al. 2015).

Eine weitere Studie beschreibt die positive Korrelation zwischen TAL1 und der miRNA miR-223. TAL1 fördert die Expression von miR-223, die den Tumorsuppressor FBXW7 inhibiert, und dadurch eine bösartige Veränderung in T-ALL hervorruft (Mansour et al. 2013). Einen Einfluss von miR-17-92 auf FBXW7 konnte in den Daten der Massenspektrometrie der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gefunden werden.

Die Daten in dieser Arbeit deuten jedoch sehr stark auf eine gegenseitige Regulation von TAL1 und miR-17-92 hin und lassen die Existenz einer regulatorischen Schleife vermuten.

### 4.3 MiR-19 aus dem miR-17-92 Cluster inhibiert die TAL1 Expression

MiR-17-92 kodiert für sechs reife miRNAs, die alle für unterschiedliche Funktionen bekannt sind (Kapitel 1.5). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass *TAL1* ein direktes Zielgen von miR-17-92 ist. Eine genauere Analyse der 3'-UTR von *TAL1*, welche einige Bindestellen für miRNAs des miR-17-92 Clusters enthält, rückte miR-19 in den Fokus des Interesses, da durch eine Mutation der miR-19 Bindestelle auf der *TAL1*-3'-UTR die Inhibition auf die posttranskriptionelle Aktivität von *TAL1* aufgehoben werden konnte (Abbildung 3.5 D). Darüber hinaus konnte das *TAL1* Protein durch miR-19a Überexpression in K562-Zellen reduziert werden. Durch die Mutation der *Seed*-Sequenzen der miR-19a, miR-19b und beider *Seed*-Sequenzen zugleich (miR-19a/b) in Jurkat-Zellen konnte miR-19b als relevante miRNA für die *TAL1*-Repression detektiert werden (Abbildung 3.12). Dieses Ergebnis war überraschend, da miR-19a und miR-19b über die gleiche *Seed*-Sequenz verfügen und sich ansonsten nur in einer Base unterscheiden (Abbildung 1.6). Durch die identische *Seed*-Sequenz erwartet man, dass die beiden miRNAs an die gleichen Zielgene binden. Mithilfe des miR-17-92 Cluster *Real-Time* PCR Assay Kits (Signosis) war es möglich, die endogene Expression der einzelnen reifen miRNAs von miR-17-92 in verschiedenen Zellsystemen zu überprüfen. Interessanterweise stellte sich heraus, dass miR-19a und miR-19b in HEK293T-, K562-, Jurkat- und CD34<sup>+</sup>-Zellen am stärksten exprimiert werden, wobei die Expression der miR-19b die der miR-19a noch einmal um etwa das dreifache übersteigt (Abbildung 3.13). Daraus könnte man schlussfolgern, dass die unterschiedlichen Mengen der miRNAs einen Grund für die Diskrepanz in ihrem Effekt auf das *TAL1* Proteinlevel (Abbildung 3.12 A) darstellen. Weiterhin ist es überraschend, dass eine zielgerichtete induzierte Überexpression von miR-19a in K562-Zellen das *TAL1* Proteinlevel reduziert (Abbildung 3.5 E), während in Jurkat-Zellen die Mutation der miR-19a *Seed*-Sequenz ohne Effekt blieb (Abbildung 3.12 A). Um dieser Beobachtung weiter auf den Grund zu gehen, könnte man in einem weiterführenden Experiment miR-19b in K562-Zellen überexprimieren und einen Western Blot mit einem *TAL1* Antikörper, ähnlich wie in Abbildung 3.5 E durchführen. Möglicherweise würde der inhibitorische Effekt auf die *TAL1* Proteinexpression noch stärker ausfallen, als durch die miR-19a Überexpression. Jedoch muss bedacht werden, dass es sich bei diesen beiden Zelllinien um sehr unterschiedliche Zelltypen handelt, was ebenfalls einen großen Einfluss auf die experimentellen Ergebnisse haben kann. Im Gegensatz zur T-ALL Zelllinie Jurkat, besitzen K562-Zellen erythroide Faktoren, die insbesondere im Zusammenhang mit *TAL1* eine wichtige Rolle spielen könnten und Auswirkungen auf das Resultat nehmen können.

Jedoch können in der Literatur einige Beispiele gefunden werden, in denen sich eine ähnliche Diskrepanz zwischen miR-19a- und miR-19b-Zielgenen verzeichnen lässt. Es konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression von miR-19b in verschiedenen



menschlichen Krebszelllinien zu einer Reduktion des Proteinlevels des bekannten Tumorsuppressors p53 führt, was mit einem verstärkten tumorigenen Phänotyp in Form von erhöhter Migration und Invasion und verringerter Apoptose einherging. Diese Effekte konnten durch eine Überexpression von miR-19a nicht erreicht werden (Fan et al. 2014). Umgekehrt bindet p53 an den Promotor von *MIR17HG* und reprimiert die Expression des miR-17-92 Clusters, wodurch die Apoptose erhöht (H. L. Yan et al. 2009) und die tumorfördernde Aktivität von miR-17-92 kontrolliert wird. Ähnliche Ergebnisse konnte eine andere Studie über die Wirkung von miR-19b auf die positive Regulation von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) sowie die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine berichten (Gantier et al. 2012). In diesem Zusammenhang demonstrierte eine Arbeitsgruppe unverzichtbare Funktionen von miR-19b in T-Zellen. MiR-19b und interessanterweise auch miR-17 waren in der Lage, die Proliferation von miR-17-92-defizienten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu steigern, während eine induzierte Expression von miR-19a ohne Effekt blieb. Außerdem konnte miR-19b die Produktion von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in miR-17-92-defizienten Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) und infolgedessen die Th1-abhängige inflammatorische Immunantwort steigern (Jiang et al. 2011). MiR-19a hingegen scheint die mRNA von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) zu binden und negativ zu beeinflussen, während eine Hemmung von miR-19a durch Antisense-Oligonukleotide zu einem 12-fachen Anstieg von TNF- $\alpha$  führte (M. Liu et al. 2011). Die Daten der vorliegenden Arbeit sowie die aufgeführten Beispiele aus der Literatur beweisen, dass es weitere Mechanismen geben muss, mit denen miRNAs ihre Zielgene erkennen und binden können, abgesehen von der komplementären Bindung zwischen der *Seed*-Sequenz mit der Ziel-mRNA. Über diese Mechanismen ist bisher jedoch noch nichts bekannt und lässt nur Spekulationen zu. Möglicherweise ist die Bindung weiterer Faktoren an der Ziel-mRNA notwendig, damit die richtige miRNA ihr Zielgen findet. Eine weitere Theorie ist, dass die *Loop*-Sequenz der pre-miRNA an der Erkennung der Zielsequenz beteiligt ist. Dieses Phänomen konnte bereits für miR-181a-1 und miR-181c gezeigt werden, die sich auch in ihrer reifen Form in nur einem Nukleotid außerhalb der *Seed*-Region unterscheiden, und verschiedene Effekte auf die Entwicklung doppelt positiver T-Zellen haben. Ein Nukleotid-Austausch innerhalb der *Loop*-Region der pre-miRNA veränderte die Wirkung der miRNA auf die T-Zell-Entwicklung (G. Liu et al. 2008). Betrachtet man die Sequenz des miR-17-92-Vorläufers (Abbildung 9.4), so fällt auf, dass miR-19a und miR-19b in ihrer *Loop*-Region durchaus variieren. Ein *Alignment* der beiden pre-miRNAs ergab eine Identität von 66% laut dem *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sodass diese Unterschiede in der Vorläufer-miRNA eine Erklärung für die Diversität in ihrer Wirkung auf TAL1 sein könnten. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *TAL1* ein direktes Zielgen der miR-19 aus dem miR-17-92 Cluster ist, die auf der *TAL1*-mRNA zu binden scheint und zur teilweisen Proteindegradation von TAL1 führt. Dieser Effekt wird in dem

experimentellen Aufbau dieser Arbeit in Jurkat-Zellen durch miR-19b vermittelt, während die Repression in K562-Zellen durch miR-19a induziert wird. Ob diese Diskrepanz zelltypspezifisch ist oder an den Bedingungen der Experimente lag, kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht definitiv gesagt werden. Weitere zuvor beschriebene Experimente könnten darüber mehr Aufschluss geben.

#### **4.4 MiR-17-92 beeinflusst über TAL1 die Differenzierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen**

TAL1 ist ein hämatopoetischer Transkriptionsfaktor, dessen Präsenz für die embryonale erythroide Linienentwicklung unverzichtbar ist. Dies konnte anhand eines Maus-*Knockout*-Modells bewiesen werden. Diese TAL1 *Knockout*-Maus ist embryonal letal und kann keinerlei Blutgefäße während der Embryonalentwicklung ausbilden (Shivdasani, Mayer, and Orkin 1995). Daher lag die Vermutung nahe, dass durch die etwa 40%ige Reduktion von TAL1 durch miR-17-92 auch ein Effekt auf die Differenzierung in primären CD34<sup>+</sup>-Zellen in einem CFU-Assay zu beobachten ist. Eine Überexpression des miRNA Clusters in CD34<sup>+</sup>-Zellen führte nicht nur zu einer Reduktion der erythroiden Kolonien (Abbildung 3.20 A-B), es ließen sich darüber hinaus deutliche Unterschiede in der Intensität der Rotfärbung der erythroiden Kolonien (Abbildung 3.20 C) sowie ein negativer Einfluss auf die Expression spezifischer erythroider Marker wie GPA (CD235a) und CD71 verzeichnen (Abbildung 3.20 D-F).

Die Wichtigkeit von TAL1 für die erythroide Differenzierung im Rahmen eines CFU-Assays konnte anhand eines TAL1 *Knockdowns* in CD34<sup>+</sup>-Zellen belegt werden. Ein direkter *Knockdown* von TAL1 führte erwartungsgemäß zu einer deutlich stärkeren Reduktion des Proteins als die Inhibition durch miR-17-92, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, was entsprechend zu signifikant weniger BFU-E Kolonien beitrug (De La Grange et al. 2006). Umgekehrt bewirkte eine Überexpression von TAL1 in CD34<sup>+</sup>-Zellen einen deutlichen Anstieg von erythroiden Kolonien im CFU-Assay, wobei es auffällig war, dass insbesondere die Anzahl der reiferen CFU-Es im Vergleich zu den unreiferen BFU-Es höher war. Außerdem stieg die Expression des erythroiden Oberflächenmarkers GPA in TAL1 überexprimierenden CD34<sup>+</sup>-Zellen (Ravet et al. 2004). Diese Beobachtungen unterstützen die Daten der vorliegenden Arbeit und beweisen, dass TAL1 die Ausbildung von erythroiden Kolonien im CFU-Assay maßgeblich beeinflusst.

In der Literatur finden sich einige Hinweise darauf, dass miR-17-92 eine Rolle in der Differenzierung und Proliferation von hämatopoetischen Zellen innehat. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von miR-17-92 in Mäusen zu einer Expansion der multipotenten Progenitorzellen führt (Yanmei Li et al. 2012). Diese Studie zeigte in einem CFU-Assay mit Milz- und Knochenmarkzellen aus den miR-17-

92-injizierten Mäusen einen Anstieg von granulozytären, megakaryozytären und erythroiden Kolonien. Ähnlich konnte miR-17-92 auch in humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen ein positiver Effekt auf die Kolonienausbildung im CFU-Assay zugesprochen werden, indem durch Verwendung des miR-17-92-Inhibitors MIR17PTi (Morelli et al. 2018) die Ausbildung der Kolonien beeinträchtigt war (Brinkmann et al. 2019).

Weiterhin wurde eine aberrante Expression von miR-17-92 in CML-Zellen, die sich in chronischer Phase befanden, detektiert, weitaus weniger jedoch in CML-Zellen der Blastenkrise (Venturini et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig demonstriert werden, dass die erythroide Differenzierung sekundär über die reprimierende Wirkung von miR-17-92 auf TAL1 beeinflusst werden kann. Außerdem zeigen die Daten, dass sich TAL1 und miR-17-92 gegenseitig negativ regulieren (Abbildung 3.10). MiR-17-92 Expression wird vorwiegend in HSCs und Vorläuferzellen beobachtet, während es im Laufe der Differenzierung herunterreguliert wird (Pospisil et al. 2011; Y. Yan et al. 2016). So kann davon ausgegangen werden, dass miR-17-92 während der erythroiden Differenzierung herunterreguliert wird, während die TAL1-Aktivität zunimmt. In ST-HSCs, MPPs und linien-spezifischen Vorläufern ist miR-17-92 jedoch essentiell, wie anhand eines konditionellen miR-17-92 *Knockout*-Modells in Mäusen demonstriert werden konnte. Die verminderte Anzahl dieser Vorläuferzellen konnte einer verstärkten Apoptose zugeschrieben werden, da der Verlust von miR-17-92 zu einem Anstieg seines direkten Zielgens *BIM*, einem Apoptose-induzierenden Faktor, führte (Brinkmann et al. 2019). Entscheidend bei der erythroiden Differenzierung, die durch TAL1 bedingt wird, scheint das Verhältnis zwischen miR-17-92 und TAL1 zu einer bestimmten Zeit und zu einem bestimmten Differenzierungsstadium zu sein.

#### 4.5 CD4 ist ein weiteres Zielgen von miR-17-92

In den Ergebnissen der Massenspektrometrie war es auffällig, dass der Immunzell-spezifische Oberflächenmarker CD4, der insbesondere für seine Expression auf T-Helferzellen und seine Funktion bei der Erkennung von *Major Histocompatibility complex* (MHC)-Klasse II Molekülen und der Aktivierung der adaptiven Immunantwort bekannt ist, am stärksten herunterreguliert vorgefunden werden konnte (Abbildung 3.21 A). Auch die Messung der *CD4*-mRNA sowie die Detektion von CD4 durch Durchflusszytometrie ergaben eine Reduktion nach miR-17-92 Überexpression (Abbildung 3.21 B-D). Da dieses Ergebnis erst sieben Tage nach Transduktion verzeichnet werden konnte, jedoch nicht in den ersten Tagen nach der Transduktion, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt auf CD4 noch von weiteren Faktoren abhängt und nicht durch miR-17-92 direkt verursacht wird.

Im Gegensatz zu den Daten der Massenspektrometrie wurde miR-17-92 in einer Studie als treibender Faktor der tumor-supprimierenden Funktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

beschrieben. In einem Transplantationsexperiment mit Melanomzellen in CD4<sup>+</sup> konditionellen miR-17-92 *Knockout*-Mäusen konnte demonstriert werden, dass das Tumorwachstum in sowohl homozygoten als auch heterozygoten miR-17-92 *Knockout*-Mäusen signifikant schneller war als in Wildtyp-Mäusen. Dies ließ sich auf eine beeinträchtigte Th1-Immunantwort und eine geringere IFN- $\gamma$ -Produktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in miR-17-92 *Knockout*-Zellen zurückführen. Darüber hinaus war die Fähigkeit in miR-17-92-defizienten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu unterstützen, deutlich verringert (Jiang et al. 2011).

Im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte auf dem *CD4-Enhancer* im Bereich einer konservierten doppelten E-Box sowohl TAL1- als auch E47-Bindung identifiziert werden (Abbildung 3.22). Bei der STRING-Analyse der in der Massenspektrometrie herunterregulierten Proteine konnte jedoch keine Verbindung zwischen TAL1 und CD4 im humanen System gefunden werden (Abbildung 9.5). Des Weiteren zeigte eine qRT-PCR Analyse, dass die *CD4*-mRNA nach *TAL1 Knockdown* steigt (Abbildung 3.22 D), was darauf hindeutet, dass TAL1 CD4 inhibiert. Diese Daten stehen jedoch im Widerspruch mit der Reduktion von CD4 durch miR-17-92 Überexpression, mit der auch die Herunterregulation von TAL1 einhergeht.

Man könnte spekulieren, dass die Inhibition von TAL1, die von miR-17-92 induziert wird, nicht ausreichend ist, um die Repression auf CD4, die von TAL1 auszugehen scheint, aufzuheben. Ein *Knockdown* von TAL1 durch eine spezifische shRNA hingegen führt zu einer stärkeren TAL1-Reduktion. Nicht zuletzt nimmt die Überexpression von miR-17-92 Einfluss auf sehr viele andere Faktoren (Abbildung 9.13), die an der Reduktion von CD4 beteiligt sein könnten.

In einer ähnlichen Studie im murinen System konnte jedoch die Bindung des TAL1/E47-Heterodimers am *CD4-Enhancer* durch Chromatin-Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte diese Gruppe auch einen inhibitorischen Effekt von TAL1 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in präleukämischen TAL1<sup>+</sup>-Thymozyten von Mäusen nachweisen (O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C 2004). Interessanterweise lässt sich zusammen mit TAL1 der Korepressor mSin3A am *CD4-Enhancer* finden, ebenso wie HDAC1, die ebenfalls bekanntlich eine reprimierende Wirkung auf die Genexpression hat. In den Thymozyten von Wildtyp-Mäusen, die kein TAL1 in den Thymozyten exprimieren, konnte hingegen vermehrt eine Anreicherung des Koaktivators p300 detektiert werden, der mit der Interaktion mit E-Proteinen in Verbindung gebracht wird (Eckner R, Yao TP, Oldread E 1996).

Diese Studien unterstützen die Daten in dieser Arbeit, die in TAL1<sup>+</sup>-T-ALL-Zellen (Jurkat) durchgeführt wurden, ein molekularer Hintergrund, der mit den TAL1<sup>+</sup>-Thymozyten der Studie vergleichbar ist.

Die komplexen Funktionen von TAL1 sind sehr divers und abhängig von vielen Faktoren. Im Falle der CD4 Expression in Thymozyten wird deutlich, dass auch der Zelltyp einen entscheidenden Einfluss auf die TAL1 Eigenschaften nimmt. Während TAL1 in der myeloiden Linie als Masterregulator der Erythrozyten-Differenzierung die

Genexpression erythroider Gene durch Rekrutierung von Koaktivatoren fördert, so verhindert er in der lymphoiden Linie die Expression von CD4 und anderen Differenzierungsgenen, die durch das E47-Homodimer unter physiologischen Voraussetzungen angetrieben werden. Da die Bildung des Heterodimers zwischen TAL1 und E47 eine höhere Affinität hat als ein E-Protein-Homodimer, verdrängt TAL1 dieses. Das Heterodimer weist jedoch nur 10% der transkriptionellen Aktivität des Homodimers auf (H. L. Hsu et al. 1994). Die T-Zell-spezifischen Differenzierungsgene können nicht ausreichend exprimiert werden. Folglich kommt es zu einem Differenzierungsstopp und zur Ausbildung eines malignen T-Zell-Phänotyps mit aberranter TAL1 Expression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Daten der vorliegenden Arbeit einen inhibierenden Effekt von miR-17-92 auf den Oberflächenmarker CD4 verzeichnen lassen. Dieser scheint jedoch nicht im Zusammenhang mit der Bindung des TAL1/E47-Heterodimers am *CD4-Enhancer* zu stehen, dessen Expression in Anwesenheit von TAL1 durch Rekrutierung von Korepressoren inhibiert wird, was die Differenzierung reifer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verhindert und somit zu einem leukämischen Phänotyp mit unreifen Thymozyten beiträgt. Da miR-17-92 auch mit vielen hämatologischen Pathologien assoziiert wird, könnte man spekulieren, dass die Überexpression des miRNA Clusters durch die Inhibition von CD4 ebenfalls zu einem malignen Zellwachstum in der lymphoiden T-Zelllinie beiträgt.

#### **4.6 Altersabhängige Methylierung des *MIR17HG*-Promotors beeinflusst die miR-17-92 Expression**

Epigenetische Regulation beeinflusst die Genexpression hämatopoetischer Gene und nimmt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Linienentscheidung ein, indem sie durch DNA-Methylierung (1.3.3) und Histonmodifikationen (1.3.2) spezifische Differenzierungsgene zur richtigen Zeit stilllegt oder aktiviert. Das epigenetische Profil einer HSC verändert sich im Laufe ihres Lebens und somit auch ihr Selbsterneuerungspotential. Je mehr Zellteilungen eine Zelle durchläuft und je älter sie wird, desto anfälliger wird sie für Mutationen, insbesondere im Bereich der CpGs (Elango et al. 2008). Durch Desaminierung kann es zu einem Basenaustausch kommen von Cytosin zu Urazil oder von methyliertem Cytosin zu Thymin, was einen Verlust der DNA-Methylierung zur Folge hat. Da sich vor dem TSS des *MIR17HG*-Gens eine große CpG-Insel befindet, die in vielen Bereichen potentiell methyliert vorliegt, lag die Vermutung nahe, dass die Expression des miR-17-92 Clusters durch den Methylierungszustand dieser CpG-Insel kontrolliert wird. Eine Veränderung des Methylierungsmusters durch den Alterungsprozess könnte einen Einfluss auf die physiologische miR-17-92 Expression haben und den Übergang zur onkogenen Expression begünstigen. Da in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden konnte,

dass miR-17-92 und TAL1 eine regulatorische Schleife in der Hämatopoese bilden, bestand die Hypothese, dass diese altersabhängige Veränderung des Methylierungsmusters des *MIR17HG*-Gens nicht nur Einfluss auf die miR-17-92 Expression, sondern folglich auch auf die TAL1 Expression nimmt.

Es stellte sich heraus, dass T-Zellspender über 48 Jahre eine höhere miR-17-92 Expression aufweisen, als Spender unter 32 Jahren (Abbildung 3.23 C). Außerdem konnte die miR-17-92 Expression durch Inhibition der Methylierung gesteigert werden (Abbildung 3.23 D). Jedoch ließ sich keine altersabhängige TAL1 Expression verzeichnen (Abbildung 3.23 B) sowie keine Korrelation zwischen TAL1 und miR-17-92 herstellen. Da TAL1 unter physiologischen Bedingungen in den T-Zellen gar nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert wird, würde die Verwendung eines anderen Zellsystems wie beispielsweise CD34<sup>+</sup>-HSCs oder TAL1<sup>+</sup>-T-ALL Proben eventuell mehr Informationen geben.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die stark methylierten CpGs des *MIR17HG*-Gens eine zu hohe miR-17-92 Expression verhindern sollen. Möglicherweise lässt dieser starke Methylierungszustand durch altersbedingte Mutationen an den CpGs im Alter nach, was zu erhöhter miR-17-92 Transkription führt. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit einer aberranten miRNA Expression, was zu malignen Phänotypen ausufern kann. Die Tatsache, dass das Risiko für onkogene Genexpression und Mutationen der Kontrollprogramme des Zellzyklus mit zunehmendem Alter steigt (Armitage and Doll 1954), unterstützt diese Theorie.

In einer Studie konnte miR-20a als Seneszenz-induzierender Faktor in Mausfibroblasten identifiziert werden (Poliseno et al. 2008). Das Protoonkogen *Leukemia related factor* (LRF) wird von miR-20a inhibiert, was wiederum p19ARF und p16 hochreguliert und E2F1, ein bekanntes miR-20a-Zielgen (O'Donnell et al. 2005), herunterreguliert. Im Gegensatz dazu demonstrierte eine andere Gruppe, dass miR-17, miR-19b, miR-20a und miR-106a mit fortschreitendem Alter in verschiedenen experimentellen Modellen herunterreguliert vorlagen. Dies konnte sowohl in Zellsystemen, die replikatives Alter demonstrieren sollten, als auch in Zellen, die das Alter eines Organismus darstellten, verdeutlicht werden (Hackl et al. 2010). MiR-17-92 ist in weitere Prozesse verwickelt, die mit Alterung und Seneszenz assoziiert werden. Durch miR-17-92 Überexpression können beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* (ROS)) sowie DNA-Schädigungen verhindert werden (Ebi et al. 2009).

