

Aus dem Helmholtz Zentrum München

Institut für Molekulare Immunologie

Vorstand: Prof. Dr. D. Schendel

Thema der Dissertation:

**„Untersuchung der Tumorheterogenität in einem spontanen HLADR4 transgenen
Tumormausmodell unter besonderer Beachtung von microRNA
Expressionsmustern“**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Frederik Höck

aus

Augsburg

Jahr 2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Dolores Schendel

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Sandra Hake

Prof. Dr. Heiko Hermeking

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. Silke Raffeggerst

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2015

Eidesstattliche Versicherung

Höck, Michael Frederik

(Name, Vornamen)

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Untersuchung der Tumorerogenität in einem spontanen HLA-DR4 Tumormausmodell unter besonderer Beachtung von microRNA Expressionsmustern“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis	1
Verwendete Abkürzungen	4
1. Einleitung	7
1.1. Über das Mausmodell	7
1.2. MicroRNA (miRNA)	9
1.3. MiRNA in der Hämatopoese	11
1.4. MiRNA in der Tumorgenese und lymphatischen Erkrankungen	12
2. Aufgabenstellung	15
3. Material und Methoden	18
3.1. Geräte und Verbrauchsmaterial	18
3.2. Gewinnung von Organproben	19
3.3. Isolierung von Knochenmark (Filtrationssystem)	20
3.4. Serumgenerierung	21
3.5. Einfrieren der Zellen	22
3.6. Auftauen der Zellen	22
3.7. RNA–Isolierung der Gewebeproben	23
3.8. RNA–Isolierung der Serumproben	24
3.9. cDNA Synthese	26
3.10. Bestimmung der RNA–Konzentration	27
3.11. Analyse des TZR-V β Repertoires	27
3.12. Agarosegelherstellung	29

3.13.	PCR für die Umlagerung der schweren Immunglobulinketten (IgH)	30
3.14.	Aufreinigung der PCR-Produkte	31
3.15.	Luminex microRNA Assay	33
3.16.	Moflow-Sortierung	36
3.17.	FACS Untersuchung des Knochenmarks	38
3.18.	Genexpressionsstudie mit LC480	39
4.	Ergebnisse	40
4.1.	Zucht der DR4 Generation für die Studie	40
4.2.	Langzeituntersuchung der DR4-Mäusen	40
4.3.	Untersuchung der Tumorentität	43
4.3.1.	T-Zell-Rezeptoranalyse	44
4.3.2.	IgH – Analyse	45
4.3.3.	Zusammenfassung T-Zell-Rezeptoranalyse und IgH – Analyse	47
4.4.	Verbesserte Methode der Zellgewinnung aus dem Knochenmark	48
4.5.	Voruntersuchung zur miRNA-Expression	49
4.5.1.	Auswertung miRNA Array (Miltenyi Dienstleistung)	49
4.5.2.	Etablierung der xMAP™ Technologie (Luminex Plattform)	54
4.6.	Untersuchung der Knochenmarksproben	56
4.6.1.	Moflow-Sortierung	57
4.6.2.	FACS-Analyse des Knochenmarks	62
4.6.3.	Messung der miRNA Expression im Knochenmark	65
4.7.	Untersuchung von Serumproben	67
4.8.	Untersuchung von Splenproben	67

4.8.1.	Auswertung Tumorproben der aktuellen DR4-Zucht	68
4.8.2.	Auswertung pathologisch klassifizierter Proben	71
4.9.	Mögliche Zielgenen der miRNA-714	75
4.9.1.	<i>Raver1</i> (Ribonucleoprotein PTB-binding 1)	79
4.9.2.	<i>PDGFB</i> (Platelet derived growth factor B)	81
4.9.3.	<i>LENG8</i> (Leukocyte receptor cluster member 8)	82
5. Diskussion		
5.1	Grundlegende Überlegungen zum Mausmodell	83
5.2.	Langzeitbeobachtung des Mausmodells	84
5.3	Ergebnisse der T-Zell-Rezeptoranalyse und IgH-Analyse	85
5.4.	Untersuchung der miRNA-Expression	86
5.5.	Untersuchung der Zielstrukturen von miRNA-714	91
5.6.	Heterogenität des DR4-Mausmodells	92
6. Zusammenfassung		93
7. Anhang		96
7.1	Literaturverzeichnis	96
7.2.	Verwendete Antikörper	103
7.3.	Verwendete Primer	104
7.4.	Luminex xMap® Reagenzien	105
7.5.	Auswertung der Genexpression in der Übersicht	107
7.6.	Abbildungsverzeichnis	108

Verwendete Abkürzungen

3'untranslantierte Region	3'UTR
Akute myeloische Leukämie	AML
Argonaute 2	Ago2
C57BL6	BL6
CD 117/ckit positiv	ckit ^{pos}
CD30 Hodgkin/Reed-Sternberg -ähnlichen Zellen	HRS - äZ
Cluster of Differentiation	CD
Common Lymphoid Progenitors	CLP
Common Myeloid Progenitors	CMP
Composite Tumor	CT
Diabetes Mellitus Typ 1	DM
Diffuses großzelliges B-Zelllymphom – Histiozyten assoziiert	DLBZL-HA
Ethanol	EtOH
Fluoreszenz aktivierte Zell-Sortierung	FACS
Follikuläres B-Zelllymphom	FBL
Granuloid, Monocytoid Progenitors	GMP
Hämatopoetische Stammzellen	HSZ

Verwendete Abkürzungen	5
Homozygote transgene DR4-H2E Maus	DR4
Humanes Leukozyten Antigen	HLA
Institut für Molekulare Immunologie	IMI
Lineage-negative	Lin ^{neg}
Long primary RNA	pri-miRNA
Long Term Reconstituting HSC	LT – HSC
Lymphoblastoides T-Zelllymphom	LTCL
Marginalzonenlymphom der Milz	SMZL
Messenger RNA	mRNA
miRNA	MicroRNA
Multipotent Progenitors	MPP
Murine MicroRNA	mmu-mir
Myeloid, Erythroid Progenitors	MEP
nt	Nukleotide
Pathologie Neuherberg	PATH
Precursor miRNA	pre-miRNA
Raumtemperatur	RT
Rheumatoide Arthritis	RA

Ribosomale RNA	rRNA
RNA-induced silencing complex	RISC
Schwere Immunglobulinkette	IgH
Standardabweichung	SD
Short Term Reconstituting HSC	ST – HSC
Transgen	Tg
T-Zell-Rezeptor	TZR

1. Einleitung

1.1. Über das Mausmodell

Es war bekannt, dass das humane Leukozyten Antigen DR4 (HLA-DR4) mit Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoide Arthritis (RA), oder der Entwicklung von Diabetes Mellitus Typ 1 (DM) im Zusammenhang steht (Aribi et al. 2004, Zhou Y et al. 2013). Um für diese Krankheiten ein Mausmodell zu erhalten, das nähere Untersuchungen des molekularen Pathomechanismus erlaubt, wurde auf dem genetischen Hintergrund der C57BL6 (BL6) Maus von Prof. Kouicho Ito ein homozygotes, transgenes DR4-H2E Mausmodell (DR4) generiert (Ito et al. 1996). Dieses Mausmodell war Grundlage für die, in dieser Arbeit durchgeführten, Untersuchungen.

Dieses Mausmodell wurde wie folgt generiert; Die kompletten MHC-Klasse-II-Loci IE α und IE β einer Balb/c – Maus (H2-E^d-Haplotyp) wurden als Transgen (Tg) verwendet. Durch gentechnische Verfahren wurde die murine Exon 2 Region durch die humane Sequenz ausgetauscht. Das entstandene Transgen codierte nun ein Protein, das neben der antigenbindenden Domäne HLA-DRB1*0401 und HLA-DRA*0101, die verbleibenden membranproximalen Domänen der H2-Ea- und H2-Eb-Loci beinhaltete. Dieses Transgen-Konstrukt wurde anschließend durch Koinjektion in Blastozysten fünf bis sechs Tage alter embryonalen Zellen einer BL6 Maus transferiert. Danach erfolgte eine Rückkreuzung der transgenen Mäuse mit MHC-Klasse-II-defizienten Mäusen. Die Expression muriner, endogener MHC-Klasse-II-Proteine wurde so verhindert. Das Transgen stand letztendlich unter der Kontrolle des murinen MHC-Klasse II Promoters, an der Oberfläche der Zelle präsentierte sich nur das chimäre MHC – Klasse II Protein. Dabei stammte nun die Peptidbindetasche des MHC II Komplexes vom humanen System und die

membranverankerten Ketten alpha 1 und beta 1 aus der BL6 Maus (Ito et al. 1996, Raffegerst 2007).

Mit dem ursprünglichen Ziel dieses Mausmodell für die Erforschung von Diabetes Mellitus Typ 1 zu verwenden, wurde das Mausmodell im Institut für Molekulare Immunologie (IMI) des Helmholtz Zentrum München aufgenommen. Nach einem Beobachtungszeitraum von neun Monaten wurde die Forschung diesbezüglich jedoch abgebrochen, da es bei einer großen Anzahl an Mäusen zu einer spontanen Tumorentwicklung kam. Durch immunhistologische Untersuchungen, durchgeführt in der Pathologie (PATH) in Neuherberg unter der Leitung von Frau Dr. Leticia Quintanilla-Fend, konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei diesen Tumoren zum größten Teil um Lymphome, maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems, handelte. Der Mausstamm zeigte eine Erkrankungsfrequenz von 69,5 % (91 von 131 untersuchten Mäusen) (Raffegerst 2007, Raffegerst et al. 2009).

Ein breites Spektrum an Tumoren trat hierbei zu Tage. T-Zelllymphome, hier als lymphoblastoide T-Zell-Lymphome (LTCL) bezeichnet, machten einen Anteil von 25,2 % der untersuchten Tumoren aus. B-Zelllymphome, hier als diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBZL) bezeichnet, trugen zu 26,7 % der Tumoren bei. Zu der Gruppe der DLBZL wurden follikuläre B-Zell-Lymphome (FBL), diffuse großzellige B-Zelllymphome–Histiozyten assoziiert (DLBZL-HA) und Marginalzonen-Lymphome der Milz (SMZL) gezählt. Auch konnte das Auftreten multipler Myelome, beim Menschen als Kahler–Krankheit bezeichnet, vorgefunden werden. Bei 3,1 % der klassifizierten Mäuse trat akute myeloische Leukämie (AML) auf. 10 Mäuse (9%) zeigten eine Kombination unterschiedlicher Tumortypen, diese wurden als sogenannte Composite Tumoren (CT) bezeichnet und traten in unterschiedlichen Kombinationen auf: DLBZL-HA + SMZL, LTZL + DLBZL, AML + DLBZL, AML + LTZL (Raffegerst

2007, Raffegerst et al. 2009). Die Einteilung der untersuchten Tumoren in verschiedene Untergruppen erfolgte hierbei nach dem „Bethesda Proposals 2002“ (Kogan et al. 2002).

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine große Bandbreite lymphatischer Tumoren in diesem Mausmodell auftraten. Auch phänotypisch glichen diese Tumoren denen des Menschen. Als Besonderheit konnte bei diesem Mausmodell erstmalig in der Dissertation von S. Raffegerst sogenannte murine CD30-Hodgkin/Reed-Sternberg-ähnlichen Zellen (HRS-äZ) in der Tumormasse nachgewiesen werden. Dies und die Tatsache, dass die Tumorerkrankungen denen des Menschen glichen, hatten weitere, intensive Untersuchungen des Mausmodells zur Folge (Raffegerst 2007, Raffegerst et al. 2009).

1.2. MicroRNA

Hinweise, dass RNA-Teile mit messenger RNA (mRNA) interagieren können, ergaben sich erstmal 1984 in *E. coli* Bakterien (Coleman et al. 1984). Die erste microRNA (miRNA) lin-4 wurde 1993 in *C. elegans* beschrieben. (Lee RC et al. 1993, Wightman et al., 1993). miRNA haben eine Länge von 19 – 23 Nukleotiden (nt) und stellen eine Klasse von nicht kodierenden, hoch konservierten RNAs (engl.: Ribonucleic Acid, deutsch: Ribonukleinsäure) dar, die zur Regulation der Proteinsynthese beitragen und dadurch großen Einfluss auf eine Vielzahl biologischer Prozesse nehmen können (Lagos-Quintana et al. 2001).

In Grundzügen erfolgt die Biogenese in folgenden Teilschritten. Am Anfang steht die Transkription des Primärtranskripts durch RNA Polymerase II oder III. Dieses wird als long primary RNA (pri-miRNA) bezeichnet. (Borchert et al. 2006, Goodfellow et al. 2007, Lee Y 2004). Durch den Multi-Proteinkomplex, bestehend aus RNase III Enzym (Drosha) und das dsRNA-Bindeprotein DGCR8, erfolgt die weitere Prozessierung der pri-miRNA zur 60-80 bp

langen precursor (engl. „Vorläufer“) miRNA (pre-miRNA) im Zellkern. (Gregory et al 2004 , Han et al. 2004, Lee Y et al. 2002).

Die entstandene pre-miRNA wird anschließend durch Exportin-5 in Gegenwart von RAN-GTP in das Zytoplasma exportiert und dort durch RNase III Enzym (Dicer) weiter prozessiert. Der entstandene mature, doppelsträngige miRNA-Komplex wird anschließend entwunden und in den RNA – induced silencing complex (RISC) aufgenommen, wobei der Strang mit den günstigeren thermodynamischen Eigenschaften bevorzugt wird. Wichtigstes Protein des RISC ist Argonaute 2 (Ago 2), eine katalytische Endonuklease. (Gregory et al. 2005, Kim et al. 2004, Liu et al. 2004, Meister et al. 2004, Song et al. 2004, Yi et al. 2003).

Die Genregulierung durch miRNA erfolgt, indem die im RISC Komplex gebundene miRNA an die 6-8 nt große 3' untranslatierte Region (3'UTR) der Ziel-mRNA binden. Falls eine perfekte Übereinstimmung der Basensequenz vorliegt, erfolgt die Degeneration der betreffenden mRNA. Bei unvollständiger Übereinstimmung der Basensequenz wird die Translation der mRNA gehemmt. Dabei kann eine miRNA mehrere mRNAs als Zielstruktur regulieren, oder es besteht die Möglichkeit, dass eine mRNA durch mehrere miRNAs reguliert wird (Baek et al. 2008, Lim et al. 2005, Peter 2010, Sontheimer et al. 2005, Witkos et al. 2011).

Dadurch ergibt sich letzten Endes ein diffiziles regulatorisches Netzwerk und es wird angenommen, dass 60 % des Transkriptoms von Säugetieren unter der unmittelbaren Kontrolle von miRNA stehen (Friedman et al. 2009). So wird auf eine Vielzahl körpereigener Vorgänge Einfluss genommen. Dazu zählt unter anderem die Regulierung der Apoptose, der Proliferation, der Tumorgenese und der Beeinflussung von Autoimmunprozessen (Brennecke et al. 2003, Jianwei et al. 2013, O'Connell et al. 2010, Wang DT et al. 2013). Auch die

Differenzierung muriner Zellen in der Hämatopoese wird von miRNA entscheidend beeinflusst (Chen CZ et al. 2003).

1.3. miRNA in der Hämatopoese

miRNA tragen entscheidend zu Regulierung der Hämatopoese bei (Abb.1). So führt ein Knock-Out von Dicer bei murinen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) zu gravierenden Veränderungen, die letztendlich einen Verlust der normalen Zellfunktion bewirken können. (Bissels et al. 2012, Buza – Vidas et al. 2012, Chen CZ et al. 2003).

Jedoch bestehen bei diesen Studien, vor allem bei Untersuchungen der Subgruppen der murinen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), gewissen Schwierigkeiten. Das liegt mitunter an der geringen Zahl der Zellen, die aus eigener Erfahrung pro Maus gewonnen werden können. Auch sind die technischen Möglichkeiten miRNA aus dem gewonnenen Gewebe zu isolieren und anschließend zu messen im ständigen Wandel. Ebenfalls problematisch ist die Tatsache, dass miRNA, obwohl hoch konserviert, in der humanen und murinen Hämatopoese zum Teil unterschiedlich exprimiert werden, was eine Übertragung der tierexperimentell gewonnenen Daten auf den Menschen einschränkt (Ng et al. 2009, Ramkissoon et al. 2006, Rooij 2011).

Nichtsdestotrotz zeigen Ergebnisse dieser Forschung, dass dadurch wichtige Erkenntnisse der normalen und malignen Hämatopoese gesammelt und dadurch das Verständnis für die komplexen Regulationsmechanismen erheblich erweitert werden kann. So wird beispielsweise miRNA-150 sowohl in B – als auch in T –Zellen exprimiert und ist an der Regulation der B–Zellentwicklung und dessen Funktionalität beteiligt (Kluever et al. 2012, Zhou B et al. 2007). Auch konnte gezeigt werden, dass miRNA-125b das Langzeitüberleben von Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) entscheidend beeinflussen kann (Chaudhuri et al.

2012, Ooi et al. 2010). Da sie an jedem Differenzierungsschritt beteiligt sind nehmen miRNA eine gewichte Rolle als Stellschraube in der normalen Hämatopoese ein. Auch kann eine gestörte Expression dazu führen, dass sich hämatologische Erkrankungen entwickeln können (Alemedehy et al. 2012).

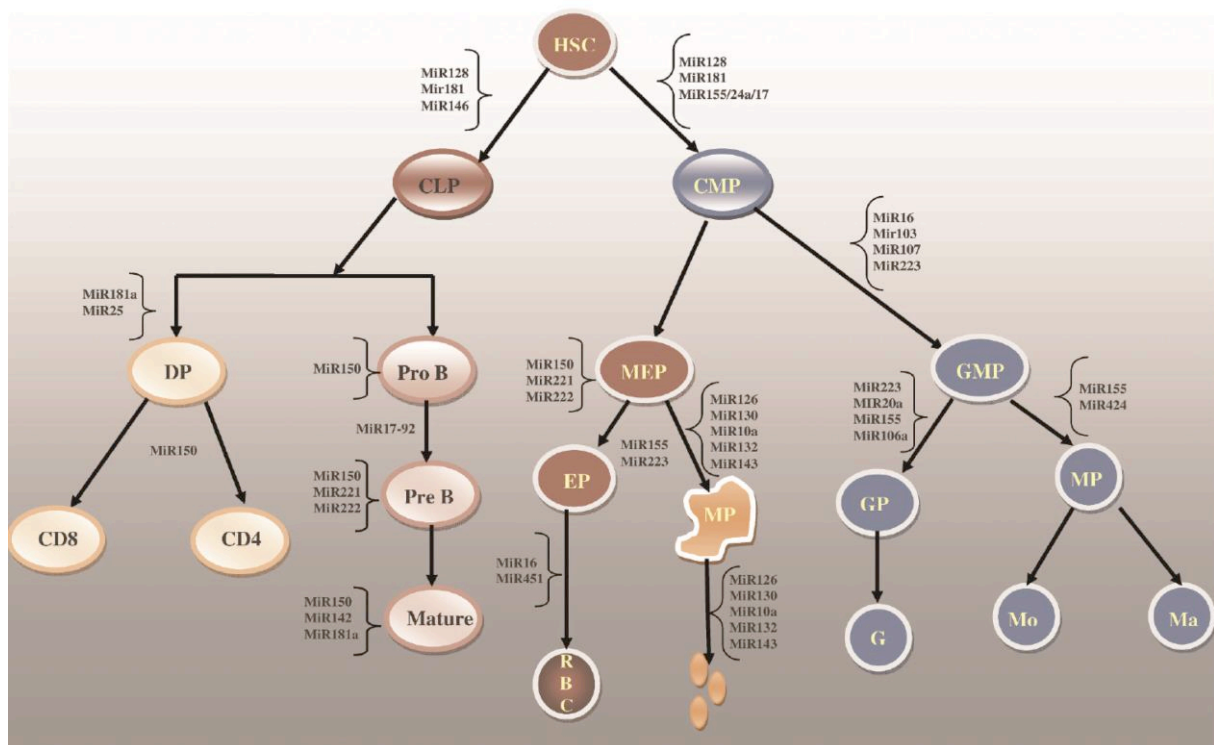


Abb. 1 Übersichtsdarstellung der miRNA in der normalen Hämatopoese (Bhagavathi et al. 2010)

Einfluss verschiedener miRNAs auf die normale Hämatopoese. Abkürzungen: CLP, Common lymphoid progenitor (Gemeinsame lymphoide Vorläufer); CMP, Common myeloid progenitor (Gemeinsame myeloide Vorläufer); EP, Erythroid progenitor (Erythroide Vorläufer); G, Granulocyte (Granulozyten); GMP, Granulocyte macrophage progenitor (Granulozyt Makrophage Vorläufer); GP, Granulocyte progenitor (Granulozyt Vorläufer); HSC, hematopoietic stem cells (Hämatopoetische Stammzellen); MEP, macrophage erythroid progenitor (Makrophage erythroide Vorläufer); MP, monocyte/macrophage progenitor (Monozyt/Makrophage Vorläufer).

1.4. miRNA in der Tumorgenese und lymphatischen Erkrankungen

Ein Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und dem veränderten Expressionsmuster von miRNA in den tumortragenden Zellen wurde erstmals bei der chronisch lymphatischen B-Zellleukämie hergestellt (Calin et al. 2002). Seitdem ist durch eine große Anzahl an Studien nachgewiesen worden, dass Abweichungen im Expressionsmuster von miRNA bei

Tumorerkrankungen auftreten. Dabei können miRNA die Tumorgenese sowohl fördern, als auch einen unterdrückenden Einfluss auf diese nehmen. Die Überexpression von miRNA, wie beispielsweise von miRNA 17-92 beschrieben, trägt positiv zu Entstehung von Tumorerkrankungen bei, da sie den Transkriptionsfaktor E2F1, ein Tumorsuppressorgen, negativ reguliert (O'Donnell et al. 2005).

Die Überexpression einer spezifischen miRNA kann so durch Repression eines Tumorsuppressorgens zur Tumorerkrankung führen (siehe Abb. 2A). Daher kann von einem Onkomir-Effekt gesprochen, die betroffene miRNA als Oncomir, bezeichnet werden. Auch kann eine spezifische miRNA einen Onkogen kontrollieren. Ist die betroffene miRNA unterexprimiert führt dies zur Überexpression des kontrollierten Onkogens (siehe Abb. 2B). (Lotterman et al. 2008)

Ein gestörtes Expressionsmuster von miRNA wurde in beiden histologischen Klassen der malignen Lymphome, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen, nachgewiesen. Besonders miRNA-155 gehört zu den, in beiden Gruppen, am häufigsten als überexprimiert beschriebenen, miRNA.

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von miRNA-155 eine bedeutende Rolle als Onkomir bei der Entstehung von diffusen großzelligen B-Zelllymphomen (Eis et al. 2005), Morbus Hodgkin (Kluiver et al. 2005) und beim Burkitt Lymphom des Kindesalter (Metzler et al. 2004) spielt. Klinische Implikationen ergeben sich dadurch, dass beispielsweise eine Überwachung des Expressionsmusters von miRNA-155 Rückschlüsse erlaubt, ob es zu einem weiteren Fortschreiten, oder zu einer Remission der Tumorerkrankung kommt (He et al. 2013).

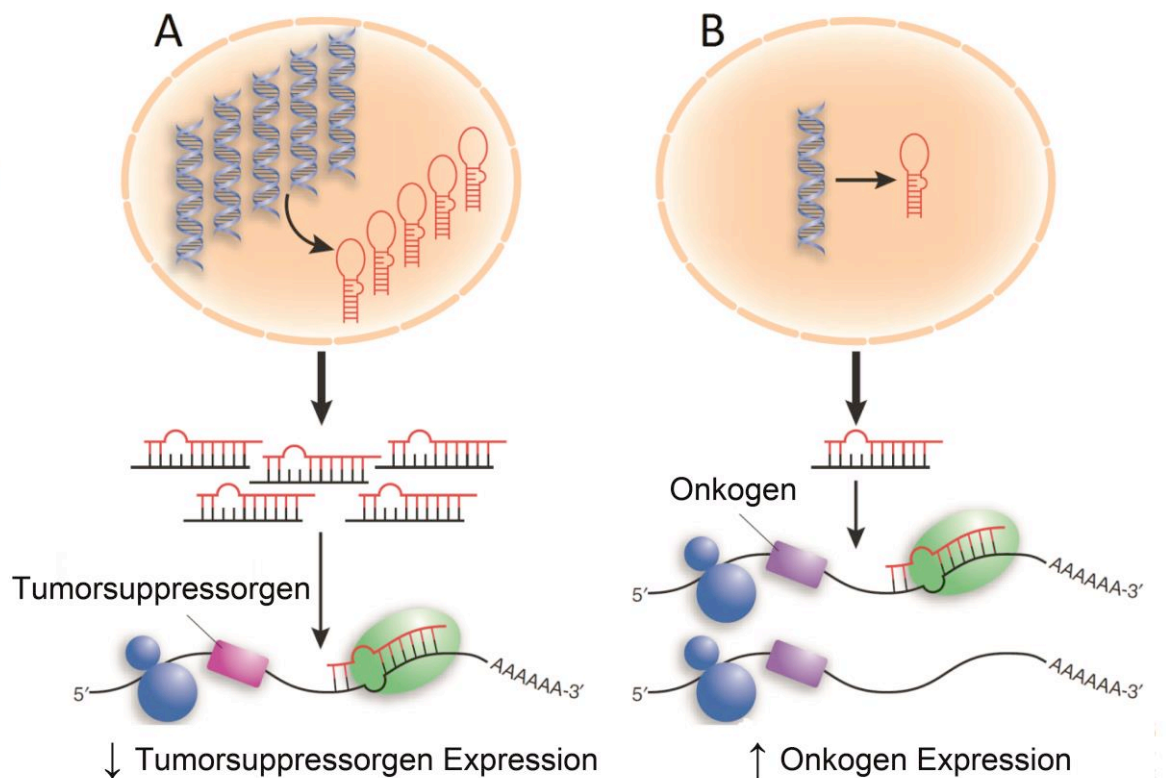


Abb. 2. Unterschiedlicher Effekt von miRNA auf Tumorsuppressor Gene/Onkogene (nach Caldas et al. 2005)

A: Eine Überexpression von miRNA kann, wenn als Zielstruktur ein Tumorsuppressor Gen vorliegt, zur Unterexpression führen B: Unterexpression von miRNA kann zur Überexpression von Onkogenen führen.

Dadurch erhalten Ergebnisse aus der Grundlagenforschung erhebliche Bedeutung in der klinischen Anwendung. Ein verbessertes Verständnis der Wirkungsweise von miRNA, ihrem tumorspezifischen Expressionsprofil und Möglichkeiten der klinischen Überwachung als Biomarker können in Zukunft bei Tumorerkrankungen einen erheblichen Beitrag leisten (Nana-Shikam et al. 2013). Auch können so neue Behandlungskonzepte erarbeitet werden, die neben den „klassischen“ Therapieoptionen eine neue Sparte mit positiven Auswirkungen auf das Gesamtüberleben der betroffenen Patienten eröffnet, wie beispielsweise in der Nanopartikel-basierten Therapie. Hierdurch können überexprimierte miRNA inhibiert werden und so einer Prognoseverbesserung in experimentellen Studien erreicht werden (Babar et al. 2012).

2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nähere Einblicke in die Pathogenese der Tumorentstehung, unter besonderer Berücksichtigung der miRNA Expression, des untersuchten Mausstamms zu erhalten.

Zunächst wird das spontane Auftreten von morphologischen Veränderungen, die auf eine Erkrankung der betroffenen Tiere hinweisen, abgewartet. Die betroffenen Tiere werden einer Sectio zugeführt, um die tumortypischen Veränderungen nachzuweisen. Es folgt die Entnahme von Gewebeproben und die anschließende Gewinnung von RNA und cDNA, um daran weitere Untersuchungen vorzunehmen. Hierbei ist es zunächst entscheidend eine Methode zu etablieren, um suffiziente Mengen an murinem Knochenmark zu gewinnen. Anschließend erfolgt die Klassifizierung der Tumoren in fünf definierte Untergruppen, um eventuell vorliegende Veränderungen des miRNA-Expressionsmusters in den unterschiedlichen Tumorentitäten nachzuweisen. Um Einblicke in das Expressionsmusters der miRNA im murinen Knochenmark zu erhalten, wird ein miRNA-Assay durch die Firma Miltenyi angefertigt. In der anschließenden Auswertung sollen putative miRNA Kandidaten detektiert werden, die im Vergleich zwischen Tumormaus und gesunder Kontrollmaus auffällig sind. Da die miRNA Expression in einem weiteren Schritt verifiziert werden muss, wird hierfür die xMAP™ Technologie von Luminex etabliert. Anschließend werden die miRNA-Kandidaten im Serum, Splen, dem Gesamtknochenmark und in Untergruppen des murinen Knochenmarks, unter besonderer Berücksichtigung der murinen hämatopoetischen Stammzellen, verifiziert. Um das Knochenmark in verschiedene Untergruppen aufzuteilen wird eine Sortierung mittels Oberflächenmarker durchgeführt. Um einen genauen Einblick in die Frequenzen der unterschiedlichen Vorläuferzellen der Hämatopoese zu bekommen, wird

ein FACS-Protokoll eingeführt und der Vergleich zwischen tumortragenden Mäusen und Kontrollmäusen gezogen. Im nächsten Schritt werden die Zielgene der verifizierten miRNA Kandidaten mittels *in silico* Analyse detektiert und deren Expressionsstärke im Vergleich Tumormaus gegen gesunde Kontrollmaus durch quantitative RT-PCR untersucht.

Nachfolgend die einzelnen Teilaspekte der vorliegenden Arbeit im Überblick:

- Langzeitbeobachtung von 110 Mäusen und Sectio einzelner Mäuse, wenn sich morphologische Anhalte für eine Tumorerkrankung ergeben.
- Etablierung einer Methode zur verbesserten Gewinnung von murinem Knochenmark.
- Einteilung der Tumoren in verschiedene Entitäten durch Untersuchung der Umlagerung der schweren Immunglobulin-Kette und T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Analyse.
- Auswertung eines miRNA-Arrays mit dem Ziel putative miRNA Kandidaten zu detektieren.
- Etablierung der xMAP™ Technologie von Luminex um miRNA Kandidaten zu verifizieren.
- *In silico* Analyse der Zielgene der verifizierten miRNA Kandidaten und Untersuchung der Expressionsstärke im Vergleich Tumormaus gegen Kontrollmaus.
- Sortierung des Knochenmarks, um Untergruppen der Vorläuferzellen zu erhalten
- FACS-Analyse um Frequenzunterschiede der Vorläuferzellen der murinen Hämatopoese zwischen Tumormäusen und Kontrollmäusen zu detektieren

Die einzelnen Teilaspekte dieser Arbeit haben das Ziel, die aberrante miRNA-Expression in den Tumormäusen zu untersuchen und deren Funktion in der Tumorphagenese aufzuklären.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Ambion	RNaseZap
BD	Falcon 15 ml, 50 ml
BD	10 ml Syringe Luer-Lok Tip
BD	Cell Strainer 100 µl Nylon
BD	FACS Flow
BD	LSR II - Durchflusszytometer
Bio RAD	Bio-Plex System – Luminex Messgerät
Biometra	Thermocycler - PCR
Braun	Aesculap Division Surgical Disposal Scalpels
Eppendorf	Zentrifuge 5417 R
Eppendorf	Reference Pipettenset
Eppendorf	Safe-lock tubes 0,5 ml + 1,5 ml
Eppendorf	Thermomixer compact
Eppendorf	PCR – Film
Greiner bio-one	Cellstar 2, 5, 10 und 25 ml - Pipetten
Hanke Sass Wolf	1x100 Norm-Ject – 1ml Spritze
Heidolph	REAX top - Minizentrifuge
Hettrich	Rotanta Zentrifuge
IBS Integra Bioscience	Pipetboy acu - Pipettierhilfe
IBS Integra Bioscience	Vacu safe - Absauger

Invitrogen	Automated Cell Counter - Zellzählmaschine
Invitrogen	Cell Counting Chamber Slides
Membrane Solutions	Freezing Tube, 1,5 ml, Selfstanding, Steril
Milliplex MAG Millipore	Hand-held magnetic separation block
Milliplex MAG Millipore	Steriflip Vakuum-vermitteltes Filtrationssystem
Peqlab	Nanodrop ND - 1000
Neo Lab	Mini Centrifuge Model GMC-060
Nerbe Plus	200 µl Graduated Pipette Tips
Oregon Scientific	Zeitmesser TR 118
Prismaria Easy Grip	Tissue Culture Dip
Roche	Light Cycler 2.0, Light Cycler 480 (96-well format)
Roche	Light Cycler Capillaries (20 µl)
Sanyo	VIP Series -86° - Tiefkühlschrank
StarLab	Tip One 100 / 200 / 1000 µl Bevelled Filter Tip
Terumo	Neolues - Einmalkanülen
Thermo Science	Megafuge 1.0 R
Thermo Scientific	Thermo-Fast, Non-Skirted – PCR Platten

3.2. Gewinnung von Organproben

Die Mäuse wurden mittels CO₂ abgetötet. Die entnommenen Organe wurden nach Sektion zerkleinert und unter Druck durch ein 100 µm Sieb gedrückt. Blutproben wurden dadurch gewonnen, dass mit einer Hohlnadel das Herz der Mäuse kurz nach dem Abtöten punktiert wurde und anschließend Safe-lock Tubes überführt wurde. Die Ober-und

Unterschenkelknochen (Femur & Tibia) wurden im Ganzen entnommen, manuell von Geweberückständen wie Sehnen und Muskeln befreit und im Anschluss weiter aufbereitet.