Diese Daten zeigen, dass eine Zelltyp-spezifische Funktion von miR-17-92 auf die Seneszenz möglich ist, was die Diskrepanz zwischen der erhöhten miR-17-92 Expression in älteren T-Zellspendern der vorliegenden Arbeit und der Entdeckung von Hackl und Kollegen (2010) erklären könnte. Um herauszufinden, ob die höhere miRNA Expression in älteren Spendern tatsächlich auf eine altersbedingte geringere Methylierung der CpG-Insel zurückzuführen ist, müssten weiterführende Experimente durchgeführt werden, um den Methylierungsstatus der einzelnen Proben genau zu

analysieren. Eine Analyse der miR-17-92 und TAL1 Expression in HSCs von jungen und alten Spendern könnte mehr Aufschluss über die epigenetische Regulation der beiden Faktoren während des Alterungsprozesses geben. Darüber hinaus wäre die Untersuchung von T-ALL Proben möglicherweise vielversprechend. Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass leukämische Zellen sehr divers sind und sich ein Vergleich daher als schwierig erweisen könnte. Eine Unterscheidung der T-ALL Proben in TAL1<sup>+</sup> und TAL1<sup>-</sup> könnte hilfreich sein. Außerdem wäre eine Analyse auf Einzelzellbasis denkbar.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Methylierungsmuster des *MIR17HG*-Gens durchaus Einfluss auf die Expression von miR-17-92 nimmt und sich dieses im Alter verändern kann. In dem experimentellen Aufbau dieser Arbeit besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen der miR-17-92 und der TAL1 Expression.

#### **4.7 MiR-17-92 und TAL1 als mögliche Ziele in der klinischen Anwendung**

Da miR-17-92 und TAL1 beide essentielle Einflüsse auf die Hämatopoese haben, beide Faktoren aber auch onkogenes Potential entwickeln können, liegt die Vermutung nahe, dass man sich den regulatorischen Einfluss der beiden Faktoren aufeinander in der klinischen Anwendung zu Nutze machen könnte.

Es gibt bereits Studien, in denen die reifen miRNAs des miR-17-92 Clusters als Ziel in der Krebstherapie verwendet wurden. Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, wird miR-17-92 in der frühen Phase von CML überexprimiert (Venturini et al. 2007). Schon im Jahre 2007 testeten Scherr und Kollegen (2007) Antagomire gegen miR-18a, miR-19b und miR-20a mithilfe eines miRNA-spezifischen Reporter-Assays in der CML Zelllinie K562 und konnten einen erfolgreichen und spezifischen Antagonismus der endogenen miRNAs postulieren. Außerdem wurde durch die Überexpression von miR-20a eine Reduktion des Transkriptionsfaktors E2F1, ein bekanntes miR-20a-Zielgen, erzielt. Zugabe des Anti-miR-20a Antagomirs führte hingegen zu einer dosisabhängigen Steigerung der E2F1 Expression (Scherr et al. 2007). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass miR-17-92 ein potentielles Zielgen in der Therapie gegen CML darstellen könnte.

In Kapitel 1.5 wurde beschrieben, dass das miR-17-92 Cluster auch physiologische und unverzichtbare Funktionen ausübt, unter anderem fördert es die Proliferation von Herzmuskelzellen und kann auch Schutz vor einem Myokardinfarkt geben (J. Chen et al. 2013). Nun konnte kürzlich der Beweis geliefert werden, dass miR-19a und miR-19b aus dem miR-17-92 Cluster eine entscheidende Rolle in der Regeneration von Herzmuskelzellen nach einem Myokardinfarkt einnehmen. Eine direkte Injektion von miR-19a/miR-19b *mimics* ins Herz von Mäusen nach einem induzierten Myokardinfarkt reduzierte das Ausmaß apoptotischer Herzmuskelzellen, verbesserte die Herzfunktion

und das Überleben der Versuchstiere und verkleinerte das Narbengewebe im Herzen nach dem Myokardinfarkt. Eine Überexpression von miR-19a und miR-19b durch Adeno-assoziierte Viren (AAV)-basierten Gentransfer erzielte die gleichen Effekte wie die Verwendung von miR-19a/miR-19b *mimics* (Gao et al. 2019). Diese Studie stellt einen ersten interessanten Ansatz für die Anwendung von miR-19a und miR-19b in der Prävention, Therapie und Regeneration von Myokardinfarkten dar.

In diesem Zusammenhang ist es denkbar, die anti-apoptotischen Eigenschaften von miR-17-92 durch Repression des pro-apoptotischen Proteins BIM in weiteren regenerativen Behandlungen von degenerativen Erkrankungen zu nutzen. Denkbar wäre hierbei eine zelltyp-spezifische Expression von miR-17-92 in Nervenzellen bei der Behandlung von beispielsweise Parkinson, verschiedenen Demenzformen oder Huntington.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte beschrieben werden, dass *TAL1* ein direktes Zielgen von miR-19 darstellt. Außerdem konnte über miR-17-92 eine Veränderung der TAL1-vermittelten Differenzierung in CD34<sup>+</sup>-Zellen erzielt werden. Es wäre denkbar, dass man durch den Einsatz eines miR-19-Antagomirs die TAL1 Expression gezielt steigern und somit Einfluss auf die erythroide Differenzierung nehmen könnte. Dies könnte ein interessanter Ansatz im Rahmen der Erythrozyten-Herstellung aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) sein. Dabei würde die spezifische Inhibition von miR-19 anstelle des gesamten miR-17-92 Clusters eine Reduktion der Nebenwirkungen zur Folge haben. Da miR-19 jedoch auch onkogenes Potential besitzt, wäre es notwendig zelltypspezifische synthetische miRNAs zu entwickeln, die beispielsweise nur jene Zellen tangieren, die in die erythroide Linie ausdifferenzieren sollen. Im Falle einer Therapie gegen T-ALL wäre es denkbar, miR-19 nur in leukämische T-Zellen einzubringen, die TAL1 exprimieren und einen veränderten Phänotyp aufweisen. Durch eine solche zellspezifische Herangehensweise würden alle anderen hämatopoetischen Zellen verschont bleiben und ihrer normalen Funktion nachgehen können. Im Hinblick auf miR-17-92 Inhibition gibt es bereits einen Inhibitor, MIR17PTi, der die pre-miRNA degradiert und somit die Prozessierung der reifen miRNAs verhindert. Er konnte in humanen Zellen des multiplen Myeloms Apoptose induzieren sowie tumor-supprimierende Funktionen im Mausmodell mit tolerierbaren Nebenwirkungen nachweisen (Morelli et al. 2018). In Anbetracht der Regulation zwischen TAL1 und miR-17-92 wäre eine Inhibition des miRNA Clusters durch MIR17PTi denkbar, um die TAL1 Expression im Zusammenhang mit Erythrozyten-Differenzierung zu steigern. Eine innovative Methode zur Repression spezifischer miRNAs ist die Verwendung von *miScript Target Protectors*. Diese einzelsträngigen RNAs binden spezifisch an die Ziel-mRNA einer bestimmten miRNA und verhindern so die Degradation des Zielgens. Man könnte vermuten, dass man diese *miScript Target Protectors* spezifisch für die miR-19b und miR-20a Bindestelle *designen* und somit die Reduktion des Tumorsuppressors PTEN in der Krebstherapie verhindern könnte. Auch die Degradation des Apoptose-fördernden Proteins BIM könnte so in



veränderten Zellen verhindert und die Apoptose dieser malignen Zellen gesteigert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass miR-17-92 und TAL1 in vielerlei Hinsicht Anwendung in der Klinik finden. Ihre vielfältigen Funktionen in der primitiven und adulten Hämatopoese sowie ihre Eigenschaften als Onkogene lassen viele Möglichkeiten für die Verwendung dieser Faktoren als Zielgene in einer Therapie gegen Krebs, in degenerativen Erkrankungen, der Erythrozyten-Herstellung sowie als Biomarker in der prognostischen Medizin zu. Die Erkenntnis, TAL1 über miR-17-92, beziehungsweise miR-17-92 über TAL1 zu beeinflussen, ist eine innovative Möglichkeit, die weiterer Studien bedarf und zukünftig bei der Entwicklung von zielgerichteten miRNA-basierten Therapien in Betracht gezogen werden sollte.

## 5 Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich festhalten, dass mit der vorliegenden Arbeit eine regulatorische Schleife zwischen dem Transkriptionsfaktor TAL1 und dem miR-17-92 Cluster beschrieben werden konnte. Beide Faktoren spielen eine wichtige physiologische Rolle im Zusammenhang mit der Hämatopoese und sind essentiell für die korrekte embryonale Entwicklung, können aber auch onkogene Eigenschaften aufweisen, sobald ihre Expression nicht mehr streng kontrolliert abläuft. Eine Überexpression von miR-17-92 führt zu einer Veränderung der Konformation des TAL1-Komplexes, was wiederum das Verhältnis zwischen TAL1 und E-Proteinen aus dem Gleichgewicht bringt. In dem verwendeten leukämischen Zellsystem kann die Reduktion von TAL1 durch die vermehrte E-Protein-Homodimer Bildung zu einem weniger malignen Phänotyp führen. Unter physiologischen Bedingungen jedoch lässt sich vermuten, dass die regulatorische Schleife zwischen TAL1 und miR-17-92 engmaschig reguliert werden und strengen Kontrollsystemen unterliegen muss, um eine aberrante Expression einer der beiden Faktoren zu verhindern. Wichtig ist hierbei sicherlich, dass die Expression der Faktoren zeitlich und auch räumlich kontrolliert abläuft, da der Übergang von physiologischen zu pathologischen Eigenschaften von TAL1 und miR-17-92 sehr nah beieinander liegt und kleine Veränderung im Expressionsmuster ausreichen können, um eine maligne Transformation hervorzurufen. Um das genaue Zusammenspiel von TAL1 und miR-17-92 während der Hämatopoese besser zu verstehen und um zu analysieren, in welchem Differenzierungsstadium beide Gene in welchem Verhältnis zueinander exprimiert werden, müssen weitere Studien beispielsweise auf Einzelzellbasis durchgeführt werden. Abschließend lässt sich festhalten, dass weitere Erkenntnisse über die regulatorische Schleife zwischen TAL1 und miR-17-92 Aufschluss über die embryonale Differenzierung geben und im Falle einer Fehlregulation in Leukämien zur Entwicklung von weiteren Therapien beitragen kann.

## 6 Referenzen

- Ahmad, Kami, and Steven Henikoff. 2002. "The Histone Variant H3.3 Marks Active Chromatin by Replication-Independent Nucleosome Assembly." *Molecular Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00542-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00542-7).
- Anokye-Danso, Frederick, Chinmay M. Trivedi, Denise Juhr, Mudit Gupta, Zheng Cui, Ying Tian, Yuzhen Zhang, et al. 2011. "Highly Efficient MiRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency." *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.001>.
- Aplan, P D, C G Begley, V Bertness, M Nussmeier, A Ezquerra, J Coligan, and I R Kirsch. 1990. "The SCL Gene Is Formed from a Transcriptionally Complex Locus." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.12.6426>.
- Aplan, Peter D., Craig A. Jones, David S. Chervinsky, Xian Feng Zhao, Mary Kay Ellsworth, Chuanzen Wu, Elizabeth A. McGuire, and Kenneth W. Gross. 1997. "An Scl Gene Product Lacking the Transactivation Domain Induces Bony Abnormalities and Cooperates with LMO1 to Generate T-Cell Malignancies in Transgenic Mice." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2408>.
- Aplan, Peter D., Susana C. Raimondi, and Ilan R. Kirsch. 1992. "Disruption of the SCL Gene by a t(1;3) Translocation in a Patient with T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.176.5.1303>.
- Arents, G., and E. N. Moudrianakis. 1993. "Topography of the Histone Octamer Surface: Repeating Structural Motifs Utilized in the Docking of Nucleosomal DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10489>.
- Armitage, P., and R. Doll. 1954. "The Age Distribution of Cancer and a Multi-Stage Theory of Carcinogenesis." *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.1954.1>.
- Armstrong, J., R. S. Brown, and A. Tsugita. 1983. "Primary Structure and Genetic Organization of Phage T4 DNA Ligase." *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/11.20.7145>.
- Bai, Xiaodan, Shengyu Hua, Junping Zhang, and Shixin Xu. 2019. "The MicroRNA Family Both in Normal Development and in Different Diseases: The MiR-17-92 Cluster." *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2019/9450240>.
- Bain, G, I Engel, E C Robanus Maandag, H P te Riele, J R Volland, L L Sharp, J Chun, B Huey, D Pinkel, and C Murre. 1997. "E2A Deficiency Leads to Abnormalities in Alphabeta T-Cell Development and to Rapid Development of T-Cell Lymphomas." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.8.4782>.
- Baltimore, David. 1970. "Viral RNA-Dependent DNA Polymerase: RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/2261209a0>.

- Bannister, Andrew J., Philip Zegerman, Janet F. Partridge, Eric A. Miska, Jean O. Thomas, Robin C. Allshire, and Tony Kouzarides. 2001. "Selective Recognition of Methylated Lysine 9 on Histone H3 by the HP1 Chromo Domain." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35065138>.
- Bartel, David P. 2004. "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).
- Bash, R. O., S. Hall, C. F. Timmons, W. M. Crist, M. Amylon, R. G. Smith, and R. Baer. 1995. "Does Activation of the TAL1 Gene Occur in a Majority of Patients with T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia? A Pediatric Oncology Group Study." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v86.2.666.bloodjournal862666>.
- Becker, Peter B., and Wolfram Hörz. 2002. "ATP-Dependent Nucleosome Remodeling." *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135400>.
- Beerman, Isabel, Christoph Bock, Brian S. Garrison, Zachary D. Smith, Hongcang Gu, Alexander Meissner, and Derrick J. Rossi. 2013. "Proliferation-Dependent Alterations of the DNA Methylation Landscape Underlie Hematopoietic Stem Cell Aging." *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.017>.
- Beerman, Isabel, and Derrick J. Rossi. 2014. "Epigenetic Regulation of Hematopoietic Stem Cell Aging." *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.013>.
- Beg, Muhammad S., Andrew J. Brenner, Jasjit Sachdev, Mitesh Borad, Yoon Koo Kang, Jay Stoudemire, Susan Smith, Andreas G. Bader, Sinil Kim, and David S. Hong. 2017. "Phase I Study of MRX34, a Liposomal MiR-34a Mimic, Administered Twice Weekly in Patients with Advanced Solid Tumors." *Investigational New Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s10637-016-0407-y>.
- Begley, C. G., J. Visvader, A. R. Green, P. D. Aplan, D. Metcalf, I. R. Kirsch, and N. M. Gough. 1991. "Molecular Cloning and Chromosomal Localization of the Murine Homolog of the Human Helix-Loop-Helix Gene SCL." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.869>.
- Bell, Jordana T., and Tim D. Spector. 2011. "A Twin Approach to Unraveling Epigenetics." *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.12.005>.
- Bellon, Marcia, Yves Lepelletier, Olivier Hermine, and Christophe Nicot. 2009. "Deregulation of MicroRNA Involved in Hematopoiesis and the Immune Response in HTLV-I Adult T-Cell Leukemia." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-189845>.
- Bernard, O., N. Lecoite, P. Jonveaux, M. Souyri, M. Mauchauffé, R. Berger, C. J. Larsen, and D. Mathieu-Mahul. 1991. "Two Site-Specific Deletions and t(1;14) Translocation Restricted to Human T-Cell Acute Leukemias Disrupt the 5' Part of the Tal-1 Gene." *Oncogene*.
- Bernstein, Emily, Sang Yong Kim, Michelle A. Carmell, Elizabeth P. Murchison,

- Heather Alcorn, Mamie Z. Li, Alea A. Mills, Stephen J. Elledge, Kathryn V. Anderson, and Gregory J. Hannon. 2003. "Dicer Is Essential for Mouse Development." *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1253>.
- Bissels, Ute, Andreas Bosio, and Wolfgang Wagner. 2012. "MicroRNAs Are Shaping the Hematopoietic Landscape." *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.051730>.
- Blackwell, T., and H Weintraub. 1990. "Differences and Similarities in DNA-Binding Preferences of MyoD and E2A Protein Complexes Revealed by Binding Site Selection." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2174572>.
- Bock, Christoph, Isabel Beerman, Wen Hui Lien, Zachary D. Smith, Hongcang Gu, Patrick Boyle, Andreas Gnirke, Elaine Fuchs, Derrick J. Rossi, and Alexander Meissner. 2012. "DNA Methylation Dynamics during In Vivo Differentiation of Blood and Skin Stem Cells." *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.019>.
- Bowman, Gregory D., and Michael G. Poirier. 2015. "Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics." *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr500350x>.
- Bracht, John, Shaun Hunter, Rachel Eachus, Phillip Weeks, and Amy E. Pasquinelli. 2004. "Trans-Splicing and Polyadenylation of Let-7 MicroRNA Primary Transcripts." *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.7122604>.
- Brennecke, Julius, David R. Hipfner, Alexander Stark, Robert B. Russell, and Stephen M. Cohen. 2003. "Bantam Encodes a Developmentally Regulated MicroRNA That Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene *Hid* in *Drosophila*." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00231-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00231-9).
- Brinkmann, Kerstin, Ashley P. Ng, Carolyn A. de Graaf, Ladina Di Rago, Craig D. Hyland, Eugenio Morelli, Jai Rautela, et al. 2019. "MiR17~92 Restrains Pro-Apoptotic BIM to Ensure Survival of Haematopoietic Stem and Progenitor Cells." *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0430-6>.
- Cai, Xuezhong, Curt H. Hagedorn, and Bryan R. Cullen. 2004. "Human MicroRNAs Are Processed from Capped, Polyadenylated Transcripts That Can Also Function as MRNAs." *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>.
- Calin, George Adrian, Calin Dan Dumitru, Masayoshi Shimizu, Roberta Bichi, Simona Zupo, Evan Noch, Hansjuerg Aldler, et al. 2002. "Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro-RNA Genes MiR15 and MiR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24): 15524–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>.
- Calkhoven, Cornelis F., Christine Müller, Richard Martin, Goradz Krosi, Trang Hoang, and Achim Leutz. 2003. "Translational Control of SCL-Isoform Expression in Hematopoietic Lineage Choice." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.251903>.

- Cantor, Alan B., and Stuart H. Orkin. 2002. "Transcriptional Regulation of Erythropoiesis: An Affair Involving Multiple Partners." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205326>.
- Cao, Shuo, Jian Zheng, Xiaobai Liu, Yunhui Liu, Xuelei Ruan, Jun Ma, Libo Liu, et al. 2019. "FXR1 Promotes the Malignant Biological Behavior of Glioma Cells via Stabilizing MIR17HG." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0991-0>.
- Chen, Chang Zheng, Ling Li, Harvey F. Lodish, and David P. Bartel. 2004. "MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1091903>.
- Chen, Chang Zheng, and Harvey F. Lodish. 2005. "MicroRNAs as Regulators of Mammalian Hematopoiesis." *Seminars in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.01.001>.
- Chen, Jinghai, Zhan Peng Huang, Hee Young Seok, Jian Ding, Masaharu Kataoka, Zheng Zhang, Xiaoyun Hu, et al. 2013. "Mir-17-92 Cluster Is Required for and Sufficient to Induce Cardiomyocyte Proliferation in Postnatal and Adult Hearts." *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300658>.
- Cheng, J. T., H. L. Hsu, L. Y. Hwang, and R. Baer. 1993. "Products of the TAL1 Oncogene: Basic Helix-Loop-Helix Proteins Phosphorylated at Serine Residues." *Oncogene*.
- Church, George M., Anne Ephrussi, Walter Gilbert, and Susumu Tonegawa. 1985. "Cell-Type-Specific Contacts to Immunoglobulin Enhancers in Nuclei." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/313798a0>.
- Cimmino, Amelia, George Adrian Calin, Muller Fabbri, Marilena V. Iorio, Manuela Ferracin, Masayoshi Shimizu, Sylwia E. Wojcik, et al. 2005. "MiR-15 and MiR-16 Induce Apoptosis by Targeting BCL2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (39): 13944–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>.
- Cobb, Bradley S., Arnulf Hertweck, James Smith, Eric O'Connor, Daniel Graf, Terence Cook, Stephen T. Smale, et al. 2006. "A Role for Dicer in Immune Regulation." *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20061692>.
- Cobb, Bradley S., Tatyana B. Nesterova, Elizabeth Thompson, Arnulf Hertweck, Eric O'Connor, Jonathan Godwin, Christopher B. Wilson, et al. 2005. "T Cell Lineage Choice and Differentiation in the Absence of the RNase III Enzyme Dicer." *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20050572>.
- Cooper, David N., and Michael Krawczak. 1989. "Cytosine Methylation and the Fate of CpG Dinucleotides in Vertebrate Genomes." *Human Genetics*. <https://doi.org/10.1007/BF00286715>.
- Correia, N. C., M. L. Arcangeli, F. Pflumio, and J. T. Barata. 2016. "Stem Cell Leukemia: How a TALEnted Actor Can Go Awry on the Hematopoietic Stage." *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.169>.