3.3. Steriflip Vakuum-vermitteltes Filtrationssystem von Millipore

Steriflip:	Millipore
Dispase II:	Sigma
Collagenase Typ CLS:	Biochrom
PBS-Lösung mit 2 % FBS Anteil:	beide Biochrom
Mörtel:	Haldenwanger
Zellsiebe 100 µm:	BD Falcon

Ablauf:

- Enzym-Lösung herstellen und separat auf Eis lagern:

8 mg Dispase II + 1 ml PBS

6 mg Kollagenase + 1 ml PBS
- Knochen des Femur, Tibia, Beckenknochen werden als Probenmaterial verwendet.
Für je 6 Knochen (entspricht einer Maus) 20 ml PBS mit 2 % FBS – Anteil vorbereiten.
Knochen in 20 ml PBS mit 2 % FBS überführen
- Zentrifuge auf 4°C vorkühlen
- Knochen in Mörser überführen und mit sterilem Stampfer zerstoßen
- Überstand der Suspension in 50 ml Falcon überführen
- Falcon mit Filtrationseinheit verbinden, umdrehen und mittels Saugpumpe ein Vakuum herstellen
- Falcon mit gefilterten Zellen abschrauben und Probe auf Eis lagern

- Auf Knochenfragmente in Mörser 50 ml PBS 2% FBS geben
- Überstand abnehmen, in 50 ml Falcon überführen
- Falcon mit Filtrationseinheit verbinden, umdrehen und mittels Saugpumpe ein Vakuum herstellen
- Falcon mit gefilterten Zellen abschrauben und Probe auf Eis lagern
- Knochenfragmente in Falcon überführen
- Vorbereitete Enzymlösung auf Knochenfragmente in Falcon geben
- Bei 37°C für 5 min inkubieren und dabei stets schütteln
- 25 ml PBS zugeben und mind. 10 sec. vortexen
- Falcon mit neuer Filtrationseinheit verbinden, umdrehen und mittels Saugpumpe ein Vakuum herstellen
- Falcon mit gefilterten Zellen abschrauben und Probe auf Eis lagern
- Auf überbleibende Knochenfragmente 25 ml PBS geben, an Filtrationseinheit anschließen, umdrehen und mittels Saugpumpe ein Vakuum herstellen
- Falcon mit gefilterten Zellen abschrauben und Probe auf Eis lagern
- Gesammelte Proben bei 400 g für 5 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand vom Pellet abnehmen und verwerfen
- Proben zusammenführen und mit 40 ml PBS 2% FBS auffüllen
- Zellen über Zellsieb filtern
- Zellen zählen und anschließend weiter verarbeiten

3.4. Serumgenerierung

Safe-lock tubes 1,5 ml:

Eppendorf

- Gewonnenes Blut in Safe-lock Tubes überführen

- Tubes bei 1700 g für 10 min zentrifugieren
- Serum abnehmen und in weiteres Safe-lock Tube überführen
- Safe-lock Tube mit Serum bei 2000 g für 10 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen und in weiteres Safe-lock Tube überführen
- Gewonnene Serumprobe bei -20°C lagern

3.5. Einfrieren der Zellen zur Aufbewahrung

Einfriermedium: FBS (Biochrome) mit 20 % Dimethylsulfoxid – Anteil (Merck)

FBS	Biochrome
Freezing Tube, 1,5 ml, Selfstanding, Steril	Membrane Solutions
Safe-lock tubes 1,5 ml	Eppendorf

- Zellen aus Sektio (bsp. Milz) portioniert in Safe-lock tubes 1,5 ml überführen
- Tubes bei 343 g für 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 500 µl FBS pro Tube resuspendieren
- Probe in Freezing Tube überführen
- 500 µl Einfriermedium (FBS mit 20 % Dimethylsulfoxid) zur Probe zugeben
- Lagerung bei -20°C/ -80°C

3.6. Auftauen der Zellen zur weiteren Verwendung

FBS:	Biochrome
Freezing Tube, 1,5 ml, Selfstanding, Steril:	Membrane Solutions
Falcon 15 ml:	BD
Megafuge 1.0 R	Thermo Science

- 10 ml FBS in 15 ml Falcon vorlegen
- Freezing Tubes auf Eis auftauen
- Mittels Pasteurpipette Inhalt auf Freezing Tube in 15 ml Falcon transferieren
- Zentrifugieren bei 652 g für 5 min
- Überstand abschütten, Pellets aufklopfen und in benötigten Puffer (PBS, Medium) resuspendieren

3.7. RNA-Isolierung der Gewebeproben

Tri Reagent :	Sigma
Chloroform : 1-Bromo-3-chloropropane:	Sigma
Lineares Acrylamid:	Ambion 5mg/ml
Isopropanol:	Merck
75 % EtOH:	Merck
HPLC – Wasser:	Merck
Arbeitsfläche desinfizieren RNaseZap:	Ambion

Homogenisation

- 200 µl Tri Reagent pro 1×10^6 Zellen auf das Zellpellet zugeben und durch mehrmaliges Auf/- und Abpipettieren vermischen
- 5 min bei Raumtemperatur (RT) stehenlassen

Phasentrennung:

- 40 µl Chloroform (bzw. 1/5 Vol) zum Homogenisat zugeben (RNA Extraktion)
- Vortexen für 15 sek und anschließend bei RT 10 min stehen lassen
- Anschließend wird das Homogenisat für 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert

- Obere farblose wässrige Phase (RNA) wird entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt

RNA-Präzipitat:

- Optional bei < 500 000 Zellen werden 15 µl Lineares Acrylamid der gewonnen wässrigen Phase zugegeben
- 100 µl Isopropanol (bzw. 1 Volumenanteil) werden zugegeben
- Vortexen und im Anschluss bei 10 min auf Eis stehen lassen
- Zentrifugieren für 12 min, 12000 g und 4°C

Waschen der RNA:

- Überstand abnehmen und verwerfen
- Pellet mit 500 µl 75% Ethanol waschen und mehrmals auf und ab pipettieren
- Zentrifugieren für 8 min und 12000g bei 4°C

Lösen der RNA:

- Überstand wird abgenommen, verworfen und das überbleibende Pellet für 5 min an der Luft getrocknet
- Dem Pellet wird 20 - 40 µl HPLC – H₂O zugegeben und mehrmals auf/- und abpipettiert
- Für 10 min bei 55°C inkubieren zum Auflösen der Sekundärstruktur
- Anschließend wird die Konzentration bestimmt und die RNA bei -20°C gelagert.

3.8. RNA Isolierung der Serumproben

TrizolLS Reagent: Ambion

Chloroform : 1-Bromo-3-chloropropane: Sigma

Lineares Acrylamid: Ambion 5mg/ml

Safe-Lock Tubes 1,5 ml:	Eppendorf
Isopropanol:	Merck
75 % EtOH:	Merck
HPLC – Wasser:	Merk
Arbeitsfläche desinfizieren RNaseZap:	Ambion

Homogenisierung der Proben:

- 0,75 mL TRIzol LS Reagent pro 0,25 mL Probenvolumen zugeben und mehrmals auf/- und pipettieren

Phasentrennung:

- Proben für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
- 0,2 mL Chloroform pro 0,75 ml verwendetem Trizol LS zugeben
- 15 Sekunden per Hand stark schütteln
- Proben für 10 min bei RT inkubieren
- Zentrifugieren bei 12000 g für 15 min und 4°C
- Oberste Phase abnehmen und in neues Tube überführen

RNA Präzipitation

- Falls $< 10^6$ Zellen initial vorliegen kann optional 5-10 µl Lineares Acrylamid zugeben werden
- 0,5 ml 100% Isopropanol pro 0,75 ml Trizol LS zugeben
- Proben für 10 min bei RT inkubieren
- Zentrifugieren bei 12000 g für 10 min und 4°C

RNA Aufreinigung und Resuspension

- 1 ml 75 % Ethanol pro 0,75 ml Trizol zugeben und 10 sek vortexen

- Zentrifugieren bei 7500 g für 5 min und 4°C, anschließend den Überstand vom Pellet abnehmen
- Gewonnene Pellets für 5-10 min bei offenen Deckel stehen lassen
- Pellet in 25 µl RNase HPLC – H₂O resuspendieren und mehrmals auf/- und abpipettieren
- Für 10 min bei 55-60°C inkubieren
- Proben bei -20°C lagern

3.9. AffinityScript QPCR cDNA Synthese Kit, Agilent Technologies

2 x cDNA Synthese Master Mix:	Agilent
Oligo (dT) Primer 15 µg:	Agilent
AffinityScript RT/ RNase Enzyme Mixture 50 µl	Agilent
Thermocycler:	Biometra
Safe-Lock Tube 0,5 ml:	Eppendorf

Endkonzentration (1x)	Ansatz
Template RNA	1 µg
Mastermix	10 µl
Oligo dT	2 µl
Affinity Script (RT)	1 µl

Das AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit der Firma Agilent Technologies wurde stets zur Umschreibung von RNA in cDNA verwendet. Das Endvolumen betrug 20 µl, welches je nach RNA-Konzentration mit Wasser aufgefüllt wurde.

cDNA-Synthese Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
Annealing	25°C	5 min
Reverse Transkription	42°C	15 min
Denaturierung	96°C	5 min
Kühlen	14°C	Pause
Dauer: 26 min		

Anschließend wird die cDNA bei -20°C gelagert.

3.10. Bestimmung der RNA – Konzentration

Um die Konzentration der RNA nach Isolierung zu quantifizieren, wurde mittels des Spektralphotometer (Nanodrop ND – 1000) die optische Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Um die Reinheit des Produkts zu bestimmen, wurde das Verhältnis OD 260 nm / OD 280 nm gebildet. Dieses Verhältnis beträgt idealerweise > 2.0. War das Verhältnis < 2.0, so ließ dies auf Verunreinigungen durch Fremdsubstanzen (u.a. Phenol, Proteine) schließen (Mühlhardt 2002, Raffegerst 2007).

3.11. Analyse des TZR-Vβ Repertoires

Mittels RT-PCR und Sequenzierung wurde das TZR-V β Repertoire untersucht. Der 3' LiGC-Primer (C-Region spezifisch) wurde hierbei von der Arbeitsgruppe Mocikat übernommen. Die verwendeten 21 5'Primer-Sequenz (V-Region spezifisch) wurden aus der Veröffentlichung von Pannetier et al. 1993 entnommen. Das Programm wurde durchgeführt mit dem Thermocycler der Firma Biometra. Die benutzten 5'Primer decken die 18 Familien der variablen (V-) Region der TZR-V β Kette der BL6-Maus ab. Bei folgenden Familien gab es Untergruppen: V β 3, 5 und 8. Als Negativkontrolle diente ein Parallelansatz ohne cDNA.

Endkonzentration	Pro Ansatz	Gesamt
Template cDNA	1 μ l	20 μ l
10 x Puffer (Pharmacia)	2 μ l	44 μ l
dNTPs (Fermentas)	0,4 μ l	8,8 μ l
MgCl ₂ (Roche)	0,4 μ l	8,8 μ l
5' V β x (Pannetier)	1,2 μ l	1,2 μ l
3' LiGC (Mocikat)	1,4 μ l	30,8 μ l
Taq Polymerase (Pharmacia)	0,2 μ l	4,4 μ l
H ₂ O (Merck)	30,5 μ l	294,8 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l	

PCR-Programm für TZR-V β Repertoire:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	94°C	2 Minuten
2. Denaturierung	94°C	15 Sekunden
3. Annealing	60°C	25 Sekunden
4. Elongation	72°C	30 Sekunden
5. Finale Elongation	72°C	5 Minuten
Schritt 2-4: 40 Zyklen		

Die Amplifikate haben eine Länge von 188 bis 265 bp. Diese werden anschließend auf ein 2% Agarosegel aufgetragen.

3.12. Agarosegelherstellung

Biozym DNA Agarose: Biozym

TEA Puffer

Erlenmeyerkolben 250 ml: Schott

PC 440 Waage: Mettler

Ethidiumbromidlösung 1% (10mg/dl): Carl Roth GmbH

2,4 g Agarose werden zu 120 ml TEA-Puffer zugegeben. Dies wird in der Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die feste Agarose vollständig im Puffer gelöst hat. Dazu werden 8 µl

Ethidiumbromidlösung zugegeben. Anschließend wird dies in die gewünschte Form gegossen und bei Raumtemperatur ausgehärtet.

3.13. PCR für die Umlagerung der schweren Immunglobulinketten (IgH)

Die verwendeten Primer wurden von Prof. Ralph Mocikat (RM) zur Verfügung gestellt. Basierend auf der Veröffentlichung von Kutemeier et al. (1992) hat Dr. S. Raffegerst das vorliegende System etabliert.

Endkonzentration (1x)	Ansatz
Template cDNA	1 µL
SYBR Green Mastermix (Roche)	4 µL
5' – Primer (10pmol/ µL) IgH (Mocikat)	1 µL
3' – Primer (10pmol/ µL) IgH (Mocikat)	1 µL
MgCl ₂ (Roche)	0,5 µL
H ₂ O (Roche)	12,5 µL
Gesamtvolumen	20 µL

Als Kontrolle wurde stets das Haushaltsgen 18S ribosomale RNA (rRNA) mitgeführt. Die spezifische Annealing-Temperaturen und die Sequenz der verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

Programm Light Cycler Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
Schritt 1:	95°C	10 min
Schritt 2: Denaturierung	95°C	10 sek
Schritt 3: Annealing	65°C	25 sek
Schritt 4: Extension	72°C	25 sek
Schritt 5: Schmelzkurvenanalyse	95°C	10 sek
Schritt 6:	65°C	25 sek
Schritt 7:	99°C	0 sek
Schritt 2 – 4: 34 Zyklen		

Die Amplifikate wurden anschließend auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese bei 180 Volt für 25 Minuten durchgeführt.

3.14. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel

NTI Bindungspuffer: Macherey- Nagel

NT3 Waschpuffer: Macherey-Nagel

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Säulchen: Macherey-Nagel

Kollektorsäulchen:

Macherey-Nagel

Vorbereitung:

- ausgeschnittene Gelstückchen in 1,5 ml Tube geben
- 200 µl NTI-Puffer pro Probe zugeben
- Gel bei 50°C für 5-10 min auf dem Schüttelinkubator auflösen
- Gesamten Inhalt auf die Säulchen überführen
- Zentrifugation der Säulchen bei 11000 g für 30 sek
- Entstandener Durchfluss verwerfen
- 700 µl NT3 Puffer auf die Säulchen zugeben
- Zentrifugation der Säulchen bei 11000 g für 30 sek
- Entstandener Durchfluss verwerfen
- 700 µl NT3 Puffer auf die Säulchen zugeben
- Zentrifugation der Säulchen bei 11000 g für 30 sek
- Entstandener Durchfluss verwerfen
- Zentrifugation der Säulchen bei 11000 g für 1 min
- Säulchen in Tube überführen
- Mind. 15-30 µl H₂O auf Säulchen zugeben
- > 1min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zentrifugation bei 11.000 g für 1min und Durchfluss auffangen, hierin befindet sich der extrahierte Anteil

Dem extrahierten Anteil wurde der jeweilige 5'Primer IgH (RM) beigemischt und der Ansatz wird zum Sequenzieren zur Firma Eurofins MWG versandt.

3.15. Luminex microRNA Assay

Instrumente:

PCR Cycler:	ThermoCycler
Luminex Instrument:	Bio Plex System
96 well PCR Platte ohne Rahmen AB-0600:	ThermoFisher
8 well flat cap strips AB-0783:	ThermoFisher
1.5 ml Reaktionsgefäß:	Eppendorf
Pipetten Spitzen:	Tip One
Vortex Mixer:	neo Lab
Magnetische Separationsplatte:	Dynal MPC 96S Product 120-27
Plattenschüttler:	IKA Schüttler MTS 4

Benötigte Reagenzien:

Stocklösung SAPE (Streptavidin Phycoerythrin Konjugat) 1 mg/ml Stock

Chimäre Proben

MegPlex Tag magnetic beads

Stocklösung RNase One (Promega)

Hybridisationspuffer (pH 7,7, 10 mM Tris, 200 mM Sodium Acetate, 5 mM EDTA und 0,05 % Tween 20)

Programm für PCR-cycler:

Schritt	Temperatur	Zeit
Schritt 1:	90°C	3 min
Schritt 2:	80°C	6 min
Schritt 3:	80°C - 60°C	Temperatur alle 6 min um 1 °C senken
Schritt 4:	37°C	Manipulation durch Benutzer
Schritt 5:	37°C	30 min
Schritt 6:	30°C	Manipulation durch Benutzer
Schritt 7:	30°C	30 min
Dauer: ca. 2 h		

Chimärer Probenmix:

Jede chimäre Probe wird auf 100 µM mit TE Puffer aufgefüllt. Die Proben können als Konzentrat aliquotiert und eingefroren werden. Um einen äquimolaren Mix für jede Probe herzustellen, muss das benötigte Gesamtvolumen berechnet werden (1,25 µl je Probe) und dann das Volumen errechnet werden, um dann eine 1:100 Verdünnung jeder Probe herzustellen.

Probe:

250 – 500 ng RNA in 2,5 µl Volumen

Protokoll:

Gesamtzeit ca. 3,45 h Vorbereitung, exklusive Messung am Gerät

- Mastermix in nuclease-freien PCR Strips herstellen. Reagenzien in angegebener Reihenfolge zugeben (multiplizieren mit Anzahl der Proben, zuzüglich eines Pipettierfehlers von 20 %):
 - a. Hybridisationspuffer 17.25 µl
 - b. Chimärer Probenmix 1.25 µl *10 nM je Probe
 - c. Totalvolumen 18.50 µl
- Totalvolumen mit gewünschter Anzahl der Proben multiplizieren. Dabei wird ein Pipettierverlust von ca. 20 % miteinberechnet
- 18,5 µl des Mastermixes in jedes Well pipettieren
- 2,5 µl RNA Probe in jedes Well pipettieren
- PCR Platte verschließen und für 5 sek vortexen
- Kurz zentrifugieren (1-2 sek ausreichend)
- PCR Platte in PCR-Cycler stellen und oben beschriebene Programm starten
- PCR Platte beim 37 °C aus PCR-Cycler nehmen, 4 µl des Bead Mix zu jeder Well zugeben, auf/- und abpipettieren, PCR Platte verschließen für 10-15 sek vortexen und 1-2 sek zentrifugieren
- Mit dem PCR Programm fortfahren (37°C, 30 min)
- Enzymverdau 5 min vor Anwendung vorbereiten: 1:500 Verdünnung der Stocklösung des Enzyms herstellen. Der Hybridisierungspuffer dient als Verdünnungsmittel. 5 min inkubieren. Beim 30 °C anhalten und in jedes Well 2,5 µl der Lösung zugeben. Die Platte verbleibt dabei im PCR-Gerät

- Auf/- und abpipettieren, 10-15 sek. vortexen und 1-2 sek zentrifugieren.
- Platte in PCR-Cycler zurückstellen und Programm fortführen (30°C für 30 Min)
- 5 min vor Ende des 30°C Schritts eine 1:500 Verdünnung der Stocklösung (SAPE) herstellen. Kalkulation: 75 µl pro Well + 20 % Überstand.
- Beispiel: bei 10 Proben: 12 x 75 µl SAPE herstellen
- Vor Zugabe von SAPE Überstand folgendermaßen abnehmen:
Platte für 2 min auf magnetischen Separator stellen
- Mit Multipipette Überstand abnehmen, ohne das Pellet aufzuwirbeln
- 200 µl Waschpuffer je Well zugeben, min. 3-4 x auf/- und abpipettieren
- Platte für 2 min auf magnetischen Separator stellen
- Mit Multipipette Überstand abnehmen, ohne das Pellet aufzuwirbeln
- Vorgang zweimal wiederholen
- 75 µl SAPE-Verdünnung auf jedes Pellet geben, verschließen und vortexen.
- Platte auf Plattenschüttler platzieren und für 30 min bei RT vortexen.
- Platte für 2 min auf magnetischen Separator stellen.
- 2 x waschen (siehe oben)
- Platte für 2 min auf magnetischen Separator stellen
- 100 µl Waschpuffer zugeben, auf/- und min. 3-4 x abpipettieren
- Platte in Luminex Instrument zu Analyse geben

3.16. Moflow Sortierung

HBSS – Puffer (Biochrome)

Rattenserum (eigene Herstellung, siehe Serumgewinnung)

Siehe Antikörperliste im Anhang

- Ausgangsmaterial bei -80 °C eingefroren
- Auftauen der Zellen nach gegebenen Schemata (siehe 3.6)
- Zählen der Zellen mittels Invitrogen „Countess“ Zellzähler
- Je 1×10^6 Zellen in 50 ml BD Falcon überführen
- Bei 650 g für 5 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen ohne das Pellet aufzuwirbeln
- Alle Pellets in 500 µl HBSS aufnehmen, filtrieren und Rattenserum (25 µl) zugeben
- Für 5 min inkubieren
- Antikörper zugeben:
 - CD117–APC: 4 µl je Probe
 - Lin Cocktail: 4 µl je Probe Verdünnung 1/25
- 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Sekundärantikörper SAV – PE – Cy 7 zugeben, 4 µl je Probe
- Vortexen und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 5 ml HBSS-Puffer zugeben
- Bei 650 g für 5 min zentrifugieren, Überstand abnehmen und Pellet in 1 ml resuspendieren
- Anschließend Sortierung im Moflow Gerät (siehe Gatingstrategie auf S. 64)
- Auffangen der Fraktionen in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen
- Bei 343 g für 5 min zentrifugieren, Überstand abnehmen, und in 500 µl Trizol aufnehmen
- Proben bei -20°C einfrieren (Trizol Isolation Punkt 3.7)

3.17. FACS Untersuchung des Knochenmarks

FACS – Puffer (HBSS + 2% FBS + 0,1 % NaAzid) :	Biochrome
Rattenserum	(eigene Herstellung)
Propidiumiodid:	ICN
Antikörper (siehe Anhang)	

- Gewünschte Zellzahl bei 650 g für 5 min zentrifugieren und anschließend Überstand abnehmen
- Pellet in 200 µL FACS – Puffer aufnehmen, 2% Ratten-Serum zugeben (je 4µL pro 200 µL) und 5 min inkubieren
- Zellen bei 650 g für 5 min zentrifugieren und anschließend Überstand abnehmen
- Pellet in 50 µL FACS – Puffer aufnehmen
- Antikörpermix in 50 µL FACS – Puffer vorlegen, anschließend mit den zu untersuchenden Zellen vereinigen und für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubieren
- Sekundärantikörper zugeben und für 15-20 min auf Eis im Dunkeln inkubieren
- 1000 µL FACS Puffer zugeben, bei 650 g für 5 min zentrifugieren und anschließend Überstand abnehmen
- 1000 µL FACS Puffer mit 10 µL Propidiumjodid (10mg/ml) auf Pellet zugeben, für 5 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- Bei 650 g für 5 min zentrifugieren und anschließend Überstand abnehmen
- Anschließend Pellet in 100 µL FACS Puffer aufnehmen, Proben auf Eis stellen und analysieren

Die Analyse fand mit dem FACS – LSRII des Instituts für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrum München statt. Die Daten wurden anschließend mit der FloJo – Software Version 8.8.6 ausgewertet.

3.18. LC-PCR : Protokoll für LightCycler® 480 SYBR Green I Master von Roche

Wasser (Roche)

SYBR Green Mastermix (Roche)

cDNA (siehe Punkt 3.9)

Primer (3' und 5', 10 pmol/μl, siehe Anhang)

Mix Probe:

	Ansatz
Wasser (Roche)	5 μl
sense Primer (10 pmol/μl)	2 μl
anti-sense Primer (10 pmol/μl)	2 μl
Master Mix (2x con.) (Roche)	10 μl
cDNA	1 μl
Endvolumen	20 μl

Mit Folie versiegeln und Platte zentrifugieren bei 630 g, 2 min. Anschließend wird das PCR-Programm (siehe Punkt 3.19) für den jeweiligen Primer optimiert angewendet.

4. Ergebnisse

4.1. Zucht der DR4 Generation für die Studie

Die Mäuse für die vorliegende Studie wurden durch Verpaarung von homozygoten Elterntieren des DR4-Mausstamms erzeugt. Dies erfolgte im Tierstall des Helmholtz Zentrum München, Hämatologikum. Die Generation ist homozygot, sowohl in Bezug auf den murinen MHC – Klasse II Locus, als auch auf das Transgen. Da Geschwistertiere verpaart wurden, war keine Änderung dieser Merkmale zu erwarten.

4.2. Langzeituntersuchung der DR4-Mäuse

Insgesamt gingen 110 Mäuse aus dieser Zucht hervor. 8 Mäuse starben in der Nacht oder am Wochenende, so dass deren genaue Todesursache nicht geklärt werden konnte. Somit wurden 102 Mäuse in dieser Studie berücksichtigt. Als Kontrolle wurden zunächst 10 makroskopisch gesunde DR4-Mäuse abgetötet. Diese waren im Durchschnitt 131 Tage alt und zeigten bei Sectio keine pathologischen Auffälligkeiten. Zu den pathologischen Auffälligkeiten zählen eine Umfangszunahme des Abdomens, bedingt durch eine Splenomegalie, ein Thymom, eine Hepatomegalie, oder auffällig große inguinale und mesenteriale Lymphknoten. Auch zeigten diese Mäuse einen verminderten Habitus, reduzierte Aktivität und eine eingeschränkte Atmung. Von 92 Tieren blieben 28 während des gesamten Untersuchungszeitraums erkrankungsfrei (siehe Abb. 3). Bei den verbleibenden 64 Tieren wurde eine Sectio durchgeführt da sie, die für diesen Mausstamm typische Erscheinungsbilder einer Erkrankung, aufwiesen. Bei sieben der obduzierten Mäuse trat als vermutliche Todesursache eine Obstruktion im gastrointestinalen System, bevorzugt im Caecum, auf. Diese Mäuse wurden als nicht tumortragend klassifiziert. So konzentrierte sich

die Studie letztendlich auf die 85 Tiere, bei denen entweder eine Tumorerkrankung auftrat, oder die den Untersuchungszeitraum erkrankungsfrei überlebten. 57 Mäusen (29 weibliche Tiere und 28 männliche Tiere) zeigten die oben beschriebenen tumortypischen Veränderungen, so dass diese im weiteren Verlauf der Studie genauer untersucht wurden.

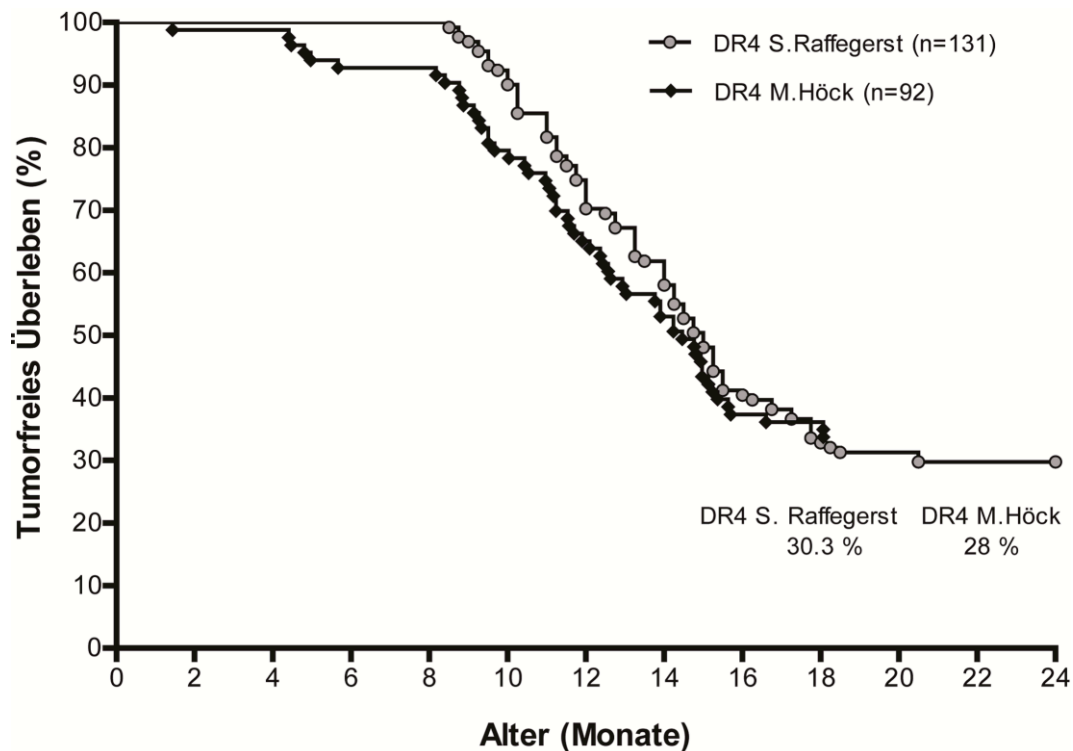


Abb. 3 Vergleich Überlebenszeiten Zucht S. Raffegerst und M.Höck
 Vergleich des erkrankungsfreien Überlebens zwischen der Studie, durchgeführt von S.Raffegerst und M. Höck. Ausgeschlossen wurden 10, für Kontrollzwecke herangezogenen, DR4 Mäuse. Bei den Untersuchungen durch M.Höck blieben 28 % der Mäuse erkrankungsfrei, bei S. Raffegerst 30.3 %.

Das Durchschnittsgewicht der obduzierten erkrankten männlichen DR4-Mäuse betrug bei Sectio $\emptyset = 26,5$ g (n=28). Weibliche DR4 Mäuse wogen bei Obduktion $\emptyset = 26,1$ g (n=29). Tumorfrie weibliche DR4 Mäuse wogen $19,3$ g (n=27), männliche wogen $25,7$ g (n=35). Die Gewichtsangaben für tumorfreie Mäuse stammen sowohl aus der vorliegenden Zucht, als auch von Daten, die Dr. S. Raffegerst in der vorangehenden Studie verzeichnet hat.