- Correia, Nádia C., Rita Fragoso, Tânia Carvalho, Francisco J. Enguita, and João T. Barata. 2016. "MiR-146b Negatively Regulates Migration and Delays Progression of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep31894>.
- Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM. 2006. "Pre-B Cell Proliferation and Lymphoblastic Leukemia/High-Grade Lymphoma in E(Mu)-MiR155 Transgenic Mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Creyghton, Menno P., Albert W. Cheng, G. Grant Welstead, Tristan Kooistra, Bryce W. Carey, Eveline J. Steine, Jacob Hanna, et al. 2010. "Histone H3K27ac Separates Active from Poised Enhancers and Predicts Developmental State." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>.
- Cui, Kairong, Chongzhi Zang, Tae Young Roh, Dustin E. Schones, Richard W. Childs, Weiqun Peng, and Keji Zhao. 2009. "Chromatin Signatures in Multipotent Human Hematopoietic Stem Cells Indicate the Fate of Bivalent Genes during Differentiation." *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.011>.
- Curtis, David J., Mark A. Hall, Leonie J. Van Stekelenburg, Lorraine Robb, Stephen M. Jane, and C. Glenn Begley. 2004. "SCL Is Required for Normal Function of Short-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3202>.
- Debernardi, S., S. Skoulakis, G. Molloy, T. Chaplin, A. Dixon-Mclver, and B. D. Young. 2007. "MicroRNA MiR-181a Correlates with Morphological Sub-Class of Acute Myeloid Leukaemia and the Expression of Its Target Genes in Global Genome-Wide Analysis." *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404605>.
- DeKoter, Rodney P., and Harinder Singh. 2000. "Regulation of B Lymphocyte and Macrophage Development by Graded Expression of PU.1." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1439>.
- Demaison, Christophe, Kathryn Parsley, Gaby Brouns, Michaela Scherr, Karin Battmer, Christine Kinnon, Manuel Grez, and Adrian J. Thrasher. 2002. "High-Level Transduction and Gene Expression in Hematopoietic Repopulating Cells Using a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Lentiviral Vector Containing an Internal Spleen Focus Forming Virus Promoter." *Human Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1089/10430340252898984>.
- Denli, Ahmet M., Bastiaan B.J. Tops, Ronald H.A. Plasterk, René F. Ketting, and Gregory J. Hannon. 2004. "Processing of Primary MicroRNAs by the Microprocessor Complex." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03049>.
- Dong, Henry Y., Steven Wilkes, and Haisu Yang. 2011. "CD71 Is Selectively and Ubiquitously Expressed at High Levels in Erythroid Precursors of All Maturation Stages." *The American Journal of Surgical Pathology*. <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e31821247a8>.
- Ebert, Margaret S., Joel R. Neilson, and Phillip A. Sharp. 2007. "MicroRNA Sponges:

- Competitive Inhibitors of Small RNAs in Mammalian Cells." *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth1079>.
- Ebi, H., T. Sato, N. Sugito, Y. Hosono, Y. Yatabe, Y. Matsuyama, T. Yamaguchi, H. Osada, M. Suzuki, and T. Takahashi. 2009. "Counterbalance between RB Inactivation and MiR-17-92 Overexpression in Reactive Oxygen Species and DNA Damage Induction in Lung Cancers." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.201>.
- Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM. 1996. "Interaction and Functional Collaboration of P300/CBP and BHLH Proteins in Muscle and B-Cell Differentiation." *Genes Dev*.
- Elango, Navin, Seong Ho Kim, Eric Vigoda, and Soojin V. Yi. 2008. "Mutations of Different Molecular Origins Exhibit Contrasting Patterns of Regional Substitution Rate Variation." *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000015>.
- Elmén, Joacim, Morten Lindow, Sylvia Schütz, Matthew Lawrence, Andreas Petri, Susanna Obad, Marie Lindholm, et al. 2008. "LNA-Mediated MicroRNA Silencing in Non-Human Primates." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06783>.
- EIOmari, Kamel, Sarah J. Hoosdally, Kapil Tuladhar, Dimple Karia, Elisa Hall-Ponselé, Olga Platonova, Paresh Vyas, Roger Patient, Catherine Porcher, and Erika J. Mancini. 2013. "Structural Basis for LMO2-Driven Recruitment of the SCL: E47bHLH Heterodimer to Hematopoietic-Specific Transcriptional Targets." *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.008>.
- Emil, Heitz. 1928. "Das Heterochromatin Der Moose." *Jahrbücher Für Wissenschaftliche Botanik*.
- Ephrussi, Anne, George M. Church, Susumu Tonegawa, and Walter Gilbert. 1985. "B Lineage-Specific Interactions of an Immunoglobulin Enhancer with Cellular Factors in Vivo." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.3917574>.
- Fan, Yu, Shenyi Yin, Yang Hao, Junyu Yang, Hanshuo Zhang, Changhong Sun, Ming Ma, Qing Chang, and Jianzhong Jeff Xi. 2014. "MiR-19b Promotes Tumor Growth and Metastasis via Targeting TP53." *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.043026.113>.
- Fang, Li Li, Xing Hui Wang, Bao Fei Sun, Xiao Dong Zhang, Xu Hui Zhu, Zi Jiang Yu, and Heng Luo. 2017. "Expression, Regulation and Mechanism of Action of the MiR-17-92 Cluster in Tumor Cells (Review)." *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3164>.
- Fareh, Mohamed, Kyu Hyeon Yeom, Anna C. Haagsma, Sweeny Chauhan, Inha Heo, and Chirlmin Joo. 2016. "TRBP Ensures Efficient Dicer Processing of Precursor MicroRNA in RNA-Crowded Environments." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13694>.
- Fazi, Francesco, Serena Racanicchi, Giuseppe Zardo, Linda M. Starnes, Marco Mancini, Lorena Travaglini, Daniela Diverio, et al. 2007. "Epigenetic Silencing of



- the Myelopoiesis Regulator MicroRNA-223 by the AML1/ETO Oncoprotein.” *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.09.020>.
- Fazi, Francesco, Alessandro Rosa, Alessandro Fatica, Vania Gelmetti, Maria Laura De Marchis, Clara Nervi, and Irene Bozzoni. 2005. “A Minicircuitry Comprised of MicroRNA-223 and Transcription Factors NFI-A and C/EBP $\alpha$  Regulates Human Granulopoiesis.” *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.023>.
- Felli, Nadia, Laura Fontana, Elvira Pelosi, Rosanna Botta, Desirée Bonci, Francesco Facchiano, Francesca Liuzzi, et al. 2005. “MicroRNAs 221 and 222 Inhibit Normal Erythropoiesis and Erythroleukemic Cell Growth via Kit Receptor Down-Modulation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506216102>.
- Felli, Nadia, Francesca Pedini, Paolo Romania, Mauro Biffoni, Ornella Morsilli, Germana Castelli, Simona Santoro, et al. 2009. “MicroRNA 223-Dependent Expression of LMO2 Regulates Normal Erythropoiesis.” *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.002345>.
- Felsenfeld, Gary, and Mark Groudine. 2003. “Controlling the Double Helix.” *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01411>.
- Ferrando, Adolfo A., Sabine Herblot, Teresa Palomero, Mark Hansen, Trang Hoang, Edward A. Fox, and A. Thomas Look. 2004. “Biallelic Transcriptional Activation of Oncogenic Transcription Factors in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2577>.
- Finger, L. R., J. Kagan, G. Christopher, J. Kurtzberg, M. S. Hershfield, P. C. Nowell, and C. M. Croce. 1989. “Involvement of the TCL5 Gene on Human Chromosome 1 in T-Cell Leukemia and Melanoma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.13.5039>.
- Gantier, Michael P., H. James Stunden, Claire E. McCoy, Mark A. Behlke, Die Wang, Maria Kaparakis-Liaskos, Soroush T. Sarvestani, et al. 2012. “A MiR-19 Regulon That Controls NF-KB Signaling.” *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks521>.
- Gao, Feng, Masaharu Kataoka, Ning Liu, Tian Liang, Zhan Peng Huang, Fei Gu, Jian Ding, et al. 2019. “Therapeutic Role of MiR-19a/19b in Cardiac Regeneration and Protection from Myocardial Infarction.” *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09530-1>.
- Garzon, Ramiro, Guido Marcucci, and Carlo M. Croce. 2010. “Targeting MicroRNAs in Cancer: Rationale, Strategies and Challenges.” *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd3179>.
- Gauwerky CE, Huebner K, Isobe M, Nowell PC, Croce CM. 1989. “Activation of MYC in a Masked t(8;17) Translocation Results in an Aggressive B-Cell Leukemia.” *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Goldfarb, Adam N., and James M. Greenberg. 1994. “T-Cell Acute Lymphoblastic

- Leukemia and the Associated Basic Helix-Loop-Helix Gene SCL/Tal." *Leukemia and Lymphoma*. <https://doi.org/10.3109/10428199409059586>.
- Greer Card, D. A., P. B. Hebbar, L. Li, K. W. Trotter, Y. Komatsu, Y. Mishina, and T. K. Archer. 2008. "Oct4/Sox2-Regulated MiR-302 Targets Cyclin D1 in Human Embryonic Stem Cells." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00359-08>.
- Griffith, Fred. 1928. "The Significance of Pneumococcal Types." *Journal of Hygiene*. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>.
- Guo, Huili, Nicholas T Ingolia, Jonathan S Weissman, and David P Bartel. 2010. "Mammalian MicroRNAs Predominantly Act to Decrease Target mRNA Levels." *Nature* 466 (7308): 835–40. <https://doi.org/10.1038/nature09267>.
- Hackl, Matthias, Stefan Brunner, Klaus Fortschegger, Carina Schreiner, Lucia Micutkova, Christoph Mück, Gerhard T. Laschober, et al. 2010. "MiR-17, MiR-19b, MiR-20a, and MiR-106a Are down-Regulated in Human Aging." *Aging Cell*. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00549.x>.
- Hausen, Harald zur. 1967. "Induction of Specific Chromosomal Aberrations by Adenovirus Type 12 in Human Embryonic Kidney Cells." *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.1.6.1174-1185.1967>.
- Hayashita, Yoji, Hirotaka Osada, Yoshio Tatematsu, Hideki Yamada, Kiyoshi Yanagisawa, Shuta Tomida, Yasushi Yatabe, Katsunobu Kawahara, Yoshitaka Sekido, and Takashi Takahashi. 2005. "A Polycistronic MicroRNA Cluster, MiR-17-92, Is Overexpressed in Human Lung Cancers and Enhances Cell Proliferation." *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2352>.
- He, Lin, J. Michael Thomson, Michael T. Hemann, Eva Hernando-Monge, David Mu, Summer Goodson, Scott Powers, et al. 2005. "A MicroRNA Polycistron as a Potential Human Oncogene." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03552>.
- Herblot, Sabine, Ann Muriel Steff, Patrice Hugo, Peter D. Aplan, and Trang Hoang. 2000. "SCL and LMO1 Alter Thymocyte Differentiation: Inhibition of E2A-HEB Function and Pre-T $\alpha$  Chain Expression." *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/77819>.
- Hsu, H L, J T Cheng, Q Chen, and R Baer. 1991. "Enhancer-Binding Activity of the Tal-1 Oncoprotein in Association with the E47/E12 Helix-Loop-Helix Proteins." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.6.3037>.
- Hsu, H L, L Huang, J T Tsan, W Funk, W E Wright, J S Hu, R E Kingston, and R Baer. 1994. "Preferred Sequences for DNA Recognition by the TAL1 Helix-Loop-Helix Proteins." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1256>.
- Hsu, T. I., C. H. Hsu, K. H. Lee, J. T. Lin, C. S. Chen, K. C. Chang, C. Y.J. Su, M. Hsiao, and P. J. Lu. 2014. "MicroRNA-18a Is Elevated in Prostate Cancer and Promotes Tumorigenesis through Suppressing STK4 in Vitro and in Vivo." *Oncogenesis*. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2014.12>.

- Hu, Xin, Xingguo Li, Kristell Valverde, Xueqi Fu, Constance Noguchi, Yi Qiu, and Suming Huang. 2009. "LSD1-Mediated Epigenetic Modification Is Required for TAL1 Function and Hematopoiesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900437106>.
- Hu, Xin, River Ybarra, Yi Qiu, Jörg Bungert, and Suming Huang. 2009. "Transcriptional Regulation by TAL1: A Link between Epigenetic Modifications and Erythropoiesis." *Epigenetics*. <https://doi.org/10.4161/epi.4.6.9711>.
- Huang, S., and S. J. Brandt. 2000. "MSin3A Regulates Murine Erythroleukemia Cell Differentiation through Association with the TAL1 (or SCL) Transcription Factor." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.6.2248-2259.2000>.
- Huang, Suming, Yi Qiu, Yubin Shi, Zhixiong Xu, and Stephen J. Brandt. 2000. "P/CAF-Mediated Acetylation Regulates the Function of the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor TAL1/SCL." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6792>.
- Huang, Suming, Yi Qiu, Roland W. Stein, and Stephen J. Brandt. 1999. "P300 Functions as a Transcriptional Coactivator for the TAL1/SCL Oncoprotein." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202889>.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, É Bálint, T. Tuschl, and P. D. Zamore. 2001. "A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the Let-7 Small Temporal RNA." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>.
- Hutvagner, György, and Phillip D. Zamore. 2002. "A MicroRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1073827>.
- Ichikawa, Motoshi, Takashi Asai, Toshiki Saito, Go Yamamoto, Sachiko Seo, Ieharu Yamazaki, Tetsuya Yamagata, et al. 2004. "AML-1 Is Required for Megakaryocytic Maturation and Lymphocytic Differentiation, but Not for Maintenance of Hematopoietic Stem Cells in Adult Hematopoiesis." *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm997>.
- Jan, Max, Thomas M. Snyder, M. Ryan Corces-Zimmerman, Paresh Vyas, Irving L. Weissman, Stephen R. Quake, and Ravindra Majeti. 2012. "Clonal Evolution of Preleukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia." *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004315>.
- Janssen, Harry L.A., Hendrik W. Reesink, Eric J. Lawitz, Stefan Zeuzem, Maribel Rodriguez-Torres, Keyur Patel, Adriaan J. Van Der Meer, et al. 2013. "Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA." *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209026>.
- Janssen, Johannes W.G., Wolf Dieter Ludwig, Wolfram Sterry, and Claus R. Bartram. 1993. "SIL-TAL1 Deletion in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Leukemia*.

- Jiang, Shan, Chaoran Li, Virginie Olive, Erik Lykken, Feng Feng, Jose Sevilla, Ying Wan, Lin He, and Qi Jing Li. 2011. "Molecular Dissection of the MiR-17-92 Cluster's Critical Dual Roles in Promoting Th1 Responses and Preventing Inducible Treg Differentiation." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-355644>.
- Jin, Shuiling, Hairui Su, Ngoc Tung Tran, Jing Song, Sydney S. Lu, Ying Li, Suming Huang, Omar Abdel-Wahab, Yanyan Liu, and Xinyang Zhao. 2017. "Splicing Factor SF3B1K700E Mutant Dysregulates Erythroid Differentiation via Aberrant Alternative Splicing of Transcription Factor TAL1." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175523>.
- Kee, Barbara L. 2009. "E and ID Proteins Branch Out." *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2507>.
- Kerenyi, Marc A., and Stuart H. Orkin. 2010. "Networking Erythropoiesis." *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20102260>.
- Khvorova, Anastasia, Angela Reynolds, and Sumedha D. Jayasena. 2003. "Functional SiRNAs and MiRNAs Exhibit Strand Bias." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00801-8).
- Kluiver, Joost, Sibrand Poppema, Debora de Jong, Tjasso Blokzijl, Geert Harms, Susan Jacobs, Bart Jan Kroesen, and Anke van den Berg. 2005. "BIC and MiR-155 Are Highly Expressed in Hodgkin, Primary Mediastinal and Diffuse Large B Cell Lymphomas." *Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1002/path.1825>.
- Koch, Christoph M., Robert M. Andrews, Paul Flicek, Shane C. Dillon, Ulaş Karaöz, Gayle K. Clelland, Sarah Wilcox, et al. 2007. "The Landscape of Histone Modifications across 1% of the Human Genome in Five Human Cell Lines." *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.5704207>.
- Kolodziej, Stephan, Olga N. Kuvardina, Thomas Oellerich, Julia Herglotz, Ingo Backert, Nicole Kohrs, Estel La Buscató, et al. 2014. "PADI4 Acts as a Coactivator of Tal1 by Counteracting Repressive Histone Arginine Methylation." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4995>.
- Krivtsov, A. V., M. E. Figueroa, A. U. Sinha, M. C. Stubbs, Z. Feng, P. J.M. Valk, R. Delwel, et al. 2013. "Cell of Origin Determines Clinically Relevant Subtypes of MLL-Rearranged AML." *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.363>.
- Krützfeldt, Jan, Nikolaus Rajewsky, Ravi Braich, Kallanthottathil G. Rajeev, Thomas Tuschl, Muthiah Manoharan, and Markus Stoffel. 2005. "Silencing of MicroRNAs in Vivo with 'Antagomirs.'" *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature04303>.
- Kusy, Sophie, Bastien Gerby, Nicolas Goardon, Nathalie Gault, Federica Ferri, Delphine Gérard, Florence Armstrong, et al. 2010. "NKX3.1 Is a Direct TAL1 Target Gene That Mediates Proliferation of TAL1-Expressing Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20100745>.
- La Grange, Philippe Brunet De, Florence Armstrong, Veronique Duval, Marie Christine

- Rouyez, Nicolas Goardon, Paul Henri Romeo, and Françoise Pflumio. 2006. "Low SCL/TAL1 Expression Reveals Its Major Role in Adult Hematopoietic Myeloid Progenitors and Stem Cells." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-022988>.
- Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, and T. Jenuwein. 2001. "Methylation of Histone H3 Lysine 9 Creates a Binding Site for HP1 Proteins." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35065132>.
- Lahlil, R., E. Lecuyer, S. Herblot, and T. Hoang. 2004. "SCL Assembles a Multifactorial Complex That Determines Glycophorin A Expression." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.4.1439-1452.2004>.
- Larson, R. C., I. Lavenir, T. A. Larson, R. Baer, A. J. Warren, I. Wadman, K. Nottage, and T. H. Rabbitts. 1996. "Protein Dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 Alters Thymocyte Development and Potentiates T Cell Tumorigenesis in Transgenic Mice." *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00439.x>.
- Latchman, D. S. 1997. "Transcription Factors: An Overview." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00085-X).
- Latchman, David S. 1993. "Transcription Factors: An Overview Function of Transcription Factors." *Int. J. Exp. Path.*
- Lausen, Jörn. 2013. "Contributions of the Histone Arginine Methyltransferase PRMT6 to the Epigenetic Function of RUNX1." *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013007527>.
- Lécuyer, Eric, Sabine Herblot, Marianne Saint-Denis, Richard Martin, C. Glenn Begley, Catherine Porcher, Stuart H. Orkin, and Trang Hoang. 2002. "The SCL Complex Regulates C-Kit Expression in Hematopoietic Cells through Functional Interaction with Sp1." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0568>.
- Lécuyer, Eric, Simon Larivière, Marie Claude Sincennes, André Haman, Rachid Lahlil, Margarita Todorova, Mathieu Tremblay, Brian C. Wilkes, and Trang Hoang. 2007. "Protein Stability and Transcription Factor Complex Assembly Determined by the SCL-LMO2 Interaction." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703939200>.
- Lee, Rosalind C., Rhonda L. Feinbaum, and Victor Ambros. 1993. "The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14." *Cell* 75 (5): 843–54. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).
- Lee, Yoontae, Chiyong Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Jaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, et al. 2003. "The Nuclear RNase III Drosha Initiates MicroRNA Processing." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01957>.
- Lee, Yoontae, Minju Kim, Jinju Han, Kyu Hyun Yeom, Sanghyuk Lee, Sung Hee Baek, and V. Narry Kim. 2004. "MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>.
- Lewis, B P, C B Burge, D P Bartel, , Pairing Often, and , RNA. 2005. "Conserved Seed

- by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes Are Micro Cell;" *Cell*. Lewis, Benjamin P., Christopher B. Burge, and David P. Bartel. 2005. "Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes Are MicroRNA Targets." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>.
- Li, En, Timothy H. Bestor, and Rudolf Jaenisch. 1992. "Targeted Mutation of the DNA Methyltransferase Gene Results in Embryonic Lethality." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-F).
- Li, Y., C. Deng, X. Hu, B. Patel, X. Fu, Y. Qiu, M. Brand, K. Zhao, and S. Huang. 2012. "Dynamic Interaction between TAL1 Oncoprotein and LSD1 Regulates TAL1 Function in Hematopoiesis and Leukemogenesis." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.8>.
- Li, Yanmei, Laura M. Vecchiarelli-Federico, You Jun Li, Sean E. Egan, David Spaner, Margaret R. Hough, and Yaacov Ben-David. 2012. "The MiR-17-92 Cluster Expands Multipotent Hematopoietic Progenitors Whereas Imbalanced Expression of Its Individual Oncogenic MiRNAs Promotes Leukemia in Mice." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-378687>.
- Li, Yulin, Peter S. Choi, Stephanie C. Casey, David L. Dill, and Dean W. Felsher. 2014. "MYC through MiR-17-92 Suppresses Specific Target Genes to Maintain Survival, Autonomous Proliferation, and a Neoplastic State." *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.014>.
- Liao, Baojian, Xichen Bao, Longqi Liu, Shipeng Feng, Athanasios Zovoilis, Wenbo Liu, Yanting Xue, et al. 2011. "MicroRNA Cluster 302-367 Enhances Somatic Cell Reprogramming by Accelerating a Mesenchymal-to-Epithelial Transition." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.235960>.
- Liau, Wei Siang, Phuong Cao Thi Ngoc, and Takaomi Sanda. 2017. "Roles of the RUNX1 Enhancer in Normal Hematopoiesis and Leukemogenesis." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2_10).
- Linggi, Bryan E., Stephen J. Brandt, Zu Wen Sun, and Scott W. Hiebert. 2005. "Translating the Histone Code into Leukemia." *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.20604>.
- Liu, Gwen, Hyeyoung Min, Sibiao Yue, and Chang Zheng Chen. 2008. "Pre-MiRNA Loop Nucleotides Control the Distinct Activities of Mir-181a-1 and Mir-181c in Early T Cell Development." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003592>.
- Liu, Mei, Zaozao Wang, Shangbin Yang, Wei Zhang, Shun He, Chenfei Hu, Hongxia Zhu, Lanping Quan, Jinfeng Bai, and Ningzhi Xu. 2011. "TNF- $\alpha$  Is a Novel Target of MiR-19a." *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.924>.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method."

- Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Loken, M. R., C. I. Civin, W. L. Bigbee, R. G. Langlois, and R. H. Jensen. 1987. "Coordinate Glycosylation and Cell Surface Expression of Glycophorin A during Normal Human Erythropoiesis." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v70.6.1959.bloodjournal7061959>.
- Look, A. T. 1997. "Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.278.5340.1059>.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *The Journal of Biological Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89160-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89160-4).
- Lozzio, C. B., and B. B. Lozzio. 1975. "Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line with Positive Philadelphia Chromosome." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v45.3.321.bloodjournal453321>.
- Lu, Jun, Gad Getz, Eric A. Miska, Ezequiel Alvarez-Saavedra, Justin Lamb, David Peck, Alejandro Sweet-Cordero, et al. 2005. "MicroRNA Expression Profiles Classify Human Cancers." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03702>.
- Luger, Karolin, Thomas J. Rechsteiner, Andrew J. Flaus, Mary M.Y. Waye, and Timothy J. Richmond. 1997. "Characterization of Nucleosome Core Particles Containing Histone Proteins Made in Bacteria." *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1235>.
- Lund, Elsebet, Stephan Güttinger, Angelo Calado, James E. Dahlberg, and Ulrike Kutay. 2004. "Nuclear Export of MicroRNA Precursors." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1090599>.
- Ma, Li, Jennifer Young, Harsha Prabhala, Elizabeth Pan, Pieter Mestdagh, Daniel Muth, Julie Teruya-Feldstein, et al. 2010. "MiR-9, a MYC/MYCN-Activated MicroRNA, Regulates E-Cadherin and Cancer Metastasis." *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb2024>.
- Mansour, Marc R., Takaomi Sanda, Lee N. Lawton, Xiaoyu Li, Taras Kreslavsky, Carl D. Novina, Marjorie Brand, et al. 2013. "The TAL1 Complex Targets the FBXW7 Tumor Suppressor by Activating MiR-223 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20122516>.
- Massari, M. E., and C. Murre. 2000. "Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.2.429-440.2000>.
- Maston, Glenn A., Sara K. Evans, and Michael R. Green. 2006. "Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome." *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115623>.
- Mazin, Alexander L. 2009. "Suicidal Function of DNA Methylation in Age-Related Genome Disintegration." *Ageing Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.04.005>.

- McDevitt, Michael A., Ramesh A. Shivdasani, Yuko Fujiwara, Haidi Yang, and Stuart H. Orkin. 1997. "A 'Knockdown' Mutation Created by Cis-Element Gene Targeting Reveals the Dependence of Erythroid Cell Maturation on the Level of Transcription Factor GATA-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6781>.
- McGrath, Kathleen E, and James Palis. 2005. "Hematopoiesis in the Yolk Sac: More than Meets the Eye." *Experimental Hematology* 33 (9): 1021–28. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.06.012>.
- Melo, Sonia, Alberto Villanueva, Catia Moutinho, Veronica Davalos, Riccardo Spizzo, Cristina Ivan, Simona Rossi, et al. 2011. "Small Molecule Enoxacin Is a Cancer-Specific Growth Inhibitor That Acts by Enhancing TAR RNA-Binding Protein 2-Mediated MicroRNA Processing." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014720108>.
- Mendes, N. D., A. T. Freitas, and M. F. Sagot. 2009. "Survey and Summary: Current Tools for the Identification of MiRNA Genes and Their Targets." *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp145>.
- Mikkola, Hanna K.A., Jenny Klintman, Haidi Yang, Hanno Hock, Thorsten M. Schlaeger, Yuko Fujiwara, and Stuart H. Orkin. 2003. "Haematopoietic Stem Cells Retain Long-Term Repopulating Activity and Multipotency in the Absence of Stem-Cell Leukaemia SCL/Tal-1 Gene." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01345>.
- Mikkola, Hanna K A, and Stuart H Orkin. 2006. "The Journey of Developing Hematopoietic Stem Cells." *Development (Cambridge, England)* 133 (19): 3733–44. <https://doi.org/10.1242/dev.02568>.
- Mogilyansky, E., and I. Rigoutsos. 2013. "The MiR-17/92 Cluster: A Comprehensive Update on Its Genomics, Genetics, Functions and Increasingly Important and Numerous Roles in Health and Disease." *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.125>.
- Monroig, Paloma del C., Lu Chen, Shuxing Zhang, and George A. Calin. 2015. "Small Molecule Compounds Targeting MiRNAs for Cancer Therapy." *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.002>.
- Monteys, Alex Mas, Ryan M. Spengler, Ji Wan, Luis Tecedor, Kimberly A. Lennox, Yi Xing, and Beverly L. Davidson. 2010. "Structure and Activity of Putative Intronic MiRNA Promoters." *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.1731910>.
- Monticelli, Silvia, K. Mark Ansel, Changchun Xiao, Nicholas D. Socci, Anna M. Krichevsky, To Ha Thai, Nikolaus Rajewsky, et al. 2005. "MicroRNA Profiling of the Murine Hematopoietic System." *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-r71>.
- Morelli, Eugenio, Lavinia Biamonte, Cinzia Federico, Nicola Amodio, Maria Teresa Di Martino, Maria Eugenia Gallo Cantafio, Martina Manzoni, et al. 2018. "Therapeutic Vulnerability of Multiple Myeloma to MIR17PTi, a First-in-Class Inhibitor of Pri-



- MiR-17-92." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-836601>.
- Morrison, Sean J., and Irving L. Weissman. 1994. "The Long-Term Repopulating Subset of Hematopoietic Stem Cells Is Deterministic and Isolatable by Phenotype." *Immunity* 1 (8): 661–73. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-X).
- Morrison, Tom B., Janis J. Weis, and Carl T. Wittwer. 1998. "Quantification of Lowcopy Transcripts by Continuous SYBR® Green I Monitoring during Amplification." *BioTechniques*.
- Mouthon, M. A., O. Bernard, M. T. Mitjavila, P. H. Romeo, W. Vainchenker, and D. Mathieu-Mahul. 1993. "Expression of Tal-1 and GATA-Binding Proteins during Human Hematopoiesis." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v81.3.647.bloodjournal813647>.
- Murre, Cornelis, Gretchen Bain, Marc A. van Dijk, Isaac Engel, Beth A. Furnari, Mark E. Massari, James R. Matthews, Melanie W. Quong, Richard R. Rivera, and Maarten H. Stuijver. 1994. "Structure and Function of Helix-Loop-Helix Proteins." *BBA - Gene Structure and Expression*. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0167-4781(94)90001-9).
- Murre, Cornelis, Patrick Schonleber McCaw, and David Baltimore. 1989. "A New DNA Binding and Dimerization Motif in Immunoglobulin Enhancer Binding, Daughterless, MyoD, and Myc Proteins." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90682-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90682-X).
- Murre, Cornelis, Patrick Schonleber McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Y. Jan, Y. N. Jan, Carlos V. Cabrera, et al. 1989. "Interactions between Heterologous Helix-Loop-Helix Proteins Generate Complexes That Bind Specifically to a Common DNA Sequence." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90434-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90434-0).
- Mutskov, Vesco J., Catherine M. Farrell, Paul A. Wade, Alan P. Wolffe, and Gary Felsenfeld. 2002. "The Barrier Function of an Insulator Couples High Histone Acetylation Levels with Specific Protection of Promoter DNA from Methylation." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.988502>.
- Navarro, Jean Marc, Aurore Touzart, Lydie C. Pradel, Marie Loosveld, Myriam Koubi, Romain Fenouil, Sandrine Le Noir, et al. 2015. "Site- and Allele-Specific Polycomb Dysregulation in T-Cell Leukaemia." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms7094>.
- Nicoloso, Milena S, Thomas J Kipps, Carlo M Croce, and George A Calin. 2007. "MicroRNAs in the Pathogeny of Chronic Lymphocytic Leukaemia." *British Journal of Haematology* 139 (5): 709–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06868.x>.
- O'Connell, Ryan M., Dinesh S. Rao, Aadel A. Chaudhuri, Mark P. Boldin, Konstantin D. Taganov, John Nicoll, Ronald L. Paquette, and David Baltimore. 2008. "Sustained Expression of MicroRNA-155 in Hematopoietic Stem Cells Causes a Myeloproliferative Disorder." *Journal of Experimental Medicine*.

- <https://doi.org/10.1084/jem.20072108>.
- O'Donnell, Kathryn A., Erik A. Wentzel, Karen I. Zeller, Chi V. Dang, and Joshua T. Mendell. 2005. "C-Myc-Regulated MicroRNAs Modulate E2F1 Expression." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03677>.
- O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C, Kelliher M. 2004. "TAL1/SCL Induces Leukemia by Inhibiting the Transcriptional Activity of E47/HEB." *Cancer Cell*.
- Ogawa, Makio, Fumihto Tajima, Tatsuya Ito, Takashi Sato, Joseph H. Laver, and Takao Deguchi. 2006. "CD34 Expression by Murine Hematopoietic Stem Cells." *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03583.x>.
- Okano, Masaki, Daphne W. Bell, Daniel A. Haber, and En Li. 1999. "DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for de Novo Methylation and Mammalian Development." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6).
- Okayama, H, and P Berg. 1982. "High-Efficiency Cloning of Full-Length cDNA." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.2.2.161>.
- Okuda, Tsukasa, Jan Van Deursen, Scott W. Hiebert, Gerard Grosveld, and James R. Downing. 1996. "AML1, the Target of Multiple Chromosomal Translocations in Human Leukemia, Is Essential for Normal Fetal Liver Hematopoiesis." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80986-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80986-1).
- Olive, Virginie, Margaux J. Bennett, James C. Walker, Cong Ma, Iris Jiang, Carlos Cordon-Cardo, Qi Jing Li, Scott W. Lowe, Gregory J. Hannon, and Lin He. 2009. "MiR-19 Is a Key Oncogenic Component of Mir-17-92." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1861409>.
- Orford, Keith, Peter Kharchenko, Weil Lai, Maria Carlota Dao, David J. Worhunsky, Adam Ferro, Viktor Janzen, Peter J. Park, and David T. Scadden. 2008. "Differential H3K4 Methylation Identifies Developmentally Poised Hematopoietic Genes." *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.04.002>.
- Orkin, Stuart H. 2000. "Diversification of Haematopoietic Stem Cells to Specific Lineages." *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/35049577>.
- Orkin, Stuart H., and Leonard I. Zon. 2008. "Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025>.
- Ota, Akinobu, Hiroyuki Tagawa, Sivasundaram Karnan, Shinobu Tsuzuki, Abraham Karpas, Shigeki Kira, Yasuko Yoshida, and Masao Seto. 2004. "Identification and Characterization of a Novel Gene, C13orf25, as a Target for 13q31-Q32 Amplification in Malignant Lymphoma." *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3773>.
- Palii, Carmen G., Carolina Perez-Iratxeta, Zizhen Yao, Yi Cao, Fengtao Dai, Jerry Davison, Harold Atkins, et al. 2011. "Differential Genomic Targeting of the Transcription Factor TAL1 in Alternate Haematopoietic Lineages." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.342>.

- Park, Steven T., and Xiao Hong Sun. 1998. "The Tal1 Oncoprotein Inhibits E47-Mediated Transcription. Mechanism of Inhibition." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.7030>.
- Pasquinelli, Amy E., Brenda J. Reinhart, Frank Slack, Mark Q. Martindale, Mitzi I. Kuroda, Betsy Maller, David C. Hayward, et al. 2000. "Conservation of the Sequence and Temporal Expression of Let-7 Heterochronic Regulatory RNA." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35040556>.
- Passegué, Emmanuelle, Catriona H.M. Jamieson, Laurie E. Ailles, and Irving L. Weissman. 2003. "Normal and Leukemic Hematopoiesis: Are Leukemias a Stem Cell Disorder or a Reacquisition of Stem Cell Characteristics?" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2034201100>.
- Patterson, Lucy J., Martin Gering, Craig E. Eckfeldt, Anthony R. Green, Catherine M. Verfaillie, Stephen C. Ekker, and Roger Patient. 2007. "The Transcription Factors Scl and Lmo2 Act Together during Development of the Hemangioblast in Zebrafish." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003087>.
- Pecq, Jean Bernard Le, and Claude Paoletti. 1966. "A New Fluorometric Method for RNA and DNA Determination." *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90012-1).
- Pfaffl, M. W. 2001. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Pichiorri, Flavia, Sung Suk Suh, Marco Ladetto, Michael Kuehl, Tiziana Palumbo, Daniela Drandi, Cristian Taccioli, et al. 2008. "MicroRNAs Regulate Critical Genes Associated with Multiple Myeloma Pathogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806202105>.
- Poliseno, Laura, Letizia Pitto, Marcella Simili, Laura Mariani, Luisa Riccardi, Alessia Ciucci, Milena Rizzo, et al. 2008. "The Proto-Oncogene LRF Is under Post-Transcriptional Control of MiR-20a: Implications for Senescence." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002542>.
- Porcher, Catherine, Wojciech Swat, Karen Rockwell, Yuko Fujiwara, Frederick W. Alt, and Stuart H. Orkin. 1996. "The T Cell Leukemia Oncoprotein SCL/Tal-1 Is Essential for Development of All Hematopoietic Lineages." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80076-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80076-8).
- Pospisil, Vit, Karin Vargova, Juraj Kokavec, Jana Rybarova, Filipp Savvulidi, Anna Jonasova, Emanuel Necas, Jiri Zavadil, Peter Laslo, and Tomas Stopka. 2011. "Epigenetic Silencing of the Oncogenic MiR-17-92 Cluster during PU.1-Directed Macrophage Differentiation." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.317>.
- Prasad, K. S.Srinivasa, and Stephen J. Brandt. 1997. "Target-Dependent Effect of Phosphorylation on the DNA Binding Activity of the TAL1/SCL Oncoprotein."

- Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11457>.
- Pui, Ching Hon, and William E. Evans. 2006. "Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia." *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052603>.
- Pulford, K., N. Leconte, K. Leroy-Viard, M. Jones, D. Mathieu-Mahul, and D. Y. Mason. 1995. "Expression of TAL-1 Proteins in Human Tissues." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v85.3.675.bloodjournal853675>.
- Ravet, Emmanuel, Damien Reynaud, Monique Titeux, Brigitte Izac, Serge Fichelson, Paul Henri Roméo, Anne Dubart-Kupperschmitt, and Françoise Pflumio. 2004. "Characterization of DNA-Binding-Dependent and -Independent Functions of SCL/TAL1 during Human Erythropoiesis." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1689>.
- Redon, Christophe, Duane Pilch, Emmy Rogakou, Olga Sedelnikova, Kenneth Newrock, and William Bonner. 2002. "Histone H2A Variants H2AX and H2AZ." *Current Opinion in Genetics and Development*. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00282-4](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00282-4).
- Regelin, Malte, Jonas Blume, Jens Pommerencke, Ramin Vakilzadeh, Katrin Witzlau, Marcin Łyszkiewicz, Natalia Zięta, Namita Saran, Axel Schambach, and Andreas Krueger. 2015. "Responsiveness of Developing T Cells to IL-7 Signals Is Sustained by MiR-17~92." *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402248>.
- Reinhart, Brenda J., Frank J. Slack, Michael Basson, Amy E. Pasquienelli, Jill C. Bettlinger, Ann E. Rougvie, H. Robert Horvitz, and Gary Ruvkun. 2000. "The 21-Nucleotide Let-7 RNA Regulates Developmental Timing in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35002607>.
- Rieger, Michael A., and Timm Schroeder. 2012. "Hematopoiesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008250>.
- Robb, Lorraine, Ian Lyons, Ruili Li, Lynne Hartley, Frank Köntgen, Richard P. Harvey, Donald Metcalf, and C. Glenn Begley. 1995. "Absence of Yolk Sac Hematopoiesis from Mice with a Targeted Disruption of the *Scl* Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.7075>.
- Robertson, Keith D. 2002. "DNA Methylation and Chromatin - Unraveling the Tangled Web." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205609>.
- Rodriguez, Antony, Sam Griffiths-Jones, Jennifer L. Ashurst, and Allan Bradley. 2004. "Identification of Mammalian MicroRNA Host Genes and Transcription Units." *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>.
- Saiki, Randall K., David H. Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J. Scharf, Russell Higuchi, Glenn T. Horn, Kary B. Mullis, and Henry A. Erlich. 1988. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>.

- Sanda, Takaomi, Lee N. Lawton, M. Inmaculada Barrasa, Zi Peng Fan, Holger Kohlhammer, Alejandro Gutierrez, Wenxue Ma, et al. 2012. "Core Transcriptional Regulatory Circuit Controlled by the TAL1 Complex in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.007>.
- Sawada, S, and D R Littman. 1993. "A Heterodimer of HEB and an E12-Related Protein Interacts with the CD4 Enhancer and Regulates Its Activity in T-Cell Lines." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.9.5620>.
- Scherr, Michaela, Letizia Venturini, Karin Battmer, Michael Schaller-schoenitz, Daniel Schaefer, Iris Dallmann, Arnold Ganser, and Matthias Eder. 2007. "Lentivirus-Mediated Antagomir Expression for Specific Inhibition of MiRNA Function." *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm971>.
- Schneider, Ulrich, Hans-Ulrich -U Schwenk, and Georg Bornkamm. 1977. "Characterization of EBV-genome Negative 'Null' and 'T' Cell Lines Derived from Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and Leukemic Transformed Non-Hodgkin Lymphoma." *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>.
- Schreiber, Edgar, Patrick Matthias, Michael M. Müller, and Walter Schaffner. 1989. "Rapid Detection of Octamer Binding Proteins with 'Mini Extracts', Prepared from a Small Number of Cells." *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/17.15.6419>.
- Schwarz, Dianne S., György Hutvagner, Tingting Du, Zuoshang Xu, Neil Aronin, and Phillip D. Zamore. 2003. "Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1).
- Shein, H. M., and J. F. Enders. 1962. "TRANSFORMATION INDUCED BY SIMIAN VIRUS 40 IN HUMAN RENAL CELL CULTURES, I. MORPHOLOGY AND GROWTH CHARACTERISTICS\*." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.7.1164>.
- Shivdasani, Ramesh A. 2006. "MicroRNAs: Regulators of Gene Expression and Cell Differentiation." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-030015>.
- Shivdasani, Ramesh A., Erica L. Mayer, and Stuart H. Orkin. 1995. "Absence of Blood Formation in Mice Lacking the T-Cell Leukaemia Oncoprotein Tal-1/SCL." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/373432a0>.
- Slatkin, Montgomery. 2009. "Epigenetic Inheritance and the Missing Heritability Problem." *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.102798>.
- Smith, M. Mitchell. 2002. "Centromeres and Variant Histones: What, Where, When and Why?" *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00331-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00331-9).
- Soler, Eric, Charlotte Andrieu-Soler, Ernie De Boer, Jan Christian Bryne, Supat Thongjuea, Ralph Stadhouders, Robert Jan Palstra, et al. 2010. "The Genome-Wide Dynamics of the Binding of Ldb1 Complexes during Erythroid Differentiation." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.551810>.

- Subramanyam, Deepa, Samy Lamouille, Robert L. Judson, Jason Y. Liu, Nathan Bucay, Rik Derynck, and Robert Blelloch. 2011. "Multiple Targets of MiR-302 and MiR-372 Promote Reprogramming of Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1862>.
- Sun, Deqiang, Min Luo, Mira Jeong, Benjamin Rodriguez, Zheng Xia, Rebecca Hannah, Hui Wang, et al. 2014. "Epigenomic Profiling of Young and Aged HSCs Reveals Concerted Changes during Aging That Reinforce Self-Renewal." *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.002>.
- Tagawa, H., and M. Seto. 2005. "A MicroRNA Cluster as a Target of Genomic Amplification in Malignant Lymphoma [11]." *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403942>.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Temin, Howard M., and Satoshi Mizutani. 1970. "Viral RNA-Dependent DNA Polymerase: RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/2261211a0>.
- Thomas, J. O., and R. D. Kornberg. 1975. "An Octamer of Histones in Chromatin and Free in Solution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.7.2626>.
- Tsang, Alice P., Yuko Fujiwara, Dennis B. Horn, and Stuart H. Orkin. 1998. "Failure of Megakaryopoiesis and Arrested Erythropoiesis in Mice Lacking the GATA-1 Transcriptional Cofactor FOG." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.12.8.1176>.
- Tsang, Alice P., Jane E. Visvader, C. Alexander Turner, Yuko Fujiwara, Channing Yu, Mitchell J. Weiss, Merlin Crossley, and Stuart H. Orkin. 1997. "FOG, a Multitype Zinc Finger Protein, Acts as a Cofactor for Transcription Factor GATA-1 in Erythroid and Megakaryocytic Differentiation." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80318-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80318-9).
- Vagapova, E. R., P. V. Spirin, T. D. Lebedev, and V. S. Prassolov. 2018. "The Role of TAL1 in Hematopoiesis and Leukemogenesis." *Acta Naturae*. <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-4-16-24>.
- Ventura, Andrea, Amanda G. Young, Monte M. Winslow, Laura Lintault, Alex Meissner, Stefan J. Erkeland, Jamie Newman, et al. 2008. "Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the MiR-17~92 Family of MiRNA Clusters." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.019>.
- Venturini, Letizia, Karin Battmer, Mirco Castoldi, Beate Schultheis, Andreas Hochhaus, Martina U. Muckenthaler, Arnold Ganser, Matthias Eder, and Michaela Scherr. 2007. "Expression of the MiR-17-92 Polycistron in Chronic Myeloid Leukemia (CML) CD34+ Cells." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-045104>.

- Vester, Birte, and Jesper Wengel. 2004. "LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA." *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi0485732>.
- Waddington, C. H. 2012. "The Epigenotype. 1942." *International Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>.
- Wadman, Isobel A., Hai Ling Hsu, Melanie H. Cobb, and Richard Baer. 1994. "The MAP Kinase Phosphorylation Site of TAL1 Occurs within a Transcriptional Activation Domain." *Oncogene*.
- Wadman, Isobel A., Hirotaka Osada, Gerald G. Grütz, Alan D. Agulnick, Heiner Westphal, Alan Forster, and Terence H. Rabbitts. 1997. "The LIM-Only Protein Lmo2 Is a Bridging Molecule Assembling an Erythroid, DNA-Binding Complex Which Includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI Proteins." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.3145>.
- Waring, M. J. 1965. "Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids." *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80096-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80096-1).
- Warren, Alan J., William H. Colledge, Mark B.L. Carlton, Martin J. Evans, Andrew J.H. Smith, and Terence H. Rabbitts. 1994. "The Oncogenic Cysteine-Rich LIM Domain Protein Rbtn2 Is Essential for Erythroid Development." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90571-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90571-1).
- Watashi, Koichi, Man Lung Yeung, Matthew F. Starost, Ramachandra S. Hosmane, and Kuan Teh Jeang. 2010. "Identification of Small Molecules That Suppress MicroRNA Function and Reverse Tumorigenesis." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062976>.
- Weber, Kristoffer, Udo Bartsch, Carol Stocking, and Boris Fehse. 2008. "A Multicolor Panel of Novel Lentiviral 'Gene Ontology' (LeGO) Vectors for Functional Gene Analysis." *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.6>.
- Weissman, Irving L. 2000. "Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution." *Cell*. Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X).
- Wen, Jie, Suming Huang, Svetlana D. Pack, Xiaobing Yu, Stephen J. Brandt, and Constance Tom Noguchi. 2005. "Tal1/SCL Binding to Pericentromeric DNA Represses Transcription." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412721200>.
- Wienholds, Erno, and Ronald H.A. Plasterk. 2005. "MicroRNA Function in Animal Development." *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.070>.
- Wightman, B, I Ha, and G Ruvkun. 1993. "Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin-4 Mediates." *Cell*.
- Will, Britta, Li Zhou, Thomas O. Vogler, Susanna Ben-Neriah, Carolina Schinke, Roni Tamari, Yiting Yu, et al. 2012. "Stem and Progenitor Cells in Myelodysplastic Syndromes Show Aberrant Stage-Specific Expansion and Harbor Genetic and

- Epigenetic Alterations." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-399683>.
- Wilson, Nicola K., Samuel D. Foster, Xiaonan Wang, Kathy Knezevic, Judith Schütte, Polynikis Kaimakis, Paulina M. Chilarska, et al. 2010. "Combinatorial Transcriptional Control in Blood Stem/Progenitor Cells: Genome-Wide Analysis of Ten Major Transcriptional Regulators." *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.016>.
- Wright, W E, M Binder, and W Funk. 1991. "Cyclic Amplification and Selection of Targets (CASTing) for the Myogenin Consensus Binding Site." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.8.4104>.
- Xiao, Changchun, Dinis Pedro Calado, Gunther Galler, To Ha Thai, Heide Christine Patterson, Jing Wang, Nikolaus Rajewsky, Timothy P. Bender, and Klaus Rajewsky. 2007. "MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.021>.
- Xie, Xiaohui, Jun Lu, E. J. Kulbokas, Todd R. Golub, Vamsi Mootha, Kerstin Lindblad-Toh, Eric S. Lander, and Manolis Kellis. 2005. "Systematic Discovery of Regulatory Motifs in Human Promoters and 3' UTRs by Comparison of Several Mammals." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03441>.
- Xu, Peizhang, Stephanie Y. Vernooy, Ming Guo, and Bruce A. Hay. 2003. "The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism." *Current Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00250-1).
- Xu, Z., S. Huang, L.-S. Chang, A. D. Agulnick, and S. J. Brandt. 2003. "Identification of a TAL1 Target Gene Reveals a Positive Role for the LIM Domain-Binding Protein Ldb1 in Erythroid Gene Expression and Differentiation." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.21.7585-7599.2003>.
- Xu, Zhixiong, Xianzhang Meng, Ying Cai, Hong Liang, Lalitha Nagarajan, and Stephen J. Brandt. 2007. "Single-Stranded DNA-Binding Proteins Regulate the Abundance of LIM Domain and LIM Domain-Binding Proteins." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1528507>.
- Yan, Hong Li, Geng Xue, Qian Mei, Yu Zhao Wang, Fei Xiang Ding, Mo Fang Liu, Ming Hua Lu, Ying Tang, Hong Yu Yu, and Shu Han Sun. 2009. "Repression of the MiR-17-92 Cluster by P53 Has an Important Function in Hypoxia-Induced Apoptosis." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.214>.
- Yan, W, A Z Young, V C Soares, R Kelley, R Benezra, and Y Zhuang. 1997. "High Incidence of T-Cell Tumors in E2A-Null Mice and E2A/Id1 Double-Knockout Mice." *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.12.7317>.
- Yan, Y., E. A. Hanse, K. Stedman, J. M. Benson, X. H. Lowman, S. Subramanian, and A. Kelekar. 2016. "Transcription Factor C/EBP- $\beta$  Induces Tumor-Suppressor Phosphatase PHLPP2 through Repression of the MiR-17-92 Cluster in Differentiating AML Cells." *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.1>.