Im Vergleich zu früheren Untersuchungen durch Dr. S. Raffegerst (siehe Abb. 3), durchgeführt in einem Zeitraum zwischen 2002 und 2004 (Raffegerst, 2007), war die Erkrankungsfrequenz der Tiere vergleichbar (69,7 % zu 72 %).

Bei Betrachtung der 85 Tiere (weiblich $n = 45$, männlich $n = 40$), die im Beobachtungszeitraum von 550 Tagen entweder eine Tumorerkrankung vorzuweisen hatten, oder während dieser Zeit erkrankungsfrei blieben, fiel auf, dass bei weiblichen Tieren die Erkrankung früher augenscheinlich wurde ($\emptyset$ Überlebenszeit 412 Tage), als bei männlichen Tieren ($\emptyset$ Überlebenszeit 438,5 Tage). Geschlechtsübergreifend betrug die durchschnittliche Überlebenszeit 434 Tage (Abb. 4).

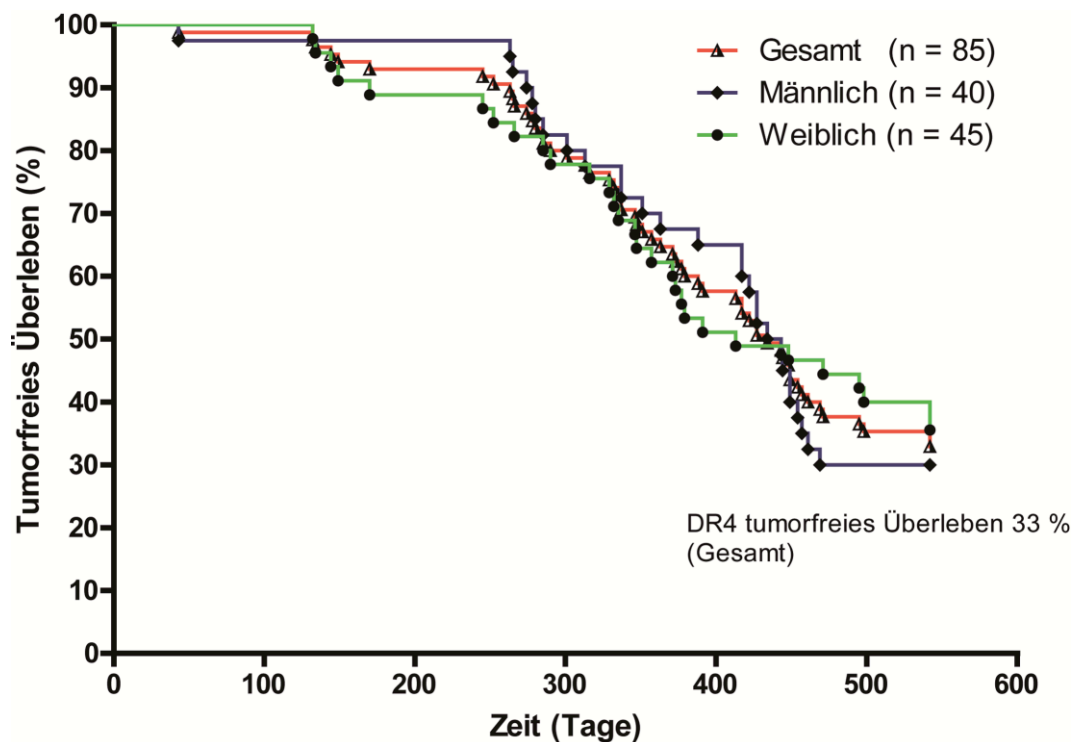


Abb. 4. Kaplan – Meier Überlebenskurve DR4 Mäuse in Langzeitbeobachtung

Von 40 untersuchten männlichen Mäusen erkrankten 28 Tiere (70 %), 12 (30 %) blieben erkrankungsfrei. Bei den 45 untersuchten weiblichen Tieren blieben 16 Tiere (36%) erkrankungsfrei, 29 (64 %) zeigten makroskopische Anzeichen einer Tumorerkrankung.

Es zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Erkrankungshäufigkeit zwischen männlichen und weiblichen Tieren (Abb. 4), so dass für die vorliegende Studie die Geschlechtszugehörigkeit, unter Berücksichtigung bereits gewonnener Erkenntnisse durch Dr. S. Raffegerst, als irrelevant betrachtet wurde.

4.3. Untersuchung der Tumorentität

Aus vorausgehenden Untersuchungen von Dr. S. Raffegerst war bekannt, dass die DR4-Zuchtmäuse mit hoher Frequenz spontan an Lymphomen erkrankten. Um zu klären, ob es sich dabei um B-Zell-Lymphome, T-Zell-Lymphome, oder sogenannte Composite Tumoren handelte, wurde die RNA aus der Milz erkrankter Mäuse isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und anschließend eine T-Zell-Rezeptoranalyse (TZR) der V β -Ketten und die Analyse der Umlagerung der schweren Immunglobulin-Ketten (IgH) durchgeführt.

Der zugrundeliegende Gedanke der hier durchgeführten Untersuchung war, dass eine Maus mit monoklonalem T-Zelltumor einen dominanten T-Zell-Rezeptor auf RNA Ebene bilden sollte. Bleib die IgH-Analyse gleichzeitig ohne Ergebnis, so wurde die Erkrankung dieser Maus als monoklonaler T-Zelltumor klassifiziert. Auch war als Ergebnis bei der T-Zell-Rezeptoranalyse ein bi/- bzw. oligoklonaler Tumor möglich. Zeigte sich umgekehrt in der IgH-Analyse ein produktives Ergebnis bei gleichzeitig unproduktiver TZR, so wurde der Tumor der betroffenen Maus als monoklonaler B-Zelltumor klassifiziert. Waren sowohl die Analyse der Umlagerung der IgH, als auch die TZR produktiv, so war das Vorliegen eines Composite Tumors wahrscheinlich, der Anteile eines B-Zelltumors und eines T-Zelltumors enthielt. Blieben beide verwendete Methoden ohne Erfolg, so wurde der Tumor als nicht klassifizierbar eingestuft.

Mögliche Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung waren also:

- Monoklonaler B-Zelltumor
- Monoklonaler T-Zelltumor
- Composite Tumor
- Polyklonaler T-Zelltumor
- Kein detektierbares Ergebnis

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sind im Folgenden zusammengefasst.

4.3.1. T-Zell-Rezeptoranalyse

Hier wurde das bereits von Dr. S. Raffegerst etablierte PCR-System der T-Zell-Rezeptor-Repertoire Analyse angewandt. 21 verschiedene 5'-Primer wurden ausgewählt, die spezifisch an die jeweilige V-Gen-Familie/Unterfamilie binden. Der 3'-Primer bindet an die konstante Region (C-Region) im 3'-Bereich. Die daraus gewonnenen Amplifikate hatten eine Größe zwischen 188 und 265 bp. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 5), die dominanten Banden der entsprechenden Größe ausgeschnitten und zu Eurofins MWG zur Sequenzierung gesendet. Anschließend wurden die Sequenzen mit der IMGT/V-Quest Datenbank verglichen:

http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=mouseTcR

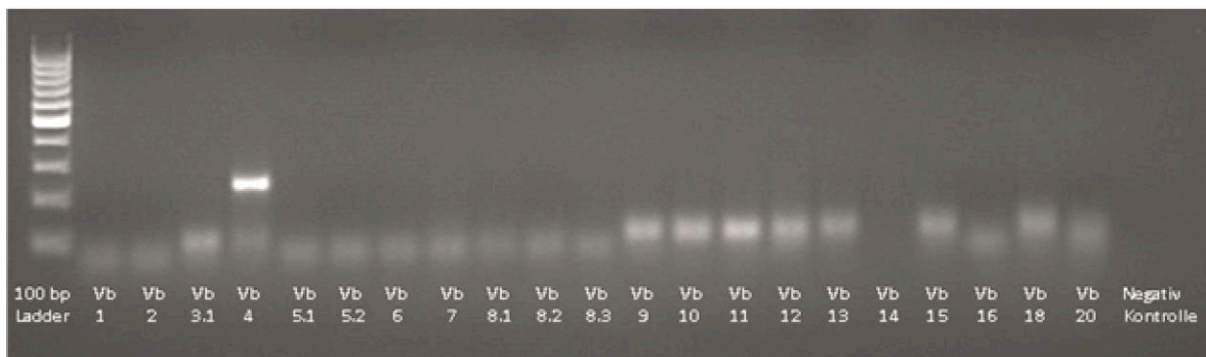


Abb. 5. Gelbild TZR Maus Nr. 26.

H₂O: Negativkontrolle (hier keine cDNA enthalten), Vβ-Ketten 1 – 20, Marker: 100 bp Ladder. Bei diesem Beispiel handelt es sich um einen T-Zell Tumor mit produktiver Vβ4 Kette.

Bei insgesamt 18 Mäusen (45 %) konnte ein produktives Ergebnis detektiert werden. 15 Tumoren (37,5 %) wurden hierbei als monoklonal klassifiziert, zwei Tumoren (5 %) wurden als biklonalen klassifiziert und ein Tumor (2,5 %) zeigte einen polyklonalen Ursprung (Abb. 6).

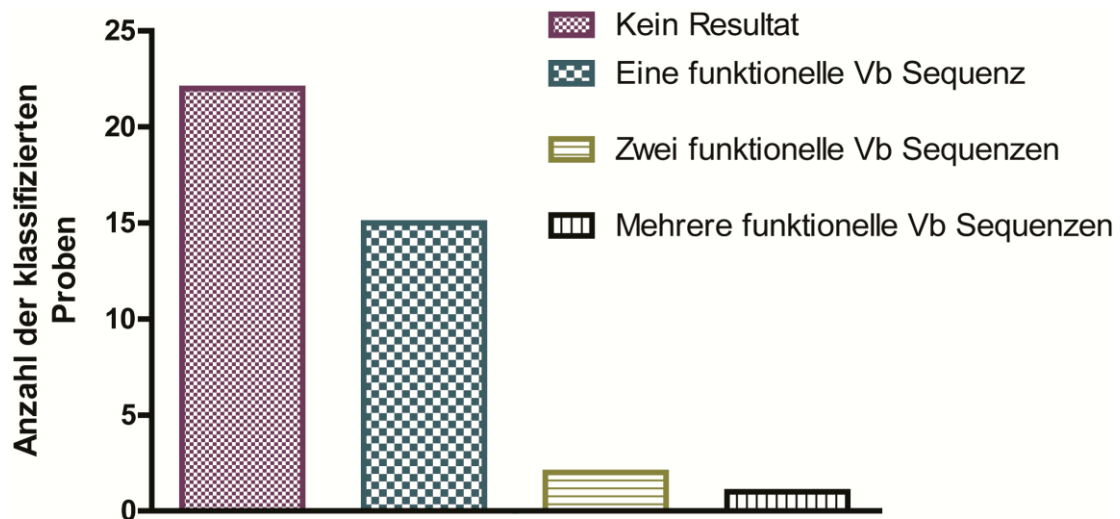


Abb. 6. Auswertung TZR – Analyse

Der Graph zeigt das Resultat der TZR-Analyse. Für 40 untersuchte Proben konnte bei 22 Proben kein Resultat detektiert werden. Bei 15 Proben lag eine funktionelle V β Sequenz vor. Bei drei Proben lagen zwei, oder mehr funktionelle V β Sequenzen vor.

4.3.2. IgH – Analyse

Da in vorausgehenden Untersuchungen von Dr. S. Raffegerst bei diesem Mausmodell ebenfalls B – Zelllymphome in hoher Frequenz beschrieben wurden, wurde in einem weiteren Schritt durch Untersuchung der Umlagerung der schweren Immunglobulin-Kette (IgH) das Aufkommen monoklonaler B-Zelllymphome untersucht.

Die verwendeten Primer amplifizierten sämtliche CDR (complementary determining region) – Bereiche der variablen Region. Der 3' Primer in diesem Ansatz bindet an alle J-Ketten (J 1-4), der hier verwendeten 5' Primer im konstanten Bereich der V-Region. Das amplifizierte

Produkt hatte eine hierbei eine Größe von ca. 330 bp (Kutemeier et al. 1992, Raffegerst 2007). Diese wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 7), die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, aufbereitet und zum Sequenzieren zu Eurofins MWG Operon versandt. Anschließend wurden die Sequenzen mit der Datenbank von IMGT/V-Quest (<http://www.imgt.org/IMGTvquest/vquest?livret=0&Option=mouseIg>) verglichen.

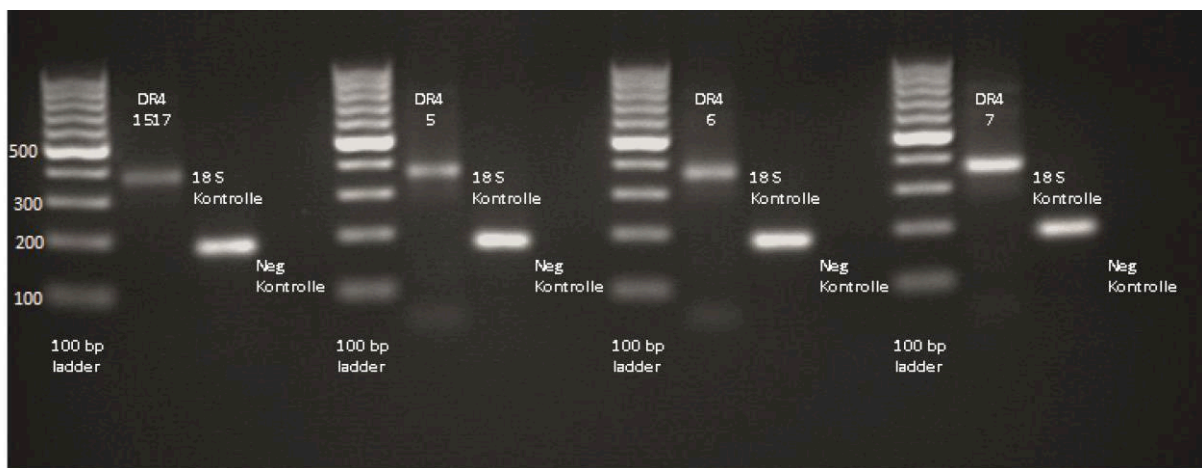


Abb. 7. Gelbild IgH – Analyse DR4 1517

Die Untersuchung von vier Mäusen des DR4 Stamms ist gezeigt. DR4 1517 ist eine erkrankte Maus. Die weiteren Mäuse sind gesunde Kontrollmäuse des gleichen Stamms. Wie anhand der Marker erkennbar ist, hat das Produkt der PCR eine Größe von 330 bp, das Produkt der Positivkontrolle (18S rRNA) hat eine Größe von 187 bp. Als Negativkontrolle wurde ein Standardansatz ohne cDNA durchgeführt.

Lässt sich in diesem Ansatz nach Sequenzierung eine einzige funktionelle CDR3-Region detektieren, war das ein starker Hinweis auf das Vorliegen eines monoklonalen B-Zelltumors. War dies nicht der Fall, konnte davon ausgegangen werden, dass in diesem Fall eine Mischpopulation unterschiedlicher B-Zellen in der Milzprobe vorlag und somit ein Tumor monoklonalen Ursprungs unwahrscheinlich war. Grund hierfür war, dass nur ein Primerpaar verwendet wurde. War der Tumor oligoklonalen Ursprungs, so ließ sich mit dem verwendeten Ansatz keine dominante Bande in der *in silico* Analyse detektieren.

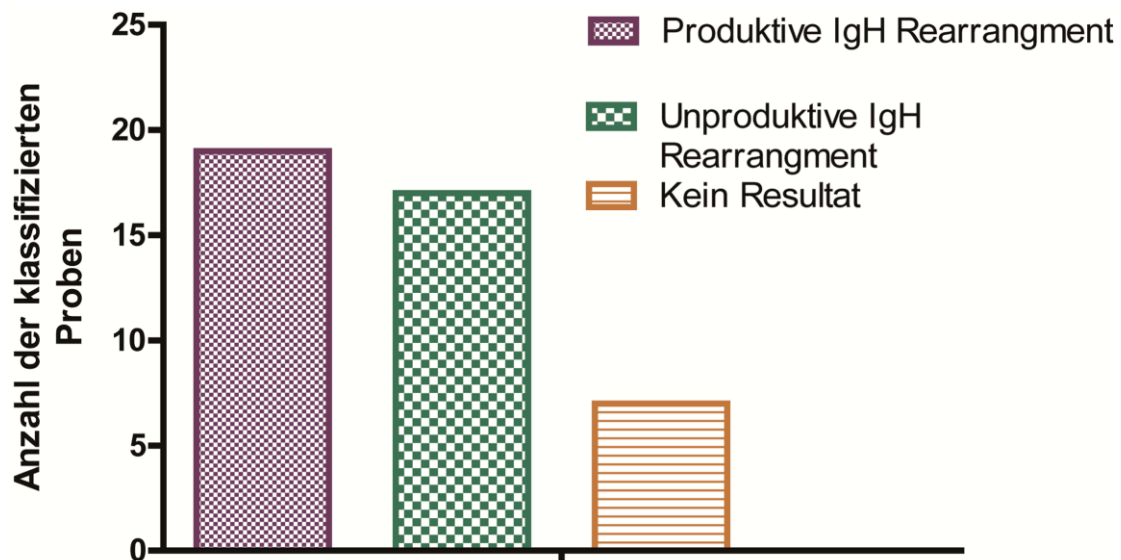


Abb. 8. Auswertung IgH – Analyse

Der Graph zeigt die numerische Verteilung der Ergebnisse der IgH-Untersuchung. Für 43 untersuchte Proben konnte bei 19 Mäusen ein monoklonales Ergebnis detektiert werden, 17 Mäuse zeigten keinen monoklonalen Ursprung und bei 7 Mäusen war kein Ergebnis zu erhalten.

Insgesamt wurde bei 43 von 57 Mäusen, die morphologisch krank erschienen, eine IgH – Analyse durchgeführt. Bei 19 Mäusen (44,2 %) konnten nach Sequenzierung die Tumoren als monoklonal klassifiziert werden. Bei 17 Mäusen (39,5 %) konnte kein Tumor mit monoklonalem Ursprung detektiert werden. In diesem Fall lag eine Mischsequenz vor, so dass die Hintergrundwerte das mögliche Vorliegen eines monoklonalen Rezeptors überlagerten. Sieben Mäuse (16,3 %) lieferten kein Ergebnis (Abb. 8)

4.3.3. Zusammenfassung T-Zellrezeptoranalyse und IgH – Analyse

Bei 40 von 57 Tumorproben wurde sowohl eine T-Zell-Rezeptoranalyse, als auch eine IgH – Analyse durchgeführt. Damit sollte sichergestellt werden, dass die beiden möglichen Entitäten des malignen Lymphoms, B- und T-Zelllymphom, untersucht wurden. Es muss auch weiterhin beachtet werden, dass die Untersuchung auf mRNA-Ebene durchgeführt wurde.

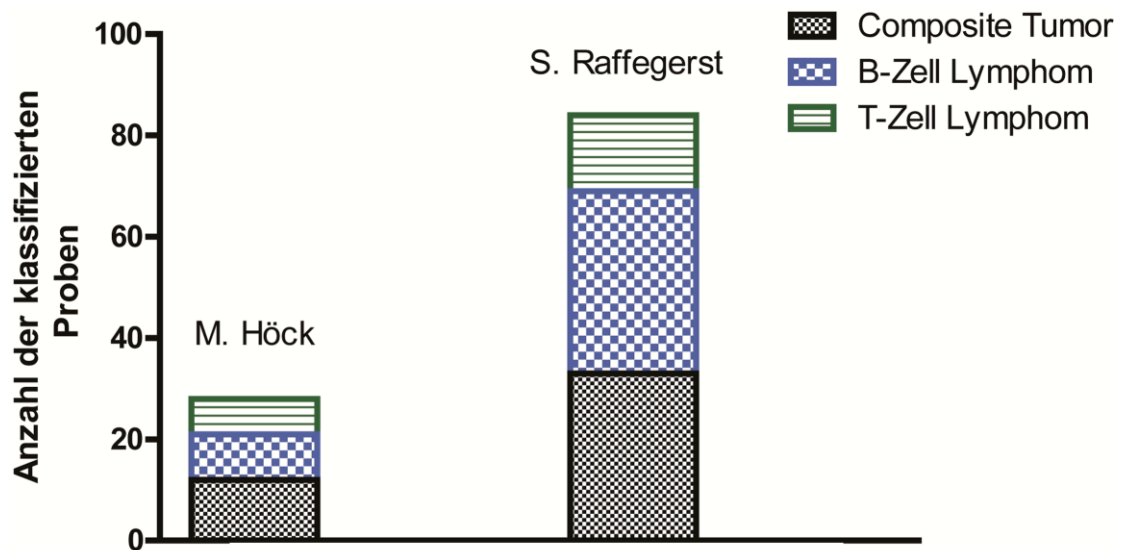


Abb. 9. Vergleich Tumorentität S. Raffegerst und M. Höck

Vergleich der Tumorfrequenzen bei Untersuchungen durch M.Höck und S.Raffegerst. Nicht gezeigt unproduktive Ergebnisse.

Von 40 Proben, die mit beiden Methoden untersucht wurden, konnten 12 (30 %) Proben als T-Zelllymphom definiert werden. 9 (22,5 %) der Proben wurden als B-Zelllymphom klassifiziert. Insgesamt 12 (30 %) Proben blieben ohne verwertbares Resultat. 7 Tumorproben (17,5 %) wurden als Composite Tumore eingestuft. Die Tumorfrequenzen sind somit ähnlich derer, die in der vorausgehenden Studie von S. Raffegerst festgestellt wurden (Raffegerst 2007). Hier zeigte sich bei T-Zelllymphome eine Frequenz von 35,9 %, B - Zelllymphome mit einer Frequenz von 39,1 % und Composite Tumoren mit einer Frequenz von 16,3 % auftraten (Abb. 9).

4.4. Verbesserte Methode der Zellgewinnung aus dem Knochenmark

Ein wichtiger Teilaspekt dieser Arbeit war die Gewinnung von Knochenmark der Mäuse, da dies als Basis für weitere Untersuchungen diene. Im ersten Schritt musste also eine Methode gefunden werden, um eine möglichst hohe Quantität und Qualität, also ein möglichst hoher Prozentsatz an lebenden Zellen, gefunden werden. Nachdem zunächst die

Knochenmarksernte derart erfolgte, dass die mechanisch von Gewebsresten befreiten Knochen an beiden Enden eröffnet wurden und das Knochenmark unter Druck mittels einer Hohlkanüle ausgespült wurde, fand nach Überprüfung der Ergebnisse im weiteren Verlauf die Umstellung auf das Steriflip Vakuum-vermittelte Filtrationssystem von Millipore statt.

Nachdem mit der herkömmlichen Methode im Durchschnitt $50-60 \times 10^6$ Zellen bei einem Lebendanteil von 90 % generiert wurden, konnten nach Etablierung der Methode im Durchschnitt 90×10^6 Zellen bei einem Lebendanteil von 95 % gewonnen werden. Dies ist zum Einen dadurch bedingt, dass neben den langen Röhrenknochen nun auch Beckenknochen für die Aufbereitung Verwendung fanden, zum Anderen dadurch, dass keine direkte Manipulation am knochenmarksreichen Epiphysenende stattfand und so ein Verlust an Knochenmarkszellen umgangen werden konnte. So konnte mit der neu etablierten Methode die quantitative Effektivität der Knochenmarksernte um 25-35 % Prozent gesteigert werden.

4.5. Voruntersuchung zur miRNA Expression

4.5.1. Auswertung miRNA Array MACS molecular

Um Unterschiede der miRNA-Expression im Knochenmark der DR4-Tumormäuse im Vergleich zu gesunden DR4-Kontrollen und BL6-Mäusen, dem genetischen Background des Mausmodells, zu untersuchen, wurde folgender Ansatz gewählt. Im ersten Schritt wurde ein miRNA Array bei der Firma Miltenyi in Auftrag gegeben. Putative miRNA-Kandidaten wurden im zweiten Schritt mittels der xMAP™ Technologie von Luminex verifiziert.

Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt. Insgesamt 766 murine miRNA (mmu – mir) Kandidaten wurden im Knochenmark der eingesendeten Proben (1x BL6, 1x DR4-Gesund, 1x

DR4-Tumor 1, 1x DR4-Tumor 2) mittels des hausinternen Protokoll der Firma Miltenyi untersucht. Kandidaten wurden aus der Gesamtliste anhand der ReRatio, also dem Quotienten normalisierter Werte ausgewählt. Zur Verdeutlichung wird dies exemplarisch an mmu-mir 712 verdeutlicht. Der normalisierte Wert (Ratio-Wert) in der BL6-Probe betrug 0,21. Der Ratio-Wert in der Probe DR4_Gesund betrug 0,77. Nach Analyse mittels der PIQORTM-Analyzer durch die Firma Miltenyi wurde ein ReRatio Wert DR4_Gesund vs BL6-Sp von 5.01 festgestellt. Die Fehler-Berechnung ergab einen p-Wert von 0.00. miRNA, deren ReRatio-Wert >2 , oder $< 0,5$ beträgt und deren p-Wert <0.0001 ist, werden für die weitere Auswertung als interessante Kandidaten vorgeschlagen (Luminex, 2011). Der ReRatio-Wert zeigte also eine 5,01- fache Überexpression von mmu-mir 712 in der gesunden DR4 Kontrollmaus im Vergleich zur BL6 Maus. Nachdem der p-Wert auch das vorgeschlagene Kriterium erfüllte, konnte davon ausgegangen werden, dass dies ein reeller Wert ist und die mmu-mir 712 für weitere Untersuchungen ein putativer Kandidat darstellte (Abb. 11).

GeneID	miRNA name	Reratio DR4_Gesund vs. BL6
38902	MIR-712	5.008
38904	MIR-714	5.676
38896	MIR-706	3.590
38561	MIR-350	0.158

Abb. 10 Auszug ReRatio-Liste miRNA-Array

Beispielhafter Auszug aus der ReRatio-Liste DR4_Gesund vs. BL6. Rot = mir überexprimiert im in der gesunden DR4 Maus, grün = mir unterexprimiert in der gesunden DR4 Maus. Eingerahmt ist das oben erwähnte Beispiel (miRNA Array, Miltenyi)

DR4_Gesund vs. BL6

Im Folgenden wurden diejenigen miRNA aufgezeigt, auf die die oben genannten Kriterien zuträfen.

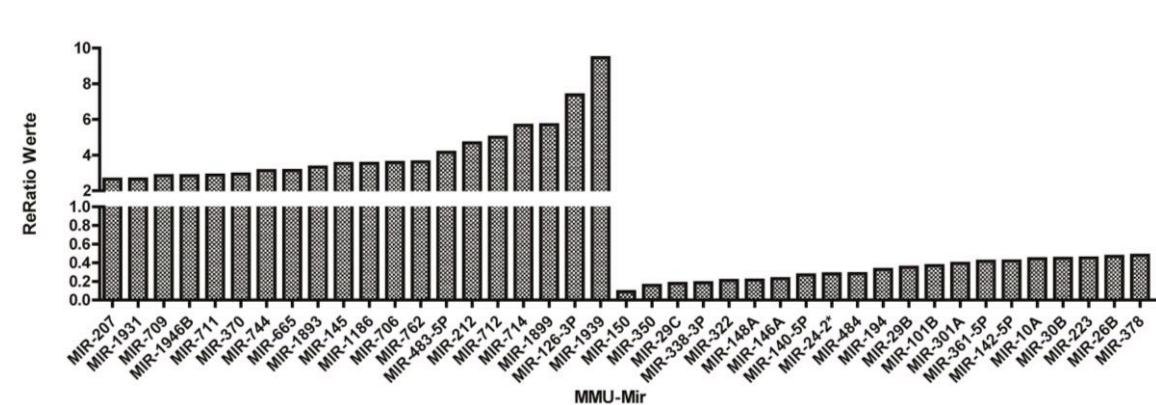


Abb. 11. ReRatio DR4 Gesund vs. BL6

Links: miRNA ReRatio Wert >2, p-Wert <0.0001; Rechts: miRNA ReRatio Wert < 0,5, p-Wert <0.0001

DR4_Tumor 1 vs. DR4_Gesund

Im Folgenden wurden diejenigen miRNA aufgezeigt, auf die die oben genannten Kriterien zuträfen.

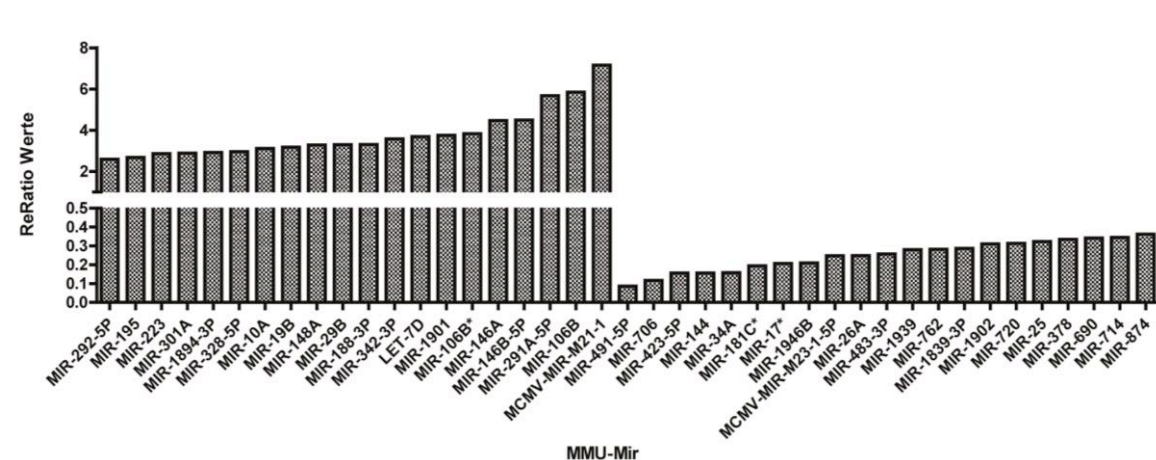


Abb. 12. ReRatio DR4 Tumor 1 vs DR4 Gesund

Links: miRNA ReRatio Wert >2, p-Wert <0.0001; Rechts: miRNA ReRatio Wert < 0,5, p-Wert <0.0001

DR4_Tumor 2 vs. DR4_Gesund

Im Folgenden wurden diejenigen miRNA aufgezeigt, auf die die oben genannten Kriterien zutrafen.