- Yi, Rui, Yi Qin, Ian G. Macara, and Bryan R. Cullen. 2003. "Exportin-5 Mediates the Nuclear Export of Pre-MicroRNAs and Short Hairpin RNAs." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>.
- Zamore, Phillip D., and Benjamin Haley. 2005. "Ribo-Gnome: The Big World of Small RNAs." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1111444>.
- Zeng, Yan, Eric J. Wagner, and Bryan R. Cullen. 2002. "Both Natural and Designed Micro RNAs Can Inhibit the Expression of Cognate MRNAs When Expressed in Human Cells." *Molecular Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00541-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00541-5).
- Zhang, Wenzheng, James R. Bone, Diane G. Edmondson, Bryan M. Turner, and Sharon Y. Roth. 1998. "Essential and Redundant Functions of Histone Acetylation Revealed by Mutation of Target Lysines and Loss of the Gcn5p Acetyltransferase." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3155>.
- Zhang, Yanjia, Kimberly J. Payne, Yuhua Zhu, Mary A. Price, Yasmin K. Parrish, Ewa Zielinska, Lora W. Barsky, and Gay M. Crooks. 2005. "SCL Expression at Critical Points in Human Hematopoietic Lineage Commitment ." *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0260>.
- Zhou, Beiyang, Stephanie Wang, Christine Mayr, David P. Bartel, and Harvey F. Lodish. 2007. "MiR-150, a MicroRNA Expressed in Mature B and T Cells, Blocks Early B Cell Development When Expressed Prematurely." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702409104>.
- Zhuo, Wenkun, Weiming Ge, Guolin Meng, Shuaijun Jia, Xiang Zhou, and Jian Liu. 2015. "MicroRNA-20a Promotes the Proliferation and Cell Cycle of Human Osteosarcoma Cells by Suppressing Early Growth Response 2 Expression." *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4098>.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|            |  |
|------------|--|
| %          | Prozent                                    |
| °C         | Grad Celsius                               |
| µl         | Mikroliter                                 |
| µM         | Mikromolar                                 |
| µm         | Mikrometer                                 |
| AAV        | Adeno-assoziierte Viren                    |
| AD         | Aktivierungsdomäne                         |
| AGM-Region | Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region           |
| AGO2       | Argonaute 2                                |
| ALL        | akute lymphatische Leukämie                |
| AML        | akute myeloische Leukämie                  |
| AMO        | anti-microRNA Oligonukleotid               |
| Amp        | Ampicillin                                 |
| APS        | Ammoniumpersulfat                          |
| ATP        | Adenosintriphosphat                        |
| Aza        | 5-Azacytidin                               |
| BCL-2      | <i>B-cell lymphoma 2</i>                   |
| bHLH       | <i>basic-Helix-loop-helix</i>              |
| bp         | Basenpaar                                  |
| BSA        | Bovines Serumalbumin                       |
| cAMP       | cyclisches Adenosinmonophosphat            |
| CBP        | <i>CREB-binding protein</i>                |
| CFU        | <i>Colony forming unit</i>                 |
| ChIP       | Chromatin-Immunopräzipitation              |
| CLL        | chronisch lymphatische Leukämie            |
| CLP        | <i>common lymphoid progenitor</i>          |
| CML        | chronisch myeloische Leukämie              |
| CMP        | <i>common myeloid progenitor</i>           |
| CMV        | Cytomegalovirus                            |
| Ctrl       | Kontrolle                                  |
| CoA        | Koaktivator                                |
| CT-Wert    | <i>cycle threshold</i> -Wert               |
| DC-Assay   | <i>detergent compatible</i> -Protein-Assay |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid                           |
| Dnmt       | DNA-Methyltransferase                      |
| DTT        | Dithiothreitol                             |
| EDTA       | Ethylendiamintetraessigsäure               |
| EGTA       | Ethylenglycoltetraessigsäure               |
| EGR2       | <i>early growth response 2</i>             |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| EP                              | <i>Erythrocyte progenitor</i>                        |
| EPO                             | Erythropoietin                                       |
| ETS1                            | <i>E26 transformation-specific</i>                   |
| FLI1                            | <i>Friend leukemia integration 1</i>                 |
| Flt-3                           | <i>FMS like tyrosine kinase 3</i>                    |
| FKS                             | Fötales Kälberserum                                  |
| FOG1                            | <i>friend of GATA1</i>                               |
| GAPDH                           | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase             |
| GATA                            | <i>GATA binding protein</i>                          |
| GFP                             | grün fluoreszierendes Protein                        |
| GMP                             | <i>granulocyte monocyte progenitors</i>              |
| GlyGly                          | Glycylglycin   |
| GO-Term                         | Gen-Ontologie-Analyse                                |
| GPA                             | Glycophorin-A  |
| H                               | Histon   |
| HAT                             | Histon-Acetyltransferase                             |
| HA-Tag                          | Hämagglutinin-Tag                                    |
| HCl                             | Salzsäure  |
| HDAC                            | Histondeacetylase                                    |
| HEPES                           | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure |
| HSC                             | Hämatopoetische Stammzelle                           |
| IFN- $\gamma$                   | Interferon-gamma                                     |
| IgG                             | Immunglobulin G                                      |
| IL-3                            | Interleukin-3  |
| IL-6                            | Interleukin-6  |
| iPS-Zellen                      | induzierte pluripotente Stammzellen                  |
| IPTG                            | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid           |
| IRES                            | <i>internal ribosome entry site</i>                  |
| kb                              | Kilobase   |
| KCl                             | Kaliumchlorid  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Kaliumdihydrogenphosphat                             |
| L                               | Liter  |
| LB-Medium                       | <i>lysogeny broth</i> Medium                         |
| LDB1                            | <i>LIM domain-binding protein 1</i>                  |
| LMO                             | <i>LIM-only protein</i>                              |
| LNA                             | <i>Locked Nucleic Acid</i>                           |
| LRF                             | <i>Leukemia related factor</i>                       |
| LSD1                            | <i>lysine specific demethylase 1</i>                 |
| LT-HSC                          | <i>long-term</i> Hämatopoetische Stammzelle          |
| MEP                             | <i>megakaryocyte erythroid progenitor</i>            |
| miRNA                           | microRNA   |

|   |   |
|---|---|
| MET   | mesenchymale-epitheliale Transition                                     |
| MgCl <sub>2</sub>                                   | Magnesiumchlorid  |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | Magnesiumsulfat   |
| ml  | Milliliter  |
| MLL   | <i>mixed lineage-leukemia</i>   |
| min   | Minute  |
| mM  | Millimolar  |
| MPP   | <i>multipotent progenitors</i>  |
| mRNA  | <i>messenger RNA</i>  |
| MW  | Mittelwert  |
| NaCl  | Natriumchlorid  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O | Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat                                     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O | Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat                                      |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | Natriumhydrogencarbonat   |
| NCBI  | <i>National Center for Biotechnology Information</i>                    |
| NFIA  | <i>negative nuclear factor IA</i>                                       |
| NF-κB   | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| ng  | Nanogramm   |
| NK-Zelle  | Natürliche Killer Zelle   |
| nM  | Nanomolar   |
| nm  | Nanometer   |
| NP-40   | Nonidet P40   |
| OH-Gruppe   | Hydroxylgruppe  |
| ONPG  | <i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid                              |
| p300  | EP300   |
| P/CAF   | <i>EP300/CREB-binding protein</i> -assoziiierter Kofaktor               |
| PADI4   | Peptidylarginin Deiminase IV  |
| PBS   | Phosphatgepufferte Salzlösung   |
| PCR   | Polymerase-Kettenreaktion   |
| PEI   | Polyethylenimin   |
| Pen/Strep   | Penicillin/Streptomycin   |
| PI  | Protease-Inhibitor  |
| PKA   | Proteinkinase A   |
| pre-miRNA   | <i>precursor microRNA</i>   |
| pri-miRNA   | <i>primary microRNA</i>   |
| PTM   | posttranslationale Modifikation   |
| qRT-PCR   | quantitative <i>Real-time</i> -PCR                                      |
| RFP   | rot fluoreszierendes Protein  |
| RISC  | <i>RNA-induced silencing complex</i>                                    |
| ROS   | <i>reactive oxygen species</i>  |

|               |   |
|---------------|---|
| RUNX1         | <i>runt-related transcription factor 1</i>                    |
| SATB1         | <i>special AT-rich sequence binding 1</i>                     |
| SCF           | Stammzellfaktor   |
| SD            | Standardabweichung  |
| SDS           | Natriumdodecylsulfat  |
| SDS-PAGE      | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese           |
| sek           | Sekunde   |
| SFFV          | <i>Spleen focus-forming virus</i>                             |
| shCtrl        | shControl   |
| SILAC         | <i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i> |
| siRNA         | <i>small interfering RNA</i>                                  |
| SMIR          | <i>small molecule inhibitor of microRNAs</i>                  |
| shRNA         | <i>small nuclear RNA</i>                                      |
| SP1           | <i>Specificity protein 1</i>                                  |
| SSD           | Salmon sperm DNA  |
| ST-HCS        | <i>short-term</i> Hämatopoetische Stammzelle                  |
| SV40          | Simian Virus 40   |
| T-ALL         | T-Zell akute lymphatische Leukämie                            |
| TAE-Puffer    | Tris-Essigsäure-EDTA Puffer                                   |
| TAL1          | <i>T-cell acute lymphocytic leukemia 1</i>                    |
| TEMED         | Tetramethylethylenediamine                                    |
| Th1-Zellen    | Typ-1-T-Helferzellen  |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor-alpha                                      |
| Tris          | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                               |
| TSA           | Trichostatin-A  |
| TSS           | Transkriptionsstartpunkt                                      |
| uORF          | <i>upstream open reading frame</i>                            |
| UTR           | <i>untranslated region</i>                                    |
| UV            | ultraviolett  |

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Nischen der HSC-Bildung und -Expansion während der Embryogenese im Menschen. ....   | 6  |
| Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der Hämatopoese. ....   | 7  |
| Abbildung 1.3. Organisation des Chromatins. ....  | 11 |
| Abbildung 1.4. MiRNA Prozessierung und Reifung von der Transkription der Vorläufer-miRNA bis hin zur reifen funktionsfähigen miRNA.....   | 16 |
| Abbildung 1.5. Schematische Darstellung des hämatopoetischen Systems mit einigen ausgewählten miRNAs.....   | 19 |
| Abbildung 1.6. Struktur des miR-17-92 Cluster und seiner Paraloge. ....   | 24 |
| Abbildung 1.7. Schematische Darstellung der TAL1 Struktur und der verschiedenen Isoformen.....  | 27 |
| Abbildung 1.8. Schematische Darstellung der Bindung von TAL1 zusammen mit seinem Dimerisierungspartner als Heterodimer an die DNA. ....   | 29 |
| Abbildung 1.9. TAL1 bildet einen multifaktoriellen Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren und kann sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren. .... | 31 |
| Abbildung 1.10. Die Expression von TAL1 in den unterschiedlich reifen Zellen des hämatopoetischen Systems.....  | 32 |
| Abbildung 1.11. Epigenetische Regulation von TAL1 während der Erythropoese. ...   | 36 |
| Abbildung 2.1. Vektorkarte des lentiviralen LeGO-iG2 Vektors.....   | 50 |
| Abbildung 2.2. Vektorkarte des lentiviralen LeGO-iT2 Vektors. ....  | 51 |
| Abbildung 2.3. Vektorkarte des lentiviralen SEW-shRNA Vektors. ....   | 52 |
| Abbildung 2.4. Vektorkarte des pGL4.10 (luc2) Vektors (Promega, Madison). ....  | 53 |
| Abbildung 2.5. Vektorkarte des pMirTarget Vektors (OriGene). ....   | 54 |
| Abbildung 2.6. Vektorkarte des pcDNA3 Vektors. ....   | 56 |
| Abbildung 3.1. Überprüfung der miR-17-92 Expression mittels qRT-PCR. ....   | 79 |
| Abbildung 3.2. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der SILAC-basierten Massenspektrometrie zur Identifikation von miR-17-92 <i>Downstream</i> Zielproteinen..            | 80 |
| Abbildung 3.3. Identifikation von miR-17-92 Zielproteinen mithilfe von SILAC-basierter Massenspektrometrie. ....  | 82 |
| Abbildung 3.4. Überexpression von miR-17-92 in Jurkat-Zellen führte zur Reduktion des mRNA und Proteinlevels von TAL1 und seinen Interaktionspartnern.....                        | 83 |
| Abbildung 3.5. <i>TAL1</i> ist ein direktes Zielgen von miR-17-92.....  | 85 |
| Abbildung 3.6. Ein <i>Knockdown</i> von TAL1 in Jurkat- und K562-Zellen führte zu einer Erhöhung der miR-17-92-mRNA Expression.....   | 87 |

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 3.7. <i>Knockdown</i> von TAL1 führt zu einer Reduktion des Proteinlevels der Bindungspartner. ....   | 89  |
| Abbildung 3.8. Der Proteasom-Inhibitor MG132 verhindert den E-Proteinabbau nach TAL1 <i>Knockdown</i> . ....  | 91  |
| Abbildung 3.9. Durch Überexpression von murinem Tal1 kann der inhibitorische Effekt des TAL1 <i>Knockdowns</i> auf E47 und HEB aufgehoben werden. ....                              | 93  |
| Abbildung 3.10. TAL1 inhibiert <i>miR-17-92</i> -mRNA Expression. ....  | 94  |
| Abbildung 3.11. Hypothetische Darstellung der E-Protein Destabilisierung nach TAL1 <i>Knockdown</i> . ....  | 95  |
| Abbildung 3.12. Der inhibitorische Effekt von miR-17-92 auf TAL1 kann durch Mutation der miR-19 <i>Seed</i> -Sequenzen aufgehoben werden. ....                                      | 97  |
| Abbildung 3.13. MiR-19a und miR-19b sind die am stärksten exprimierten miRNAs des miR-17-92 Cluster in den analysierten Zellen. ....  | 99  |
| Abbildung 3.14. Der TAL1/E47-Komplex bindet an den <i>MIR17HG</i> -Promotor. ....   | 100 |
| Abbildung 3.15. Der Bereich des Transkriptionsstarts des <i>MIR17HG</i> -Promotors zeigt hohe H3K4me3 in allen getesteten Zelllinien. ....  | 101 |
| Abbildung 3.16. TAL1- und E47-Bindung am <i>MIR17HG</i> -Promotor in K562- und Jurkat-Zellen nach TAL1 <i>Knockdown</i> . ....  | 103 |
| Abbildung 3.17. Der TAL1/E47-Komplex bindet an den <i>MIR17HG</i> -Promotor. ....   | 106 |
| Abbildung 3.18. MYC bindet an den <i>MIR17HG</i> -Promotor. ....  | 108 |
| Abbildung 3.19. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für den CFU-Assay mit CD34 <sup>+</sup> -Zellen. ....  | 109 |
| Abbildung 3.20. MiR-17-92 Expression beeinflusst die erythroide Differenzierung in einem CFU-Assay. ....  | 110 |
| Abbildung 3.21. MiR-17-92 Überexpression inhibiert den Oberflächenmarker CD4. ....  | 112 |
| Abbildung 3.22. Das <i>CD4</i> -Gen besitzt eine doppelte E-Box im Bereich seiner <i>Enhancer</i> Region und wird von TAL1 und E47 gebunden. ....                                   | 113 |
| Abbildung 3.23. Altersabhängige miR-17-92 Expression in CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen scheint durch den Methylierungszustand des <i>MIR17HG</i> -Promotors beeinflusst zu werden. .... | 115 |
| Abbildung 9.1. TAL1 bindet entlang des <i>MIR17HG</i> -Gens an unterschiedlichen Stellen. ....  | 164 |
| Abbildung 9.2. NKX3-1 konnte auch in der Massenspektrometrie identifiziert werden. ....   | 165 |
| Abbildung 9.3. qRT-PCR Analyse der miR-17-92 und TAL1 Expression in CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen. ....  | 166 |
| Abbildung 9.4. Sequenz der pre-miRNAs von miR-19a und miR-19b. ....   | 167 |
| Abbildung 9.5. STRING-Analyse der in der Massenspektrometrie herunterregulierten Proteine. ....   | 168 |
| Abbildung 9.6. Potentielle miRNA Bindestellen von TAL1, E47, HEB und LDB1. ....   | 170 |

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 9.7. Endogene Expression von TAL1, E47 und HEB in den verwendeten Zelllinien.....               | 171 |
| Abbildung 9.8. Mutation der E-Box auf dem <i>MIR17HG</i> -Promotor. ....                                  | 172 |
| Abbildung 9.9. Gating-Strategie zur Überprüfung der Reinheit der CD3 <sup>+</sup> -T-Zell-Isolation. .... | 173 |
| Abbildung 9.10. Gating-Strategie zur Überprüfung der Reinheit der CD34 <sup>+</sup> -Isolation. ....      | 174 |
| Abbildung 9.11. Gating-Strategie zur Überprüfung der Transduktionseffizienz mit GFP. ....                 | 175 |
| Abbildung 9.12. Gating-Strategie zur Überprüfung der Transduktionseffizienz mit GFP und Tomato. ....      | 176 |
| Abbildung 9.13. Herunterregulierte Proteine der Massenspektrometrie.....                                  | 181 |

## 8.2 Tabellenverzeichnis

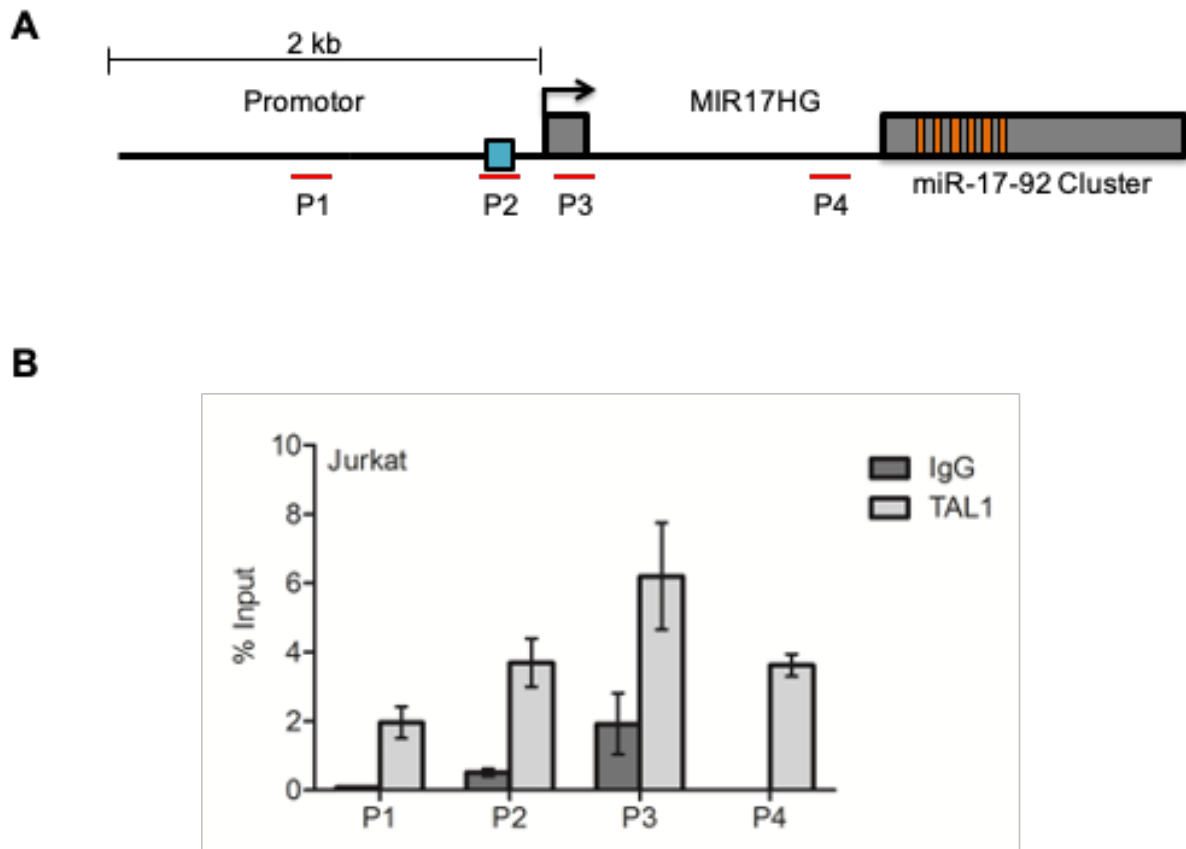
|  |    |
|--|----|
| Tabelle 2. 1 Übersicht aller verwendeter Geräte. ....  | 42 |
| Tabelle 2. 2 Übersicht über die verwendeten FACS-Antikörper. ....  | 49 |
| Tabelle 2. 3 Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer und Enzymschnittstellen für die Klonierungen in die LeGO Vektoren. ....                                      | 51 |
| Tabelle 2. 4 Übersicht über die verwendeten Klonierungs- und Mutageneseprimer und Enzymschnittstellen für die Klonierungen in den pGL4.10 Vektor.....                      | 53 |
| Tabelle 2. 5 Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer und Enzymschnittstellen für die Klonierungen der TAL1-3'-UTR in den pMirTarget Vektor. ....                  | 55 |
| Tabelle 2. 6 Übersicht über die verwendeten Primer für die Mutagenese der 3'-UTR von TAL1 für die Luciferase-Konstrukte. ....  | 55 |
| Tabelle 2. 7 Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer und Enzymschnittstellen für die Klonierungen des humanen TAL1 und des humanen E47 in den pcDNA3 Vektor. .... | 57 |
| Tabelle 2. 8 Beispiel eines PCR Programms mit der Phusion oder Q5 Polymerase. ....   | 58 |
| Tabelle 2. 9 Beispiel eines Pipettier-Schemas für einen 50 µl PCR Ansatz. ....   | 58 |
| Tabelle 2. 10 Beispiel für einen 10 µl Ansatz eines Restriktionsverdau. ....   | 60 |
| Tabelle 2. 11 Beispiel eines Pipettier Schemas eines Ligationsansatzes. ....   | 61 |
| Tabelle 2. 12 Pipettierschema einer Sequenzierungsreaktion. ....   | 63 |
| Tabelle 2. 13 Pipettierschema für eine Reaktion einer qRT-PCR mit SYBR Green..   | 65 |
| Tabelle 2. 14 Übersicht über das verwendete qRT-PCR Programm mit SYBR Green am StepOne Plus <i>Real-time</i> Cycler. ....  | 66 |
| Tabelle 2. 15 Übersicht über die in der qRT-PCR verwendeten Primerpaare.....   | 66 |
| Tabelle 2. 16 Pipettierschema für eine Reaktion einer qRT-PCR mit <i>TaqMan</i> -Sonde. ....   | 67 |



|   |    |
|---|----|
| Tabelle 2. 17 Übersicht über das verwendete qRT-PCR Programm mit <i>TaqMan</i> -Sonde am StepOne Plus <i>Real-time</i> Cyclor.....                                      | 67 |
| Tabelle 2. 18 Übersicht über die in der qRT-PCR verwendeten <i>TaqMan</i> -Sonden....   | 68 |
| Tabelle 2. 19 Übersicht über das verwendete qRT-PCR Programm für das miR-17-92 Cluster <i>Real-time</i> PCR Assay Kit mit dem StepOne <i>Real-time</i> PCR Cyclor. .... | 68 |
| Tabelle 2. 20 Pipettierschema des SDS-Polyacrylamid Gels. ....  | 71 |
| Tabelle 2. 21 Übersicht über die verwendete Western Blot Primärantikörper. ....   | 71 |
| Tabelle 2. 22 Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper. ....   | 72 |
| Tabelle 2. 23 Pipettierschema für eine Reaktion einer qRT-PCR mit CHIP-DNA. ....  | 75 |
| Tabelle 2. 24 Übersicht über das verwendete qRT-PCR Programm bei einer CHIP-PCR mit dem LightCycler480 von Roche. ....  | 75 |
| Tabelle 2. 25 Übersicht über die verwendeten CHIP-Primer in der qRT-PCR. ....   | 76 |
| Tabelle 2. 26 Übersicht über die im CHIP-Assay verwendeten Antikörper. ....   | 76 |

## 9 Anhang

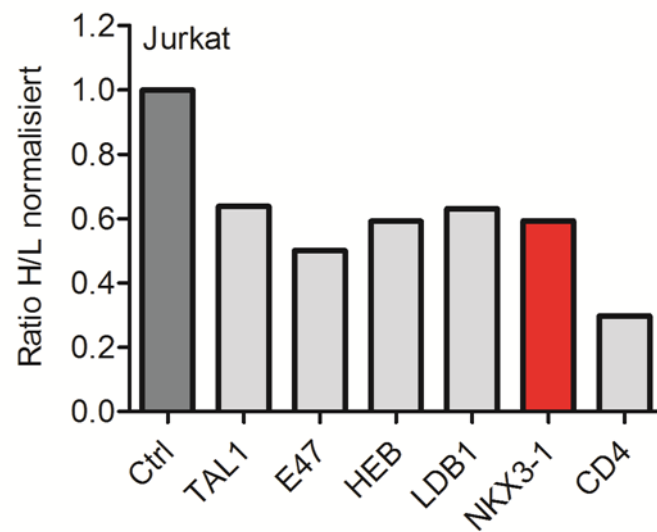
## Anhang 1



**Abbildung 9.1. TAL1 bindet entlang des *MIR17HG*-Gens an unterschiedlichen Stellen.**

(A) Schematische Darstellung des *MIR17HG*-Promotors, ein nicht-kodierendes Exon (kleine graue Box) und das zweite Exon (große graue Box), welches das miR-17-92 Cluster (orange) enthält. Vor dem Transkriptionsstart befindet sich eine E-Box mit der Sequenz CANNTG (blaue Box). Die CHIP-Primer P1 bis P4 (roter Balken) binden an verschiedenen Bereich des Promotors. (B) Der CHIP-Assay zeigt TAL1-Bindung an allen Primerpositionen entlang des *MIR17HG*-Gens in Jurkat-Zellen. (n=3)

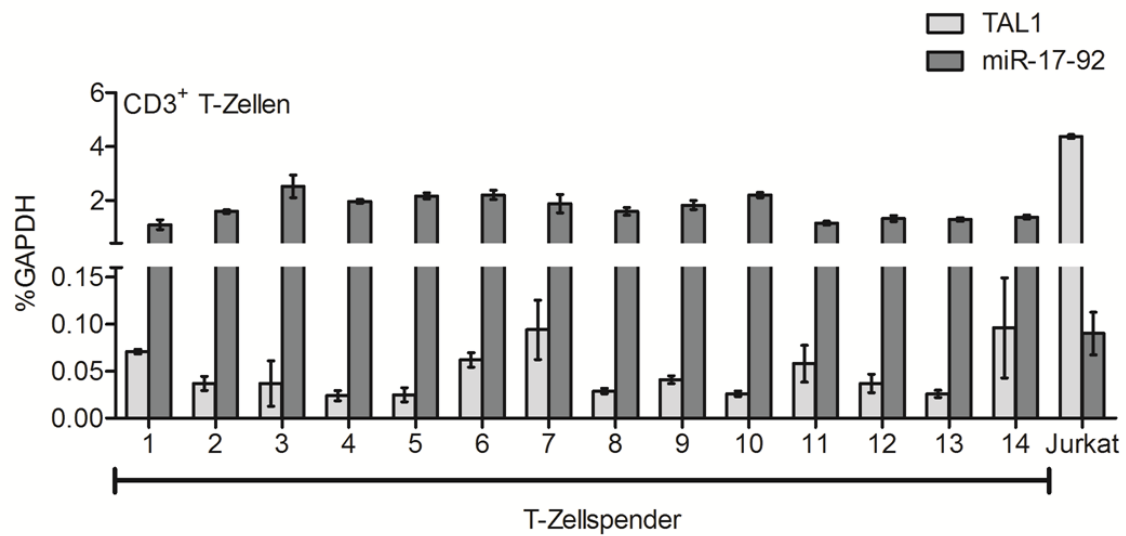
## Anhang 2



**Abbildung 9.2. NKX3-1 konnte auch in der Massenspektrometrie identifiziert werden.**

*NKX3-1* ist ein bekanntes miR-17-92-Zielgen und wird von TAL1 aktiviert. In der Massenspektrometrie konnte NKX3-1 um eine H/L Ratio von 0,59 herunterreguliert vorgefunden werden. Die Werte wurden gebildet aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.

## Anhang 3



**Abbildung 9.3. qRT-PCR Analyse der miR-17-92 und TAL1 Expression in CD3<sup>+</sup>-T-Zellen.**

CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mittels MicroBead-Markierung und magnetischer Separation mithilfe des AutoMACS Pro Separator Systems aus Thrombozyten-Spenden von gesunden, freiwilligen Spendern isoliert. Die RNA wurde aufgereinigt und mit TAL1- und miR-17-92-spezifischen *TaqMan*-Sonden in der qRT-PCR auf ihre Expression überprüft. Zusätzlich wurde die Expression in T-ALL Jurkat-Zellen bestimmt. Die Werte wurden als % GAPDH dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus drei unabhängigen Messwerten. (n=14)

## Anhang 4

## miR-19a und miR-19b Vorläufer-Sequenz

## miR-19a:

gcagtcctctgtagttttgcatagttgcactacaagaagaatgtagttgtgcaaactcatg  
 caaaactgatgggtggcctgc

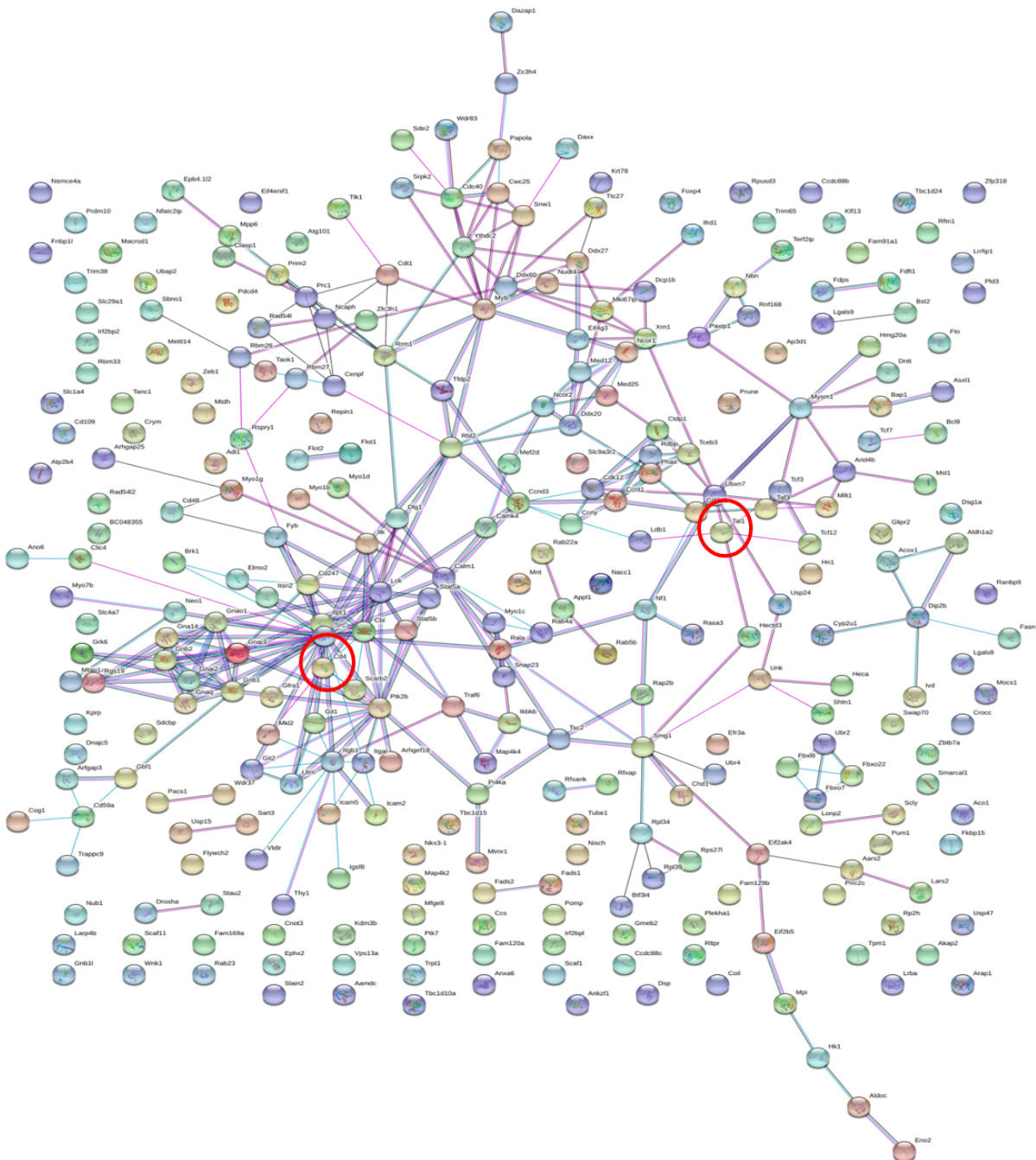
## miR-19b:

cactgttctatggtagttttgcaggtttgcattccagctgtgtgatattctgctgtgcaaact  
 caatgcaaaaactgactgtggtagtg

**Abbildung 9.4. Sequenz der pre-miRNAs von miR-19a und miR-19b.**

Gelb markiert ist die Sequenz der reifen miRNA, in rot markiert ist die eine Base in der sich miR-19a und miR-19b unterscheiden. Unterstrichen ist die *Seed*-Sequenz. Die Sequenzen der pre-miRNAs sind nicht identisch.

## Anhang 5

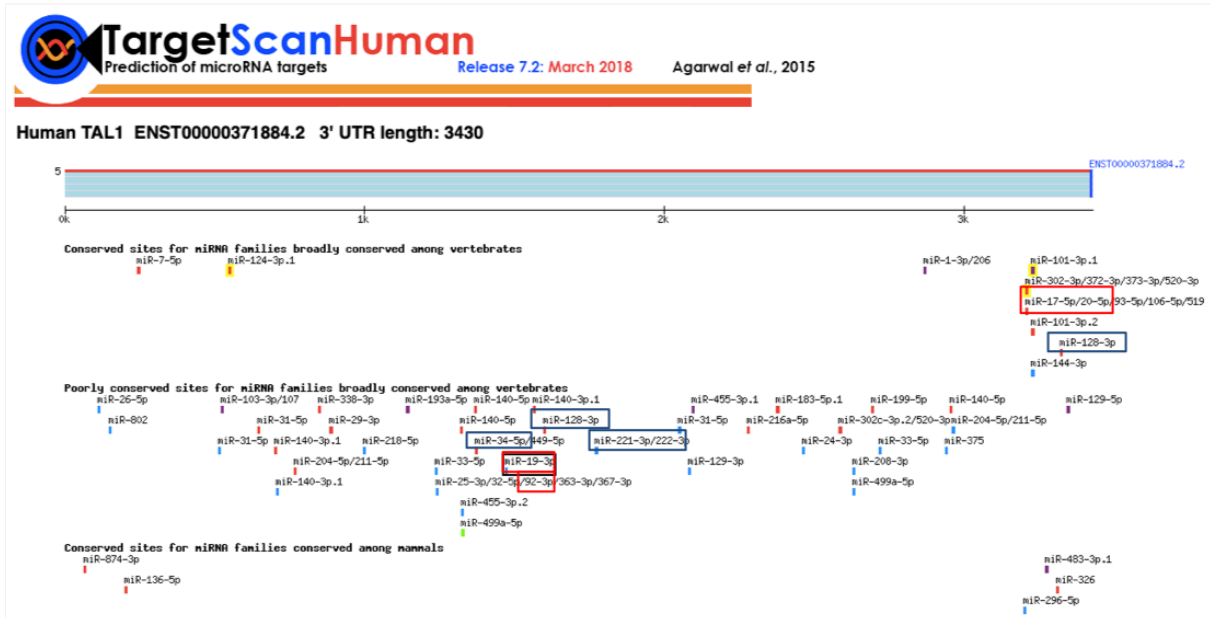


**Abbildung 9.5. STRING-Analyse der in der Massenspektrometrie herunterregulierten Proteine.**

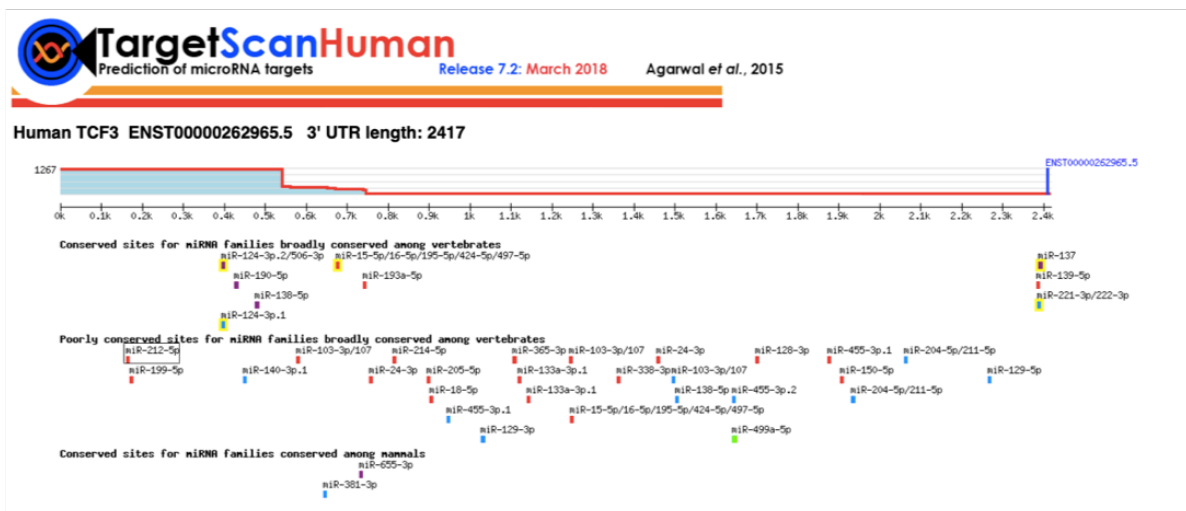
In der Massenspektrometrie konnten 324 Proteine um eine H/L Ratio von kleiner als 0,7 durch miR-17-92 herunterreguliert vorgefunden werden. Durch eine STRING-Analyse, die die Protein-Interaktionen aufzeigen kann, wurde keine direkte Interaktion zwischen CD4 und TAL1 gefunden. Beide Proteine sind durch einen roten Kreis markiert, TAL1 rechts, CD4 links angeordnet.

Anhang 6

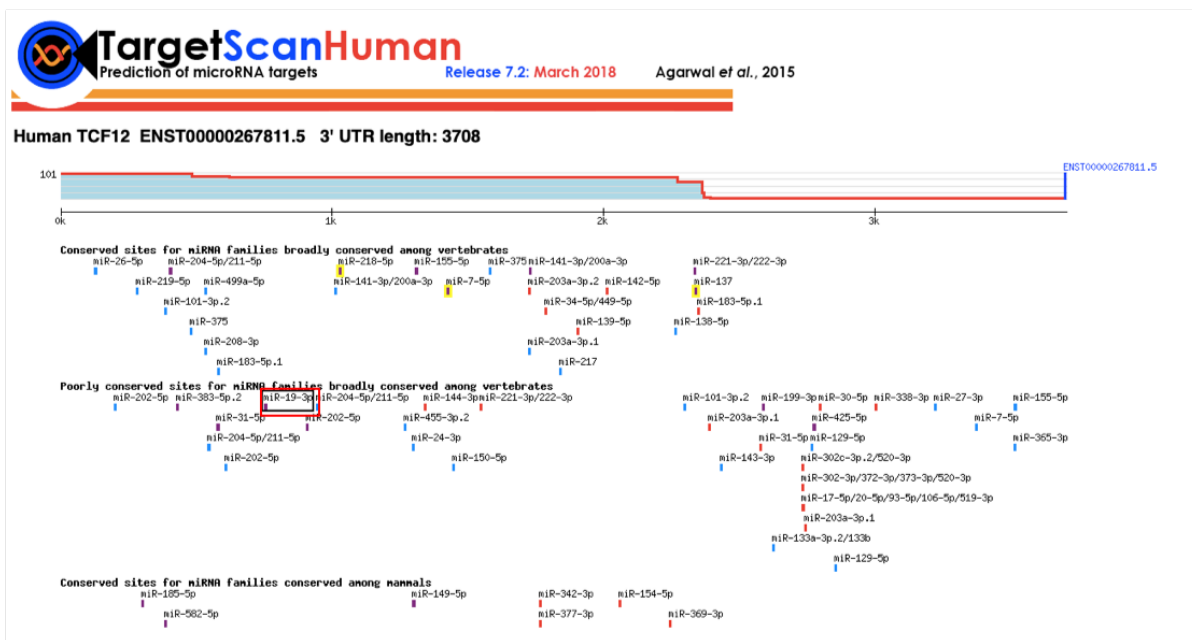
TAL1



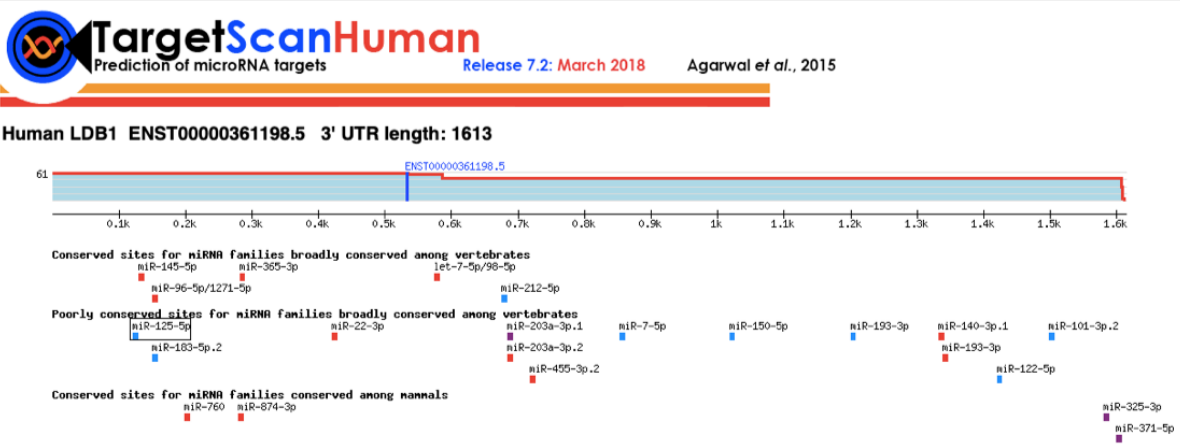
E47



## HEB



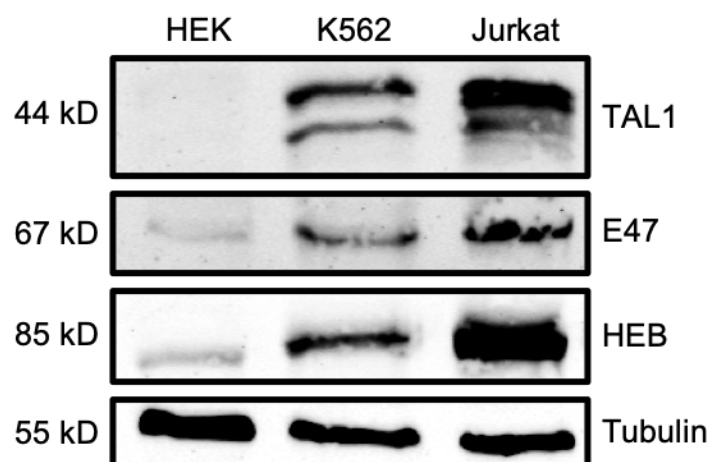
## LDB1

**Abbildung 9.6. Potentielle miRNA Bindestellen von TAL1, E47, HEB und LDB1.**

Mit TargetScan ist es möglich, alle potentiellen miRNA Bindestellen auf der 3'-UTR eines bestimmten Gens zu identifizieren. Gezeigt sind die konservierten und schwach konservierten miRNA Bindestellen innerhalb aller Wirbeltiere. Auf der 3'-UTR von TAL1 sind in rot alle potentiellen Bindestellen des miR-17-92 Clusters umkreist. In Blau sind alle anderen miRNA Bindestellen markiert, die bei der Analyse der 3'-UTR von TAL1 mittels Luciferase-Assay untersucht wurden. Auf der 3'-UTR von E47 und LDB1 sind keine potentiellen Bindestellen von miR-17-92 zu finden. Die 3'-UTR von HEB weist eine schwach konservierte potentielle Bindestelle für miR-19 auf (rot markiert).

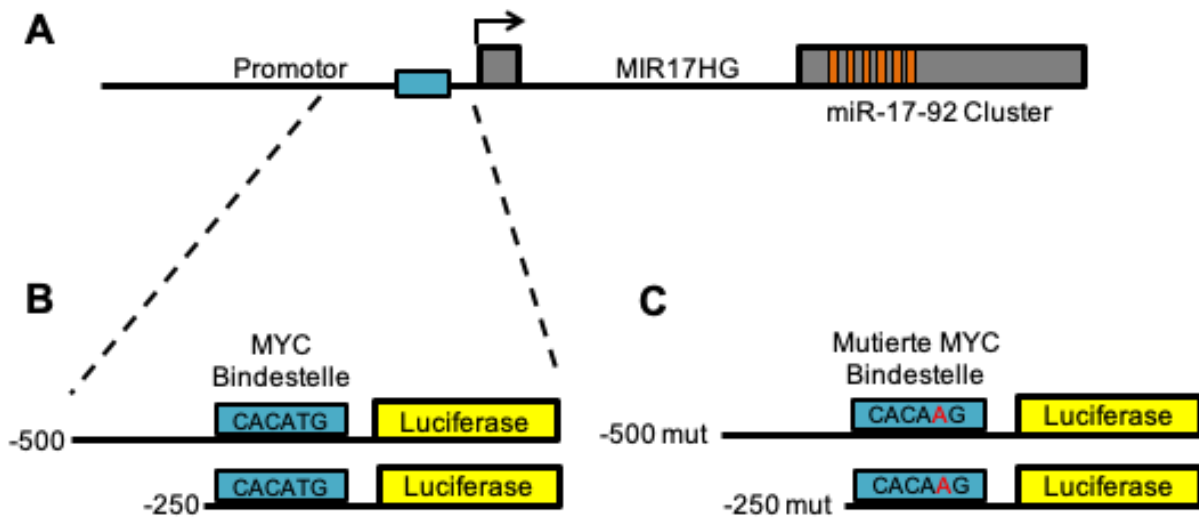


## Anhang 7



**Abbildung 9.7. Endogene Expression von TAL1, E47 und HEB in den verwendeten Zelllinien.**  
Der Western Blot zeigt die Proteinexpression von TAL1, E47 und HEB in HEK293T-, K562- und Jurkat-Zellen. Tubulin fungierte als Ladekontrolle.