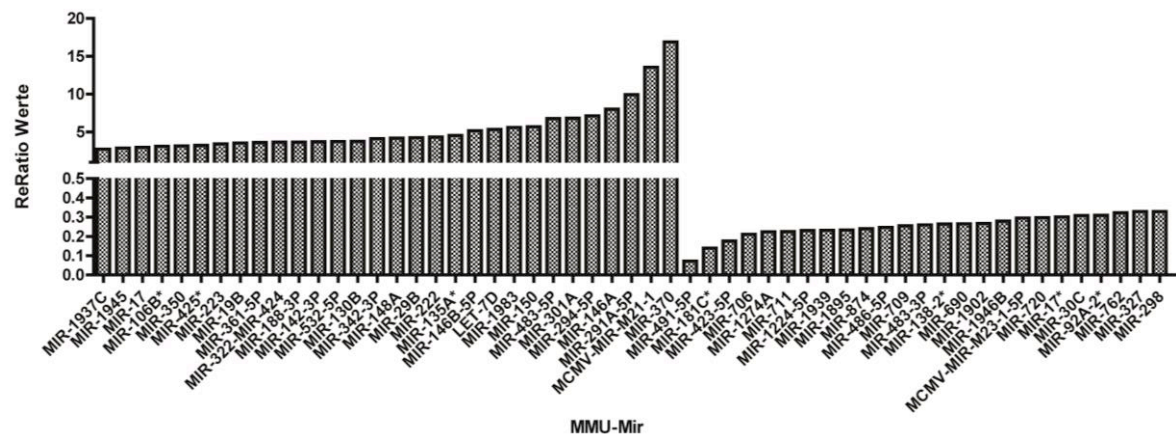


Abb. 13. ReRatio DR4 Tumor 2 vs. DR4 Gesund

Links: miRNA ReRatio Wert >2, p-Wert <0.0001; Rechts: miRNA ReRatio Wert < 0,5, p-Wert <0.0001

Aufgrund der großen Menge an möglichen Kandidaten wurde ein Verfahren eingeführt, um aus den getesteten 766 miRNA diejenigen zu detektieren, die für eine weitere Überprüfung interessant waren.

Im ersten Schritt wurden die Ergebnisse des miRNA-Arrays der Firma Miltenyi in die Omics Explorer 2.2 Software der Firma Qlucore übertragen und nach den vorgegebenen Kriterien des Serviceprotokolls der Firma Millipore ausgewertet. Entscheidend war der Vergleich der miRNA Expressionsmuster zwischen DR4_Tumor 1 vs. DR4_Gesund und DR4_Tumor 2 vs. DR4_Gesund. Aus Kosten- und Zeitgründen sollte jedoch eine weitere Eingrenzung erfolgen. Abbildung 15 zeigt die 30 miRNA ausgewählten Kandidaten als Heatmap Darstellung mittels der Omics Explorer 2.2 Software von Qlucore.

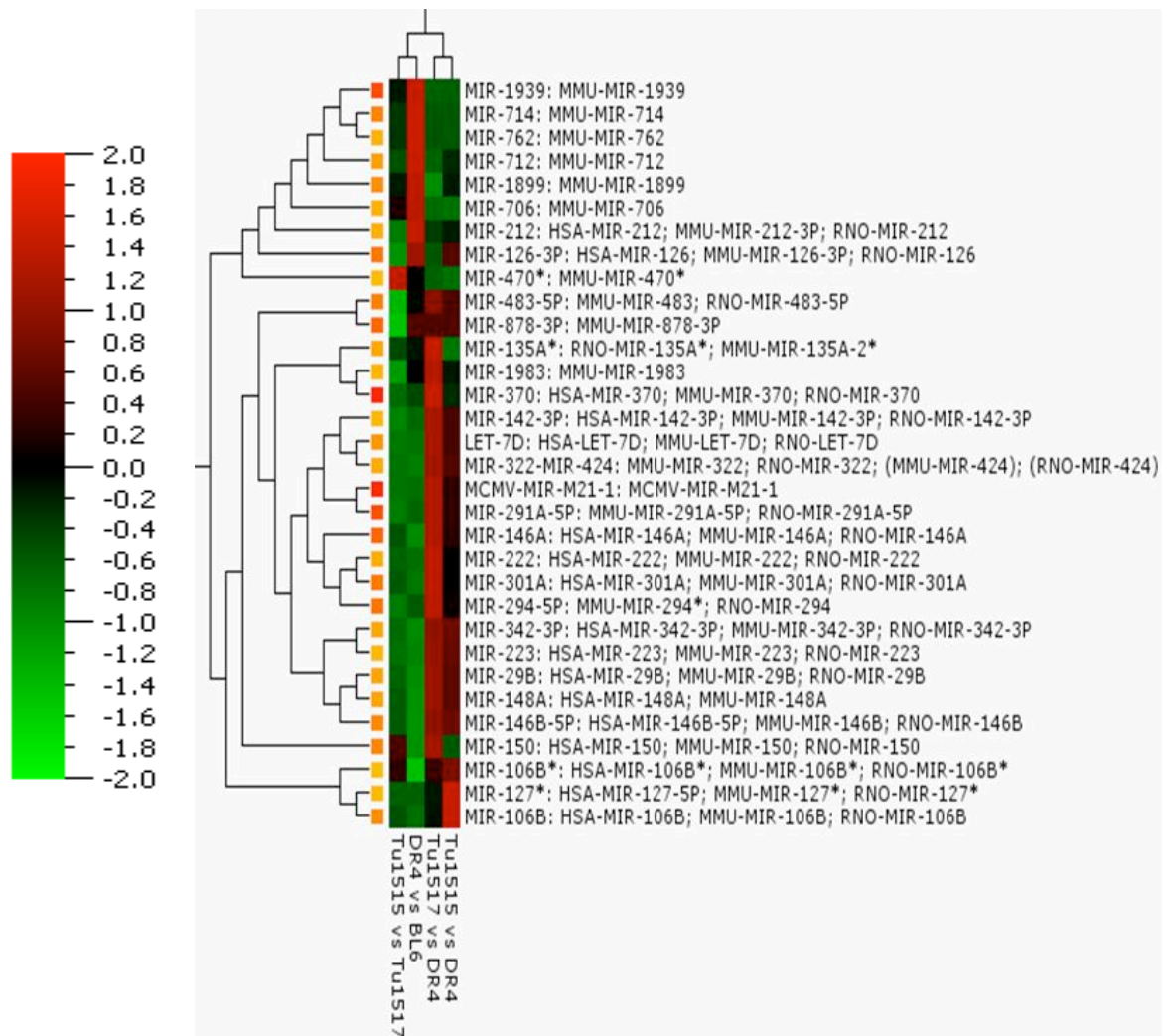


Abb. 14. Heatmapdarstellung von 30 möglichen miRNA-Kandidaten

Grün: unterexprimiert, Rot: überexprimiert (Omics Explorer 2.2, Qlucore)

Im Vergleich sind diese >2 überexprimiert, oder < 0,5-fach unterexprimiert sind und deren p-Wert beträgt <0.0001.

Im zweiten Schritt erfolgte eine *in silico* Analyse der 30 Kandidaten um zu untersuchen, ob diese bereits, in der Hämatopoese der Maus, als relevante miRNA beschrieben wurden. Dieser Schritt erfolgte mittels der Genomatix Software. Letztendlich wurden so 15

Kandidaten detektiert, die sowohl den vorgegebenen Kriterien der Auswertung des miRNA-Arrays entsprachen und die ebenfalls in der murinen Hämatopoese eine Rolle spielten (Abb. 16). Dabei wurden acht unterexprimierte und sieben überexprimierte miRNA für die weitere Überprüfung mittels der Luminex-Plattform ausgewählt.

miRNA Name	Mature Sequenz
mmu-mir-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG
mmu-mir-350	UUCACAAAGCCCAUACACUUUC
mmu-mir-29c	UAGCACCAUUUGAAAU CGGUUA
mmu-mir-491-5p	AGUGGGGAACCCUCCAUGAGG
mmu-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU
mmu-mir-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACU
mmu-miR-181c	AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU
mmu-mir-706	AGAGAAACCCUGUCUAAAAAA
mmu-mir-126-3P	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
mmu-mir-714	CGACGAGGGCCGGUCGGUCGC
mmu-mir-712	CUCCUUCACCCGGGCGGUACC
mmu-mir-106b	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
mmu-miR-291a-5p	CAUCAAGUGGAGGCCUCUCU
mmu-miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
mmu-294*	ACUCAAAAUGGAGGCCCUAUCU

Abb. 15. Fünfzehn Top miRNA-Kandidaten mit maturer miRNA-Sequenz

Tabellarische Aufführung der relevanten miRNA-Kandidaten. Grün = unterexprimierte miRNA im Tumor im Vergleich zur gesunden DR4_Kontrollmaus. Rot = überexprimierte miRNA im Tumor im Vergleich zur gesunden DR4_Kontrollmaus. Die mature miRNA Sequenz wurde durch Eingabe der miRNA Namen bei www.mirbase.org Release 19 erhalten.

4.5.2. Etablierung der xMAP™ Technologie von Luminex

Die gewonnen Daten aus dem miRNA-Array bedurften einer Validierung mittels einer weiteren Methode, wie zum Beispiel der quantifizierten real – time PCR oder xMAP™ Technologie von Luminex. Für diese Arbeit wurde die Letztgenannte ausgewählt, da diese eine Kostenersparnis gegenüber anderen ermöglichte und simultan mehrere miRNA messen

konnte. So wurden bis zu 80 miRNAs in 96 Proben gleichzeitig quantifiziert. Ebenfalls wurde eine geringe Probengröße toleriert (Wang Y et al. 2012). Diese Methode beruht auf einer Arbeit aus dem Jahr 2010 (Biscontin et al. 2010).

Im ersten Schritt wurden die maturen Sequenzen der 15 putativen miRNA Kandidaten durch die Datenbank www.mirbase.org Release 19 gewonnen (siehe Abb.15). Im zweiten Schritt wurde ein chimärer RNA/DNA-Primer designt, der aus der komplementären RNA-Sequenz zur miRNA und einer DNA-Sequenz, der sogenannten xTAG Sequence, bestand, die an die Oberflächenstruktur von 5,6 Micron großen Beads band. Jeder dieser Beads bestand aus einer Mischung zweier Floreszenzen, so dass nach Bindung des chimären Primer jede gekoppelte miRNA spezifisch detektiert werden konnte. An den reversen RNA-Anteil des Primers war des weiteren Biotin gekoppelt, an den im weiteren Verlauf Streptavidin zur Detektion binden konnte.

In dem gewählten Ansatz wurden 15 miRNAs gleichzeitig in 80 Proben gemessen. Der erste PCR-Schritt diente der Bindung des chimären Primers an die spezifische miRNA. Im zweiten PCR Schritt band der DNA Anteil des chimären Primers an ein 5,6 Micron großen Bead, der durch die Mischung zweier Fluoreszenzen jede miRNA spezifisch nachweisbar machte. Im dritten PCR Schritt band Streptavidin-PE an den Biotinanteil des chimären Primers. Durch Messung der MFI (Mediane-Fluoreszenz-Intensität) konnte so die Expressionshöhe jeder gebundenen miRNA quantifiziert werden. Neben einer Negativkontrolle, die keine miRNA enthielt, wurde eine positive Kontrolle mit einer artifiziellen miRNA mit definierter Konzentration gemessen. Diese diente zum einen als Nachweis, dass der Testlauf funktionierte, und zum anderen wurde dadurch die gemessene miRNA Expressionsstärke normalisiert. In mehreren Testläufen wurde zunächst die Funktionsfähigkeit des Systems

mittels Messung einer definierten Konzentration an artifizieller miRNA sichergestellt und anschließend Messungen an den Gewebeproben aus der Mäusezucht vorgenommen.

4.6. Untersuchung der Knochenmarksproben

Die detektierten Kandidaten sollten im folgenden Schritt validiert werden. Von besonderem Interesse war in dieser Hinsicht die Untersuchung der Vorläuferzellen der Hämatopoese. Dazu zählten die Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), Multipotente Progenitoren (MP), Gemeinsamen myeloide Progenitors (CMP) und Gemeinsame lymphoide Progenitoren (CLP). Daraus gehen Blutzelltypen unterschiedlichster Morphologie und Funktion hervor, wie zum Beispiel Granulozyten, Erythrozyten, B-Zellen und T-Zellen. Neben der Fähigkeit der Differenzierung verfügen die multipotenten HSZ, die an der Spitze der Kaskade stehen, über die Kapazität zur Selbsterneuerung, eine Eigenschaft die im weiteren Verlauf der Blutzellkaskade verloren geht (Morrison et al. 1994, Seita et al. 2010).

Für jeden dieser Zelltypen sind spezifische Oberflächenmarker bekannt die es erlauben, aus einer Mischpopulation an unterschiedlich weit differenzierten Vorläuferzellen, wie sie im Knochenmark vorgefunden werden können, einzelne Zelltypen durch immunologische Verfahren zu differenzieren (Kondo et al. 1997, Akashi et al., 2000, Challen et al. 2009).

Deswegen wurde ein schrittweiser Ansatz gewählt. Zunächst wurde Gesamtknochenmark einzelner Mäuse generiert. Da die Vorläuferzellen der Hämatopoese im besonderen Fokus standen, wurden diese anschließend mittels einer Sortierung anhand spezifischer Oberflächenmarkern aus dem Knochenmark isoliert. Nach konsekutiver Gewinnung der Total-RNA, fand schließlich die Messung der miRNA mittels der xMAP™ Technologie von Luminex statt.

Da, wie in der Einleitung beschrieben, in diesem Mausmodell Lymphome beschrieben sind, die unterschiedlichster Tumorentitäten zugehörten, bestand die Vermutung, dass bereits in den frühen Vorläuferzellen sich eine genetische Veränderung zugetragen haben muss, die zur Tumorentstehung beiträgt. Die Veränderung der miRNA Expression in unterschiedlich weit entwickelten Zelltypen darzustellen, war die Aufgabenstellung des vorliegenden Versuchs.

4.6.1. Moflow Sortierung

Die technische Möglichkeit hämatopoetische Zellen in ihre funktionellen Subklassen aufzutrennen, wurde bereits früh gezeigt (Spangrude et al. 1988). Dieser Umstand sollte genutzt werden, um die miRNA Expression in frühen Vorläuferzellen zu untersuchen und festzustellen, ob dort bereits eine Verschiebung im Expressionmuster zwischen Tumormäusen und Kontrollmäusen vorlag. Auch sollte so ein Einblick in die Frequenz der verschiedenen Zellen der Blutzellkaskade gewonnen werden.

Die frühen Zellen der Blutzellkaskade haben gemein, dass sie keine Oberflächenmarker ausdifferenzierter Zellen tragen, also als Lineage-negative (Lin^{neg}) Zellen bezeichnet werden. Ein weiteres Charakteristikum ist, dass sie positiv für den CD117/ckit (ckit^{pos}) Marker sind. Hämatopoetische Knochenmarkszellen mit dem Charakteristikum, dass sie Lin^{neg} und ckit^{pos} sind, umfassen die pluripotenten, oligopotenten und multipotenten Vorläuferzellen der Blutzellkaskade (Bryder et al. 2006). Anhand dieses Charakteristikums wurden die Vorläuferzellen aus dem Gesamtknochenmark von BL6-Mäusen, tumortragenden DR4-Mäusen und gesunden DR4-Kontrollmäusen isoliert.

Insgesamt wurden 19 DR4-Tumormäuse, drei DR4-Kontrollmäuse und vier BL6-Kontrollmäuse für die Sortierung herangezogen. Bei einer DR4-Tumormaus konnte nach Auftauen der Zellen keine ausreichende Zellzahl für die Sortierung generiert werden, weswegen diese nicht für weitere Untersuchungen berücksichtigt wurde. Die Frequenz der $\text{Lin}^{\text{neg}}/\text{ckit}^{\text{pos}}$ Zellen und der $\text{Lin}^{\text{pos}}/\text{ckit}^{\text{neg}}$ in allen lebenden Einzelzellen und die verwendeten Zellzahlen für die Sortierung ist in Tabelle 1 dargestellt. Die eingefrorenen Zellen wurden nach dem Auftauen aus der -80°C Lagerung gezählt und jeweils Proben für die RNA Extraktion und zur Untersuchung mittels FACS entnommen. Für die Sortierung wurden so letztendlich zwischen $9\text{-}100 \times 10^6$ Zellen entnommen.

Nach statistischer Auswertung mittels des parameterfreien Kruskal-Wallis Test ergab sich in beiden Gruppen, $\text{Lin}^{\text{neg}}/\text{ckit}^{\text{pos}}$ und $\text{Lin}^{\text{pos}}/\text{ckit}^{\text{neg}}$, jeweils keine statistische signifikanter Unterschied der Frequenzen zwischen den Mäusegruppen (Abb. 16, Abb.17).