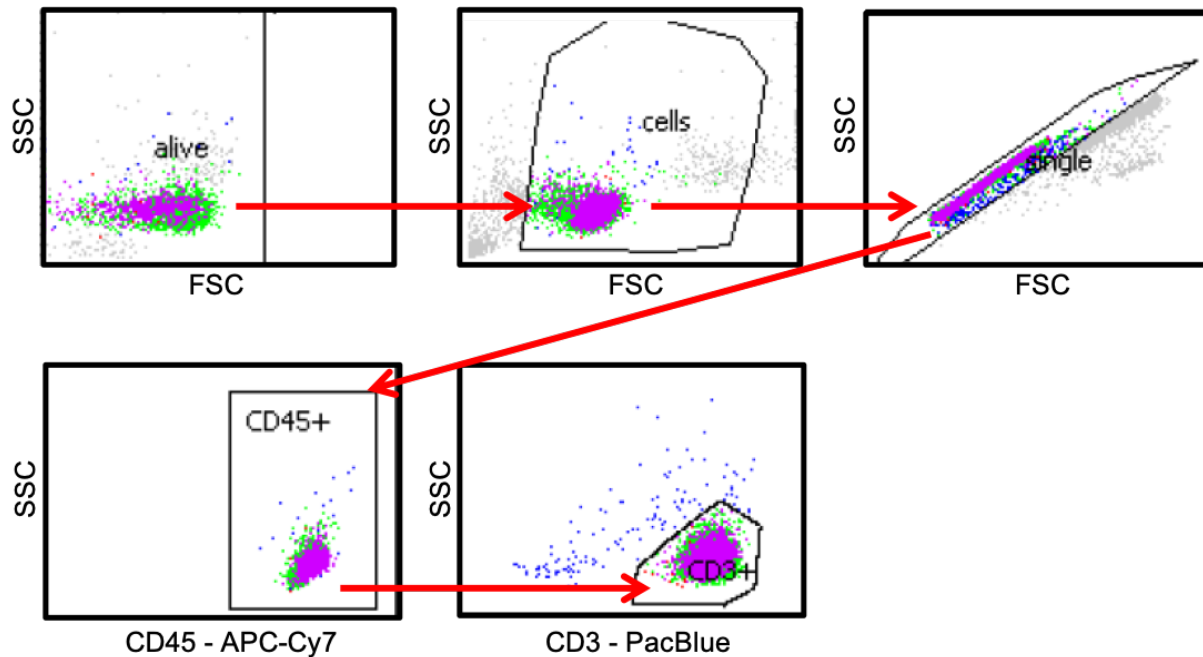
## Anhang 8



**Abbildung 9.8. Mutation der E-Box auf dem *MIR17HG*-Promotor.**

(A) Schematische Darstellung des *MIR17HG*-Promotors, ein nicht-kodierendes Exon (kleine graue Box) und das zweite Exon (große graue Box), welches das miR-17-92 Cluster (orange) enthält. Vor dem Transkriptionsstart befindet sich eine E-Box mit der Sequenz CANNTG (blaue Box). (B) Es wurden Deletions-Konstrukte von 500 und 250 Basenpaaren Länge hergestellt und vor ein Luciferase-Reportergen kloniert. Die beschriebene MYC Bindestelle ist eine E-Box. (C) Um die E-Box zu zerstören, wurde die Sequenz CACATG zu CACAAG mutiert

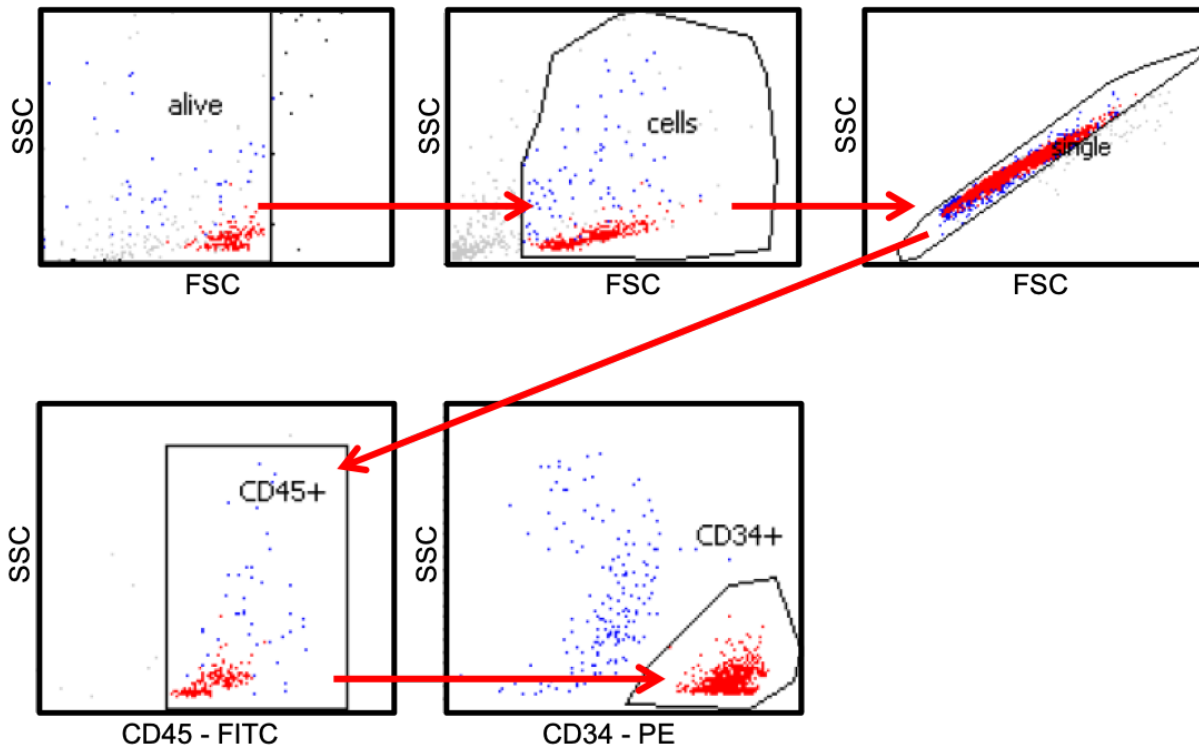
## Anhang 9



**Abbildung 9.9. Gating-Strategie zur Überprüfung der Reinheit der CD3<sup>+</sup>-T-Zell-Isolation.**

Die Isolation der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen mittels MicroBead-Markierung und anschließender magnetischer Sortierung durch das AutoMACS Pro Separator System wurde anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit überprüft. Durch SSC und FSC wurden zunächst lebende einzelne Zellen festgelegt. Anschließend wurden alle CD45<sup>+</sup>-Immunzellen bestimmt, aus denen dann alle CD3<sup>+</sup>-T-Zellen ausgewählt wurden.

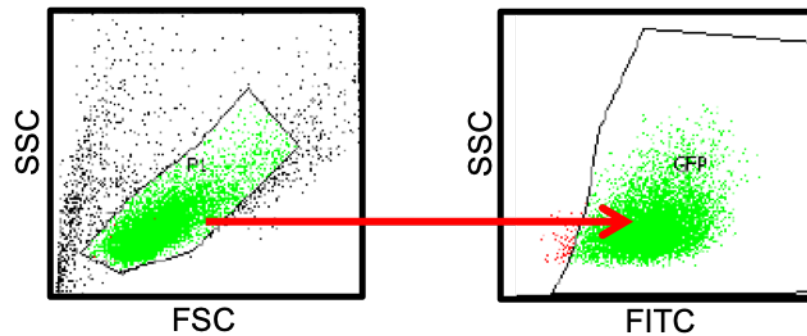
## Anhang 10



**Abbildung 9.10. Gating-Strategie zur Überprüfung der Reinheit der CD34<sup>+</sup>-Isolation.**

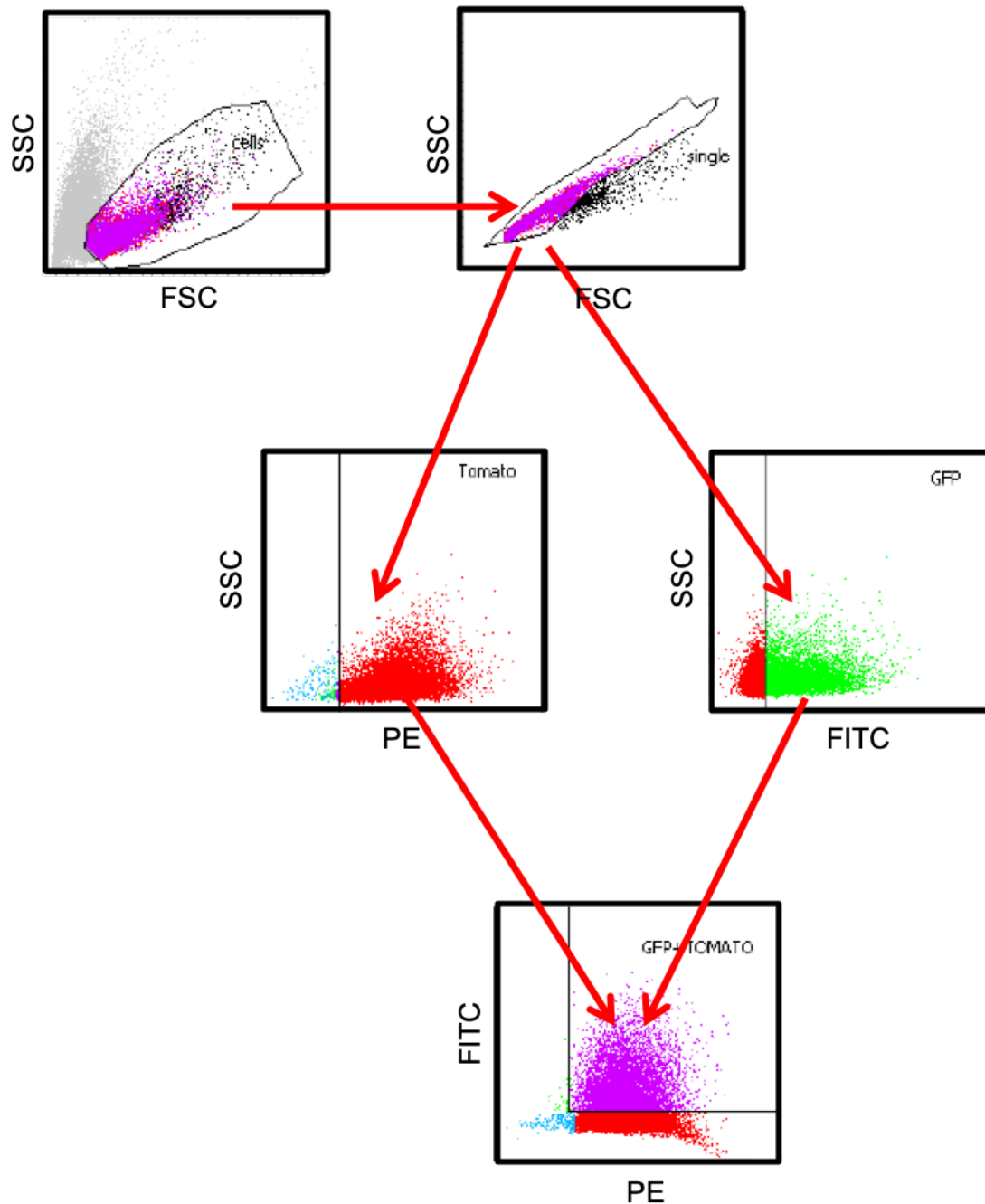
Die Isolation der CD34<sup>+</sup>-Zellen mittels MicroBead-Markierung und anschließender magnetischer Sortierung durch das QuadroMACS Separator System wurde anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit überprüft. Durch SSC und FSC wurden zunächst lebende einzelne Zellen festgelegt. Anschließend wurden alle CD45<sup>+</sup>-Immunezellen bestimmt, aus denen dann alle CD34<sup>+</sup>-Stammzellen ausgewählt wurden.

## Anhang 11

**Abbildung 9.11. Gating-Strategie zur Überprüfung der Transduktionseffizienz mit GFP.**

Jurkat-, K562- und CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit einem SEW oder einem LeGO-iG2 Vektor transduziert, auf denen eine GFP-Fluoreszenz zur Unterscheidung von positiv transduzierten Zellen liegt. Drei bis sieben Tage nach Transduktion wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf ihre Transduktionseffizienz anhand ihres GFP-Signals überprüft. Die lebenden Zellen wurden zunächst durch SSC und FSC bestimmt. Anschließend wurde die GFP<sup>+</sup>-Zellen durch den FITC-Kanal bestimmt. Eine Antikörper-Färbung war hierzu nicht notwendig.

## Anhang 12



**Abbildung 9.12. Gating-Strategie zur Überprüfung der Transduktionseffizienz mit GFP und Tomato.**

Jurkat-Zellen wurden mit einem SEW-Vektor, der eine GFP-Fluoreszenz enthält und einem LeGO-iT2-Vektor, der eine Tomato-Fluoreszenz enthält, transduziert. Drei bis sieben Tage nach Transduktion wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf ihre Transduktionseffizienz anhand ihres GFP/Tomato-Signals überprüft. Die lebenden Zellen wurden zunächst durch SSC und FSC bestimmt. Anschließend wurde die GFP<sup>+</sup>-Zellen durch den FITC-Kanal bestimmt. Die Tomato<sup>+</sup>-Zellen konnten mithilfe des PE-Kanals festgelegt werden. Eine Antikörper-Färbung war hierzu nicht notwendig. Anschließend wurden die doppelt-positiven Zellen mit dem FITC und PE-Kanal identifiziert.

## Anhang 13

## Herunterregulierte Proteine durch LC-MS/MS

| Protein names  | Gene names                               | H/L Ratio |
|--|--|-----------|
| Desmoplakin  | DSP;DSP variant protein                  | 0,1932295 |
| Desmoglein-1   | DSG1                                     | 0,248525  |
| T-cell surface glycoprotein CD4  | CD4                                      | 0,297545  |
| Keratinocyte proline-rich protein  | KPRP                                     | 0,304895  |
| Protein EFR3 homolog A   | EFR3A                                    | 0,318425  |
| Soluble lamin-associated protein of 75 kDa   | FAM169A                                  | 0,338275  |
| Retinal dehydrogenase 2  | ALDH1A2                                  | 0,35645   |
| Thy-1 membrane glycoprotein  | THY1                                     | 0,37713   |
| Mannose-6-phosphate isomerase  | MPI                                      | 0,381305  |
| Unconventional myosin-VIb  | MYO7B;DKFZp686A08248                     | 0,39272   |
| Phosphorylated adapter RNA export protein  | PHAX                                     | 0,399325  |
| Zinc finger protein 318  | ZNF318                                   | 0,4034    |
| DNA nucleotidylxotransferase   | DNTT                                     | 0,408855  |
| Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short;Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas | GNAS;GSA                                 | 0,40949   |
| Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter  | EIF4ENIF1                                | 0,41228   |
| T-cell receptor beta-1 chain C region;T-cell receptor beta-2 chain C region  | TRBC1;TRB;TRBC2;TRBV28;B2M               | 0,41298   |
| Programmed cell death protein 4  | PDCD4                                    | 0,421375  |
| Anoctamin;Anoctamin-6  | ANO6                                     | 0,421375  |
| Flotillin-1  | FLOT1                                    | 0,431995  |
| Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha  | GNAO1                                    | 0,438625  |
| Unconventional myosin-Ig;Minor histocompatibility antigen HA-2   | MYO1G                                    | 0,45025   |
|  | FLJ00293                                 | 0,451445  |
| Coiled-coil domain-containing protein 88B  | CCDC88B                                  | 0,455125  |
| Transcription elongation factor B polypeptide 3  | TCEB3                                    | 0,45695   |
| Unconventional myosin-Ic   | MYO1C                                    | 0,456955  |
| Uncharacterized protein C3orf17  | C3orf17                                  | 0,45794   |
| CD109 antigen  | CD109                                    | 0,46468   |
| Utrophin   | UTRN                                     | 0,468825  |
| Centromere protein F   | CENPF                                    | 0,468835  |
| Cyclin-Y   | CCNY                                     | 0,474635  |
| Raftlin  | RFTN1                                    | 0,47799   |
| Lactadherin;Lactadherin short form;Medin   | MFGE8                                    | 0,480235  |
| Fatty acid desaturase 2  | FADS2                                    | 0,483245  |
| Krueppel-like factor 13  | KLF13                                    | 0,488285  |
| Fatty acid desaturase 1  | FADS1                                    | 0,48902   |
| Ketimine reductase mu-crystallin   | CRYM                                     | 0,490155  |
| Unconventional myosin-Ib   | MYO1B                                    | 0,49108   |
| Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2   | YTHDC2                                   | 0,49108   |
| Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1   | LRRFIP1                                  | 0,493315  |
| Squalene synthase  | FDFT1                                    | 0,49513   |
| Helicase ARIP4   | RAD54L2                                  | 0,49803   |
| Headcase protein homolog   | HECA                                     | 0,50025   |
| Transcription factor E2-alpha  | TCF3                                     | 0,5006    |
| Phosphatidylinositol 4-kinase alpha  | PIK4CA variant protein;PI4KA;hCG_1999854 | 0,501475  |
| Lysine-specific demethylase 3B   | KDM3B;JMJD1B                             | 0,5038    |
| Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1   | ARAP1                                    | 0,5043    |
| Lon protease homolog 2, peroxisomal  | LONP2                                    | 0,51203   |
| Ribonucleoside-diphosphate reductase;Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit  | RRM1                                     | 0,51418   |
| CD59 glycoprotein  | CD59                                     | 0,518135  |
| Neogenin   | NEO1                                     | 0,51942   |
| AT-rich interactive domain-containing protein 4B   | ARID4B                                   | 0,51945   |
| Splicing factor, arginine/serine-rich 19   | SR-A1;SCAF1                              | 0,521255  |
| Regulator of G-protein signaling 19  | RGS19                                    | 0,52164   |
| Ras-related protein Rap-2b   | DKFZp547A0616;RAP2B                      | 0,522325  |
| O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD1  | MACROD1                                  | 0,52366   |
| Signal transducer and activator of transcription;Signal transducer and activator of transcription 5B                                     | STAT5B                                   | 0,524355  |
| Zinc finger C3H1 domain-containing protein   | ZFC3H1                                   | 0,52457   |
| F-box only protein 22  | FBXO22                                   | 0,525105  |
| Tyrosine-protein kinase ITK/TSK  | ITK                                      | 0,52659   |
| Rho guanine nucleotide exchange factor 18  | ARHGEF18                                 | 0,527425  |
| Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1  | PACS1                                    | 0,528115  |
| Copper chaperone for superoxide dismutase;Superoxide dismutase [Cu-Zn]   | CCS                                      | 0,52924   |
| Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1  | GLIPR2;C9orf19                           | 0,53093   |
| RNA-binding protein 33   | RBM33                                    | 0,53127   |
| Bone marrow stromal antigen 2  | BST2                                     | 0,533065  |
| Condensin complex subunit 2  | NCAPH                                    | 0,53563   |
| Tyrosine-protein kinase Lck;Non-specific protein-tyrosine kinase   | LCK                                      | 0,536265  |
| Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2;Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1                          | GNAI2;WUGSC;H_LUCA16.1;GNAI1             | 0,53671   |
| Guanine nucleotide-binding protein G(i)(G(S))G(T) subunit beta-1   | GNB1                                     | 0,53718   |
| SNW domain-containing protein 1  | SNW1                                     | 0,54043   |
| Transcriptional activator Myb  | MYB/NFIB fusion;MYB;c-myb                | 0,542315  |
| Unconventional myosin-Ic   | MYO1D;DKFZp686A01173                     | 0,54309   |
| WD repeat domain-containing protein 83   | WDR83                                    | 0,543195  |
| mRNA-decapping enzyme 1B   | DCP1B                                    | 0,543995  |
| Protein XRP2   | RP2                                      | 0,5463    |
| Serine/threonine-protein kinase WNK1   | WNK1                                     | 0,550865  |
| Protein regulator of cytokinesis 1   | PRC1                                     | 0,552835  |

| Protein names  | Gene names                    | H/L Ratio       |
|--|-------------------------------|-----------------|
| T-cell surface glycoprotein CD3 zeta chain   | CD247                         | 0,554235        |
|  | EPB41L2                       | 0,55434         |
| Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1   | ITPR1                         | 0,5545          |
| Transcription factor 7   | TCF7                          | 0,555055        |
| ARF GTPase-activating protein GIT1   | GIT1                          | 0,55623         |
| Glucocorticoid modulatory element-binding protein 2  | GMEB2                         | 0,55687         |
| Leydig cell tumor 10 kDa protein homolog   | C19orf53                      | 0,55704         |
| Retinoblastoma-like protein 2  | RBL2;DKFZp781K2028            | 0,557445        |
| TBC1 domain family member 24   | TBC1D24                       | 0,55746         |
| Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3  | SART3                         | 0,557475        |
| Rho GTPase-activating protein 25   | KIAA0053;HEL-S-308;ARHGAP25   | 0,557615        |
| Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein  | LRBA                          | 0,55863         |
| Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1  | CHD1                          | 0,562355        |
| TBC1 domain family member 10A  | TBC1D10A                      | 0,56289         |
| Synaptosomal-associated protein;Synaptosomal-associated protein 23   | SNAP23                        | 0,562935        |
| Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha  | GNAI3                         | 0,564325        |
| Hexokinase;Hexokinase-1  | HK1                           | 0,564425        |
| Forkhead box protein P4  | DKFZp762O213;FOXP4            | 0,565225        |
| G1/S-specific cyclin-D3  | CCND3                         | 0,566665        |
| RING finger protein unknemk homolog  | hCG_1776081;UNK               | 0,56718         |
| Farnesyl pyrophosphate synthase  | FDPS                          | 0,56752         |
| Putative Polycomb group protein ASXL1  | ASXL1;ASXH1                   | 0,56902         |
| CCR4-NOT transcription complex subunit 3   | CNOT3;FLJ00420                | 0,5716          |
| Protein TANC1  | TANC1                         | 0,571685        |
| Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV  | CAMK4                         | 0,572015        |
| Galectin;Galectin-9  | LGALS9                        | 0,572015        |
| Chloride intracellular channel protein;Chloride intracellular channel protein 4  | CLIC4                         | 0,572905        |
| Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase;Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2                                      | MAP4K2                        | 0,572985        |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2   | GNB2                          | 0,574225        |
| General transcription factor IIE subunit 1   | GTF2E1                        | 0,574815        |
| Histone H2A deubiquitinase MYSM1   | MYSM1                         | 0,575455        |
| Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3   | EIF4G3                        | 0,57596         |
|  | DAZAP1/MEF2D fusion           | 0,577435        |
| Immunoglobulin superfamily member 8  | IGSF8                         | 0,5794          |
| NKG2D ligand 2;Retinoic acid early transcript 1G protein   | ULBP2;RAET1L;RAET1H;RAET1G    | 0,580805        |
| DNA replication factor Cdt1  | CDT1                          | 0,58132         |
| MAGUK p55 subfamily member 6   | MPP6                          | 0,58222         |
| Nuclear receptor corepressor 2   | NCOR2                         | 0,583525        |
| Nibrin   | NBN                           | 0,58371         |
| Protein Daple  | CCDC88C                       | 0,58413         |
| Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1;Cyclic pyranopterin monophosphate synthase;Cyclic pyranopterin monophosphate synthase accessory protein | MOCS1                         | 0,58477         |
| Equilibrative nucleoside transporter 1   | SLC29A1                       | 0,58491         |
| Mitogen-activated protein kinase;Mitogen-activated protein kinase 9;Mitogen-activated protein kinase 10  | MAPK9;MAPK10                  | 0,587885        |
| Ras-related protein Rab-22A  | RAB22A                        | 0,5884          |
| Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14  | GNA14                         | 0,58895         |
| Galectin;Galectin-8  | LGALS8                        | 0,59042         |
| Interferon regulatory factor 2-binding protein 2   | IRF2BP2                       | 0,590945        |
| <b>Transcription factor 12</b>   | <b>TCF12</b>                  | <b>0,591475</b> |
| Vacuolar protein sorting-associated protein 13A  | VPS13A                        | 0,591655        |
| Helicase SKI2W   | SKIV2L;SKI2W                  | 0,5917          |
| <b>Homeobox protein Nkx-3.1</b>  | <b>NKX3-1</b>                 | <b>0,59245</b>  |
| G protein-coupled receptor kinase 6  | GRK6                          | 0,59412         |
| Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha  | GNAQ                          | 0,59426         |
| Aconitate hydratase;Cytoplasmic aconitate hydratase  | HEL60;ACO1;IRP1               | 0,59481         |
| Engulfment and cell motility protein 2   | ELMO2                         | 0,59567         |
| E3 ubiquitin-protein ligase RNF168   | RNF168                        | 0,59595         |
| Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1  | FAM120A                       | 0,597045        |
| RNA-binding protein 26   | RBM26                         | 0,59955         |
| PAX-interacting protein 1  | PAXIP1                        | 0,599805        |
| Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47   | USP47                         | 0,600765        |
| Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15   | USP15                         | 0,601245        |
| Zinc finger CCCH domain-containing protein 4   | ZC3H4                         | 0,60155         |
| Syntenin-1   | SDCBP                         | 0,60174         |
| Protein strawberry notch homolog 1   | SBNO1                         | 0,601875        |
| F-box only protein 7   | FBXO7;DKFZp686B08113          | 0,60192         |
| Protein SCAF11   | SCAF11;SFRS21P                | 0,602555        |
| MKL/myocardin-like protein 2   | MKL2                          | 0,602625        |
| Inactive tyrosine-protein kinase 7   | PTK7;DKFZp434L0319            | 0,603385        |
| RING finger and SPRY domain-containing protein 1   | RSPRY1                        | 0,60344         |
| Protein prune homolog  | PRUNE                         | 0,603595        |
| FYN-binding protein  | FYB                           | 0,604105        |
| Negative elongation factor E   | NELFE;RDBP;NELF-E             | 0,60437         |
| Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src   | SRC                           | 0,606475        |
| DnaJ homolog subfamily C member 5  | DNAJC5;DKFZp761N1221;FLJ00095 | 0,606685        |
| Integrin beta-1  | ITGB1                         | 0,606855        |
| Intersectin-2  | ITSN2                         | 0,608605        |
| Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4  | MAP4K4                        | 0,608785        |



| Protein names   | Gene names                         | H/L Ratio      |
|---|------------------------------------|----------------|
| Intercellular adhesion molecule 3   | ICAM3;hCG_2033729                  | 0,61071        |
| Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2   | STAU2;STAU2 variant protein        | 0,611255       |
| Tetrapeptide repeat protein 27  | TTC27                              | 0,611985       |
| Ras-related protein Rab-23  | RAB23                              | 0,612075       |
| Hematological and neurological expressed 1 protein;Hematological and neurological expressed 1 protein, N-terminally processed   | HN1                                | 0,61398        |
| Poly(A) polymerase alpha  | PAPOLA                             | 0,61462        |
| AP-3 complex subunit delta-1  | AP3D1                              | 0,61465        |
| Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24  | USP24                              | 0,615145       |
| A-kinase anchor protein 2   | hCG_28765;AKAP2                    | 0,615995       |
| Integrin alpha-L  | ITGAL                              | 0,617175       |
| Coilin  | COIL                               | 0,61735        |
| Zinc finger E-box-binding homeobox 1  | ZEB1                               | 0,617495       |
| <b>Myocyte-specific enhancer factor 2D</b>  | <b>MEF2D variant protein;MEF2D</b> | <b>0,61758</b> |
| Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4   | EIF2AK4                            | 0,61789        |
| F-box/LRR-repeat protein 8  | FBXL8                              | 0,618815       |
| Myotubularin-related protein 1  | MTMR1                              | 0,618955       |
| B-cell CLL/lymphoma 9 protein   | BCL9                               | 0,619171       |
| Zinc finger BED domain-containing protein 1   | hCG_1981838;ZBED1                  | 0,619715       |
| Proteasome maturation protein   | POMP                               | 0,62158        |
| Fatty acid synthase;[Acyl-carrier-protein] S-acetyltransferase;[Acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase;3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase;3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase;3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase;Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase;Oleoyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase | FASN                               | 0,621665       |
| Male-specific lethal 1 homolog  | MSL1;hCG_31740                     | 0,622265       |
| Ras-related protein Rab-4A  | RAB4A                              | 0,62315        |
| RNA-binding protein 27  | RBM27;POU4F3                       | 0,6238         |
| Myotubularin-related protein 5  | SBF1;DKFZp761D0422                 | 0,62391        |
| 60S ribosomal protein L34   | RPL34                              | 0,62444        |
| Pumilio homolog 1   | PUM1                               | 0,626135       |
| Protein SDE2 homolog  | SDE2                               | 0,6263         |
| Very low-density lipoprotein receptor   | VLDLR                              | 0,626335       |
| Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1   | TERF2IP                            | 0,62637        |
| WD repeat-containing protein 37   | WDR37                              | 0,6268         |
| Niban-like protein 1  | C9orf88;FAM129B                    | 0,62874        |
| Pre-mRNA-processing factor 17   | CDC40                              | 0,630325       |
| <b>LIM domain-binding protein 1</b>   | <b>LDB1</b>                        | <b>0,63037</b> |
| Mth938 domain-containing protein  | AAMDC                              | 0,630445       |
| Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2   | SLC9A3R2                           | 0,63111        |
| Nucleolar protein 8   | NOL8;DKFZp686P12242                | 0,63139        |
| Nuclear receptor corepressor 1  | NCOR1                              | 0,6316         |
| Protein-tyrosine kinase 2-beta  | PTK2B                              | 0,631775       |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27   | DDX27                              | 0,63364        |
| CLIP-associating protein 1  | CLASP1                             | 0,634125       |
| Death domain-associated protein 6   | DAXX                               | 0,63432        |
| Replication initiator 1   | REPIN1                             | 0,63475        |
| 1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase   | PIKFYVE;HEL37                      | 0,63557        |
| Nischarin   | NISCH                              | 0,635575       |
| Neurofibromin;Neurofibromin truncated   | NF1                                | 0,635695       |
| Ran-binding protein 9   | RANBP9                             | 0,63603        |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20   | DDX20                              | 0,636345       |
| <b>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</b>  | <b>tal-1;TAL1;SCL</b>              | <b>0,63754</b> |
| Nicotinate phosphoribosyltransferase  | NAPRT                              | 0,637675       |
| Pre-mRNA-splicing factor CWC25 homolog  | CWC25                              | 0,637875       |
| E3 ubiquitin-protein ligase CBL   | CBL                                | 0,637985       |
| tRNA 2-phosphotransferase 1   | TRPT1                              | 0,639385       |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;FK506-binding protein 15  | FKBP15                             | 0,64004        |
| Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2  | NUDT4                              | 0,641005       |
| SLAIN motif-containing protein 2  | hCG_17415;SLAIN2                   | 0,64197        |
| NFATC2-interacting protein  | NFATC2IP                           | 0,64425        |
| Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12  | MED12;TNRC11                       | 0,646005       |
| Abelson tyrosine-protein kinase 2   | ABL2                               | 0,646485       |
| Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO   | FTO                                | 0,647725       |
| RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase   | CTDP1                              | 0,647755       |
| Disco-interacting protein 2 homolog B   | DIP2B                              | 0,64836        |
| E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3  | HECTD3                             | 0,64865        |
| TBC1 domain family member 15  | TBC1D15                            | 0,648915       |
| Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial   | IVD                                | 0,649325       |
| Anion exchange protein;Sodium bicarbonate cotransporter 3   | SLC4A7                             | 0,65124        |
| Interferon regulatory factor 2-binding protein-like   | IRF2BPL                            | 0,65127        |
| MK167 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein   | NIFK                               | 0,6525         |
| DCC-interacting protein 13-alpha  | APPL1                              | 0,653995       |
| Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1  | BAP1                               | 0,65416        |
| Intercellular adhesion molecule 2   | ICAM2                              | 0,65482        |
| Ribonuclease 3  | RNASEN;DROSHA                      | 0,654835       |
| Putative 60S ribosomal protein L39-like 5;60S ribosomal protein L39   | RPL39P5;RPL39                      | 0,65525        |
| Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta   | IKBKKB                             | 0,656525       |
| PR domain zinc finger protein 10  | PRDM10                             | 0,6566         |
| 2-deoxynucleoside 5-phosphate N-hydrolase 1   | DNPH1                              | 0,656835       |
| Carabin   | TBC1D10C                           | 0,65752        |
| Tripartite motif-containing protein 65  | TRIM65                             | 0,65833        |

| Protein names  | Gene names          | H/L Ratio |
|--|---------------------|-----------|
| Pleckstrin homology domain-containing family A member 1  | PLEKHA1             | 0,65969   |
| Shootin-1  | KIAA1598            | 0,659815  |
| Alanine-tRNA ligase, mitochondrial   | AARS2               | 0,660235  |
| ARF GTPase-activating protein GIT2   | GIT2                | 0,660345  |
| Ubiquitin-associated protein 2   | UBAP2;UNQ610        | 0,66076   |
| Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon   | EIF2B5              | 0,661135  |
| ATR-interacting protein  | TREX1;ATRIP         | 0,662325  |
| Leucine-rich repeat-containing protein 16C   | RLTPR               | 0,662585  |
| Protein LYRIC  | MTDH                | 0,662795  |
| SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1  | SMARCA1             | 0,662945  |
| Tubulin epsilon chain  | TUBE1               | 0,663135  |
| Tuberin  | TSC2                | 0,663735  |
| Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial  | ACAD8               | 0,66423   |
| 40S ribosomal protein S27;40S ribosomal protein S27-like   | RPS27L;LOC392748    | 0,664415  |
| Trafficking protein particle complex subunit 9   | TRAPPC9             | 0,666445  |
| NEDD8 ultimate buster 1  | NYREN18;NUB1        | 0,667585  |
| Rootletin  | CROCC               | 0,66798   |
| Calmodulin   | CALM3;CALM2;CALM1   | 0,668435  |
| Transcription factor Dp-2  | TFDP2               | 0,66899   |
| Zinc finger protein 598  | ZNF598              | 0,66962   |
| Mismatch repair endonuclease PMS2  | PMS2                | 0,670915  |
| Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1                           | GBF1                | 0,670985  |
| Phospholipase D3   | PLD3                | 0,67103   |
| Switch-associated protein 70   | SWAP70              | 0,671425  |
| Regulatory factor X-associated protein   | RFXAP               | 0,67364   |
| Transcription factor BTF3;Transcription factor BTF3 homolog 4  | BTF3L4              | 0,67416   |
| N6-adenosine-methyltransferase subunit METTL14   | METTL14             | 0,674775  |
| Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A   | ZBTB7A              | 0,67513   |
| Protein FAM91A1  | FAM91A1             | 0,67521   |
| Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1   | TLK1                | 0,675355  |
| Cyclin-dependent kinase 12   | CDK12               | 0,67544   |
| Calcium-transporting ATPase;Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4                            | ATP2B4;DKFZp686M088 | 0,675805  |
| 5-3 exonuclease 1  | XRN1                | 0,6766    |
| FLYWCH family member 2   | FLYWCH2             | 0,67757   |
| TNF receptor-associated factor 6   | TRAF6               | 0,677745  |
| Amino acid transporter;Neutral amino acid transporter A  | SLC1A4              | 0,67869   |
| Serine/threonine-protein kinase TAO1   | TAOK1               | 0,678835  |
| E3 ubiquitin-protein ligase UBR2   | UBR2                | 0,67953   |
| Transcription initiation factor TFIID subunit 3  | TAF3                | 0,67956   |
| UBX domain-containing protein 6  | UBXN6               | 0,679755  |
| Cyclin-T1  | CCNT1               | 0,68165   |
| Cytochrome P450 2U1  | CYP2U1              | 0,681765  |
| Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15  | PC4;SUB1            | 0,68215   |
| CD48 antigen   | CD48                | 0,68215   |
| Formin-binding protein 1-like  | FBNP1L              | 0,68219   |
| Ras-related protein Rab-5B   | RAB5B               | 0,682255  |
| Ras-related protein Ral-A  | RALA                | 0,682575  |
| Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein 1                                       | GNB1L               | 0,682925  |
| Signal transducer and activator of transcription;Signal transducer and activator of transcription 5A | STAT5A              | 0,68369   |
| Ankyrin repeat and zinc finger domain-containing protein 1   | ANKZF1              | 0,683825  |
| Protein PRRC2C   | PRRC2C              | 0,68417   |
| ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3  | ARFGAP3             | 0,68448   |
| La-related protein 4B  | LARP4B              | 0,68469   |
| Disks large homolog 1  | DLG1                | 0,68538   |
| Tropomyosin alpha-1 chain  | TPM1                | 0,68539   |
| UBX domain-containing protein 7  | UBXN7               | 0,685775  |
| Non-structural maintenance of chromosomes element 4 homolog A  | NSMCE4A             | 0,68621   |
| Microtubule-associated protein 1A;MAP1A heavy chain;MAP1 light chain LC2                             | MAP1A               | 0,686235  |
| GRIP1-associated protein 1   | GRIPAP1             | 0,687445  |
| Lysosome membrane protein 2  | SCARB2              | 0,68754   |
| AP-3 complex subunit beta  |                     | 0,68792   |
| Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1   | COG1                | 0,6909    |
| Protein BRICK1   | BRK1                | 0,69125   |
| DNA-binding protein RFXANK   | RFXANK              | 0,691435  |
| Acyl-coenzyme A oxidase;Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1  | ACOX1               | 0,69158   |
| Selenocysteine lyase   | SCLY                | 0,692335  |
| High mobility group protein 20A  | HMG20A              | 0,692475  |
| Max-binding protein MNT  | MNT                 | 0,69349   |
| DNA primase large subunit  | PRIM2               | 0,694265  |
| Autophagy-related protein 101  | ATG101;C12orf44     | 0,69489   |
| Bifunctional epoxide hydrolase 2;Cytosolic epoxide hydrolase 2;Lipid-phosphate phosphatase           | EPHX2               | 0,69498   |
| Gamma-enolase;Enolase  | ENO2                | 0,695485  |
| Fructose-bisphosphate aldolase;Fructose-bisphosphate aldolase C                                      | ALDOC               | 0,69574   |
| Protein Red  | CSA2;IK             | 0,69595   |
| Probable leucine-tRNA ligase, mitochondrial  | LARS2               | 0,696335  |
| Nucleus accumbens-associated protein 1   | BTBD14B;NACC1       | 0,69636   |
| Annexin  | ANXA6               | 0,696445  |

| Protein names   | Gene names            | H/L Ratio |
|---|-----------------------|-----------|
| UPF0769 protein C21orf59  | C21orf59              | 0,69658   |
| GDNF family receptor alpha-1  | GFRA1                 | 0,696645  |
| Uncharacterized protein KIAA1143  | KIAA1143              | 0,696985  |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60   | DDX60                 | 0,697415  |
| Lysine-specific demethylase 4B  | KDM4B;JMJD2B          | 0,69744   |
| Serine/threonine-protein kinase SMG1  | SMG1                  | 0,69774   |
| RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 3                                | RPUSD3                | 0,698095  |
| 1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase                                    | ADI1                  | 0,69841   |
| Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25                                  | MED25                 | 0,698535  |
| SRSF protein kinase 2;SRSF protein kinase 2 N-terminal;SRSF protein kinase 2 C-terminal | SRPK2                 | 0,698815  |
| E3 ubiquitin-protein ligase TRIM38  | TRIM38;DKFZp686F23130 | 0,69912   |
| DNA repair and recombination protein RAD54-like   | RAD54L                | 0,69918   |
| Lambda-crystallin homolog   | HEL30;CRYL1           | 0,699425  |
| Protein ENL   | MLLT1                 | 0,699605  |
| UPF0769 protein C21orf59  | C21orf59              | 0,69658   |
| GDNF family receptor alpha-1  | GFRA1                 | 0,696645  |
| Uncharacterized protein KIAA1143  | KIAA1143              | 0,696985  |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60   | DDX60                 | 0,697415  |
| Lysine-specific demethylase 4B  | KDM4B;JMJD2B          | 0,69744   |
| Serine/threonine-protein kinase SMG1  | SMG1                  | 0,69774   |
| RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 3                                | RPUSD3                | 0,698095  |
| 1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase                                    | ADI1                  | 0,69841   |
| Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25                                  | MED25                 | 0,698535  |

### Abbildung 9.13. Herunterregulierte Proteine der Massenspektrometrie.

Zusammenfassung aller 324 SILAC-analyasierter Proteine mit einer H/L Ratio unter 0,7. Gezeigt sind die Protein- und Gennamen, sowie der Mittelwert der Duplikate, der sich durch die Analyse der Massenspektrometrie ergab.

## 10 Publikationen und Posterpräsentationen

### 10.1 Publikationen

Kuwardina, Olga N., Stefanie Herkt, **Annekarin Meyer**, Lucas Schneider, Jasmin Yillah, Nicole Kohrs, Halvard Bonig, Erhard Seifried, Carsten Müller-Tidow, and Jörn Lausen. 2017. "Hematopoietic Transcription Factors and Differential Cofactor Binding Regulate *PRKACB* Isoform Expression." *Oncotarget*.

Herkt, Stefanie C., Olga N. Kuwardina, Julia Herglotz, Lucas Schneider, **Annekarin Meyer**, Claudia Pommerenke, Gabriela Salinas-Riester, Erhard Seifried, Halvard Bonig, and Jörn Lausen. 2018. "Protein Arginine Methyltransferase 6 Controls Erythroid Gene Expression and Differentiation of Human CD34+ Progenitor Cells." *Haematologica*.

Steiner, Marlene, Lucas Schneider, Jasmin Yillah, Katharina Gerlach, Olga N. Kuwardina, **Annekarin Meyer**, Alisa Maring, Halvard Bonig, Erhard Seifried, Martin Zörnig, and Jörn Lausen. 2019. "FUSE Binding Protein 1 (FUBP1) Expression Is Upregulated by T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia Protein 1 (TAL1) and Required for Efficient Erythroid Differentiation." *PLoS ONE*.

### 10.2 Posterpräsentationen

**Annekarin Meyer**, Stefanie Herkt, Julia Hahn, Lucas Schneider, Halvard Bönig, Erhard Seifried, Jörn Lausen. "TAL1 and the miR-17-92 cluster form a regulatory loop in T-ALL". 7<sup>th</sup> UCT Science Day, October 7 (2016), Frankfurt am Main.

**Annekarin Meyer**, Stefanie Herkt, Julia Hahn, Lucas Schneider, Halvard Bönig, Erhard Seifried, Jörn Lausen. "TAL1 and the miR-17-92 cluster form a regulatory loop in T-ALL". 8<sup>th</sup> UCT Science Day, October 27 (2017), Frankfurt am Main.

**Annekarin Meyer**, Stefanie Herkt, Julia Hahn, Lucas Schneider, Halvard Bönig, Erhard Seifried, Jörn Lausen. "TAL1 and the miR-17-92 cluster form a regulatory loop in T-ALL". DRK Forschungsseminar (DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen und Nord-Ost), November 16-18 (2017), Nördlingen.

**Annekarin Meyer**, Stefanie Herkt, Julia Hahn, Thomas Öllerich, Halvard Bönig, Erhard Seifried, Jörn Lausen. "TAL1 and the miR-17-92 cluster form a regulatory loop in T-ALL". Cancer Conference, September 25-27 (2018), Frankfurt am Main.

### 10.3 Präsentationen

**Annekarin Meyer**, Stefanie Herkt, Julia Hahn, Thomas Öllerich, Halvard Bönig, Erhard Seifried, Jörn Lausen. "TAL1 and the miR-17-92 cluster form a regulatory loop in T-ALL". DRK Forschungsseminar (DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen und Nord-Ost), November 16-17 (2018), Tübingen.

## 11 Danksagung

Mein allererster Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer, Prof. Dr. Jörn Lausen, für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Er stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zu Seite, hatte auf jede Frage eine Antwort und für jedes Problem eine Lösung parat. Er hat sich stets mit Eifer und Interesse nicht nur für mein Projekt eingesetzt, sondern auch dafür gesorgt, dass ich Kompetenzen erlerne, die mir als Naturwissenschaftlerin neue Türen öffnen. Für diese außergewöhnliche Betreuung und Zusammenarbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein nächster Dank geht an Prof. Dr. Markus Morrison, für die Übernahme des Mitberichters und die Bewertung dieser Arbeit.

Mein allergrößter Dank jedoch geht an meine Freundin und Kollegin, Dr. Stefanie Herkt, die für ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft und Fairness bekannt ist. Sie hat mich eingearbeitet und mich alle Methoden im Labor gelehrt. Sie war stets meine Ansprechpartnerin bei allen Fragen, und waren sie noch so banal. Sie war immer bereit, bei der Vorbereitung von Präsentationen oder anderen Arbeiten völlig uneigennützig zu helfen, auch wenn dies bedeutete, später nach Hause zu kommen, und war stets nur darauf bedacht, für jeden das Beste aus einer Situation zu machen. Sie hat in besonderem Maße dazu beigetragen, dass meine Doktorandenzeit zu einer wunderbaren Phase meines Lebens wurde und ist zudem ein sehr wichtiger Mensch in meinem Leben und eine sehr gute Freundin geworden, die ich nicht mehr missen möchte. Vielen Dank dafür!

Auch der gesamten AG Bönig möchte ich einen besonderen Dank aussprechen für diese inspirierende Zeit am DRK Blutspendedienst in Frankfurt. Insbesondere hervorheben möchte ich hier Elisabeth und Katharina, die beiden strahlenden Engel, die mir wunderbare Freundinnen geworden sind, niemals ihre Hilfe verwehrt haben, wenn ich einmal nicht im Labor sein konnte, und in schwierigen Phasen die Motivation für mich waren, den langen Weg nach Frankfurt tagtäglich auf mich zu nehmen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die immer an mich geglaubt hat, und mich immer ermutigt hat, dass ich alles schaffen kann, was ich mir vornehme. Besonders betonen möchte ich hier meine Mutter, ohne die das ganze niemals möglich gewesen wäre. Sie hat mich unterstützt wo sie nur konnte, mir so viel Arbeit abgenommen wie möglich, ist immer kurzfristig als Pferdepflegerin eingesprungen, wenn es im Labor mal wieder länger gedauert hat und wurde niemals müde zu betonen, wie stolz sie auf mich ist. Mama, ich danke dir von Herzen dafür!

Mein letzter Dank geht an meinen Freund, Christoph. Er war in schwierigen Zeiten mein Anker und hat nicht aufgehört, mich zu ermutigen, mich voranzutreiben und zu motivieren. Er hat stets meine Launen geduldig und verständnisvoll ertragen und in der Phase des Schreibens jegliche Last von mir ferngehalten. Ich danke dir dafür von Herzen.

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Stuttgart, den

---

Unterschrift