Probe	Zellzahl vor Sortierung	$\text{Lin}^{\text{neg}}/\text{ckit}^{\text{pos}}$ In % nach Sortierung	$\text{Lin}^{\text{pos}}/\text{ckit}^{\text{pos}}$ In % nach Sortierung
DR4_99 T	$9,75 \times 10^6$	2,2 %	8,1 %
DR4_59 T	46×10^6	0,67 %	17,6 %
DR4_65 T	38×10^6	0,42 %	43,9 %
DR4_77 T	12×10^6	2,22 %	26,7 %
DR4_79 T	-	kaum Zellen nach auftauen	deshalb keine Sortierung
DR4_82 T	71×10^6	0,48 %	4,82 %
DR4_95 T	29×10^6	0,51 %	60,5 %
DR4_104 T	52×10^6	0,68 %	29,4 %

DR4_109 T	100x10 ⁶	1,55 %	28,5 %
DR4_169 T	30x10 ⁶	1,45 %	19 %
DR4_17 T	48x10 ⁶	0,46 %	30,16 %
DR4_26 T	58x10 ⁶	1,33 %	6,70 %
DR4_30 T	40x10 ⁶	0,42 %	3,77 %
DR4_44 T	100x10 ⁶	0,49 %	30,96 %
DR4_60 T	98x10 ⁶	0,036 %	1,60 %
DR4_71 T	108x10 ⁶	1,27 %	43,96 %
DR4_18 T	45x10 ⁶	0,57 %	4,04 %
DR4_52 T	10x10 ⁶	0,29 %	3,37%
DR4_64 T	70x10 ⁶	0,72 %	20,8 %
DR4_129K	80x10 ⁶	0,06%	3,3 %
DR4_164K	44x10 ⁶	0,21 %	8,3 %
DR4_165 K	61x10 ⁶	1,07 %	34,2 %
BL6_10 K	51x10 ⁶	1,15 %	47,5 %
BL6_6K	35x10 ⁶	0,2 %	5 %
BL6_8K	82x10 ⁶	0,15 %	9,1 %
BL6_9K	58x10 ⁶	0,18 %	8,65 %

Tabelle. 1. Frequenzen der Vorläuferzellen nach Moflow-Sortierung

Tabelle 1 zeigt die verwendeten Zellzahlen pro Maus und die Frequenzen der beiden Subpopulationen Lin^{neg}, ckit^{pos} und Lin^{pos} ckit^{neg}. T=Tumormaus, K = DR4-Kontrollmaus

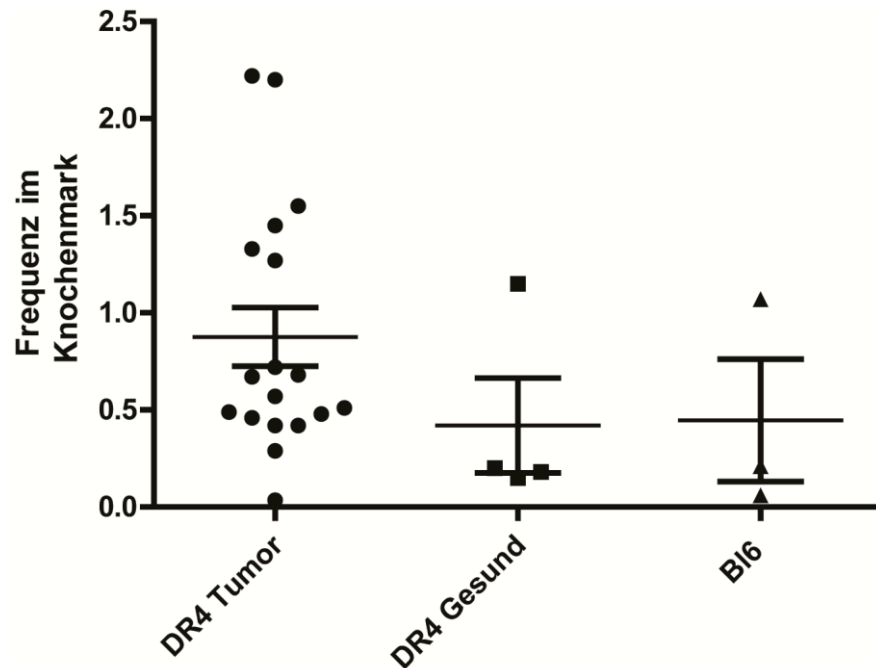


Abb. 16. Frequenz der Lin^{neg}/ckit^{pos} Zellen an den Gesamtzellen im Knochenmark

Darstellung der Frequenz der Lin^{neg}/ckit^{pos} Zellen an den Gesamtzellen im Knochenmark. X-Achse: Frequenzen im Knochenmark, Gezeigt sind die Mittelwert und die Standardabweichung.

In der graphischen Darstellung zeigte sich jedoch eine starke Heterogenität der Frequenzen (Abb. 16 / 17), besonders bei den DR4-Tumormäusen. Um zu untersuchen, ob auch die folgenden Zellen der Blutzellkaskade bei DR4-Tumormäusen einer starken Heterogenität unterlagen, wurde ein FACS-Schema etabliert. Die Ergebnisse hiervon werden im Punkt 4.6.2. beschrieben.

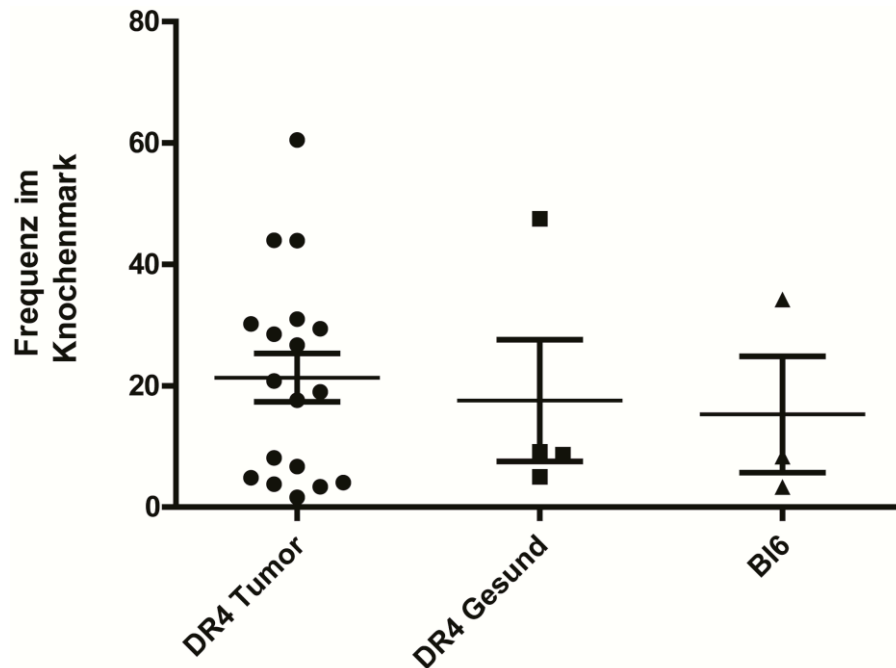


Abb. 17. Frequenz Lin^{pos}/ckit^{neg} Zellen im Knochenmark

Darstellung der Frequenz der Lin^{pos}/ckit^{neg} Zellen der Gesamtzellen im Knochenmark. X-Achse: Frequenzen im Knochenmark. Gezeigt sind die Mittelwert und die Standardabweichung.

In Abbildung 18 ist das Sortierungsschema des vorliegenden Versuches angegeben. Hierbei wurden im ersten Schritt tote und duplettierte Zellen ausgeschlossen (hier nicht gezeigt) und im Anschluss die Aufteilung in die beiden Untergruppen, Lin^{neg}/ckit^{pos} und Lin^{pos}/ckit^{neg} dargestellt.

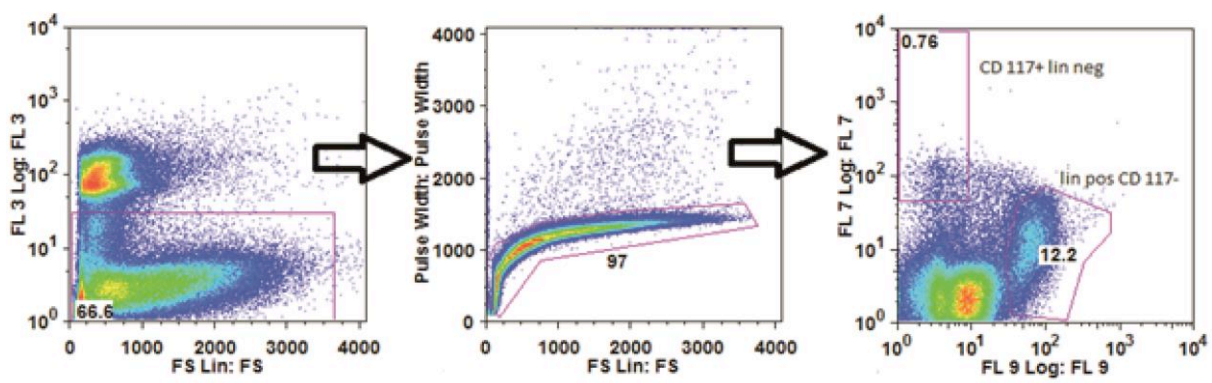


Abb. 18. Gating-Strategie FACS-Schema

Diese Abbildung zeigt die Gating-Strategie des Sortierung-Versuch exemplarisch anhand der DR4-Tumormaus 62. In den ersten Schritten erfolgt die Exklusion toter, duplettierter Zellen (Schritt 1) und dem Debris (Schritt 2).

Im nachfolgenden Schritt erfolgt die Aufteilung der Subpopulationen in die beiden Untergruppen $\text{Lin}^{\text{neg}}/\text{ckit}^{\text{pos}}$ und $\text{Lin}^{\text{pos}}/\text{ckit}^{\text{neg}}$. In der Graphik links bezeichnet hierbei die y-Achse das Fluoreszenz-Signal der ckit-Markern und die x-Achse das Fluoreszenzsignal des Lineage-Cocktails.

4.6.2. FACS-Analyse des Knochenmarks

Wie bereits beschrieben können Vorläuferzellen des Knochenmarks anhand ihrer Oberflächenmarker differenziert werden (Akashi et al. 2000, Challen GA et al. 2009, Kondo et al. 1997). Nachdem sich im Sortierungsversuch Anhaltspunkte ergaben, dass es einen Unterschied in der Frequenz der Zellen der Hämatopoese zwischen DR4-Tumormäusen und BL6-Kontrollmäusen gibt, sollte in einem FACS-Versuch dies näher untersucht werden. Dazu wurde das Schema nach Weissman verwendet und für den FACS-Versuch etabliert (Weissman et al. 2008).

Schema der Hämatopoese in Mäusen nach Bryder et al. 2006, Weissman et al. 2008

LT – HSC (Long Term Reconstituting HSC)	$\text{Lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD135}^- \text{CD34}^- \text{CD150}^+$	} SKL – Zellen $\text{Lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^+$
ST – HSC (Short Term Reconstituting HSC)	$\text{Lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD135}^- \text{CD34}^+ \text{CD150}^-$	
MPP (Multi-Potent Progenitors)	$\text{Lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD135}^{\text{hi}} \text{CD34}^+ \text{CD150}^-$	
CLP (Common Lymphoid Progenitors)	$\text{Lin}^- \text{ckit}^{\text{lo}} \text{Sca1}^{\text{lo}} \text{CD135}^{\text{hi}} \text{IL7R}\alpha^+$	
CMP (Common Myeloid Progenitors)	$\text{Lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^- \text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{low}}$	
MEP (Myeloid, Erythroid Progenitors)	$\text{Lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^- \text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^-$	
GMP (Granuloid, Monocytoid Progenitors)	$\text{Lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^- \text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^+$	

Insgesamt wurden je 1×10^6 Zellen von 11 DR4-Tumormäusen (sieben männliche, vier weibliche Tiere) verwendet. Hierbei wurde bei vier Mäusen in vorangehenden Untersuchungen das Vorliegen eines B – Zellymphoms detektiert. Fünf BL6-Kontrollmäuse (zwei männliche, drei weibliche Tiere) wurden eingesetzt. Das Durchschnittsalter der tumortragenden DR4-Mäuse bei Sektio betrug 305 Tage, die BL6-Mäuse wurden alle am Tag 82 der Sektio zugeführt. Die Proben der gesunden drei DR4-Kontrollmäuse wurden von Dr. S. Raffegerst bereitgestellt. Diese waren bei Sektio im Durchschnitt 120 Tage alt. Nachdem sich bei der vorausgehenden Untersuchung der Tumorinzidenz kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren ergab, wurde auf geschlechtsspezifische Unterschiede im Frequenzmuster nicht weiter eingegangen und diese als geschlossene Gruppe analysiert.

Bei Analyse der Lin^{neg}, ckit^{pos} Vorläuferzellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem DR4 - Mausstamm und den BL6-Kontrollmäusen detektiert werden. Auch in den oligopotenten Vorläuferzellen CLP, CMP, GMP und MEP war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Frequenz erkennbar. In der Gruppe der multipotenten Vorläuferzellen, den MPP und ST – HSZ ergab sich kein Unterschied in der Frequenz der Vorläuferzellen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0.0127$) konnte bei den multipotenten Vorläuferzellen, den LT – HSZ, nachgewiesen werden (Abb. 19). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Diese Zellgruppe ist für die langfristige Rekonstitution des Knochenmarks und für die Funktionsfähigkeit des Knochenmarks verantwortlich (Morrison et al. 1994, Seita et al. 2010).

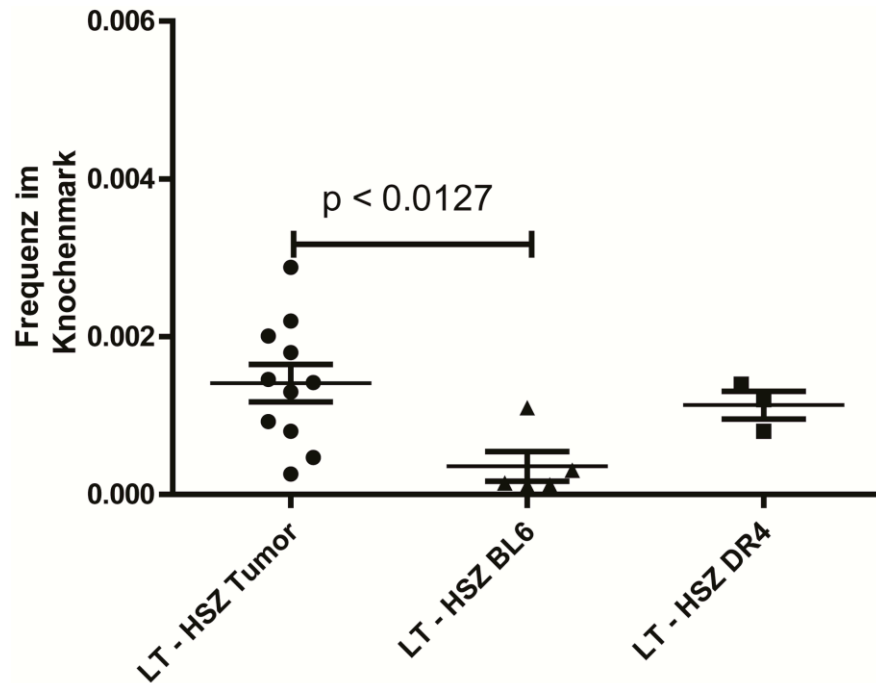


Abb. 19 Frequenz LT-HSZ

Darstellung der kumulierten Frequenz der LT – HSZ mit Mittelwert und Standardabweichung im Knochenmark der drei Mauspopulationen DR4-Tumormäuse, DR4-Kontrollmäuse und BL6-Kontrollmäuse. Untersucht wurden hierbei elf DR4-Tumormäuse, 3 DR4 Kontrollmäuse und 6 BL6-Mäuse, wobei bei einer BL6-Maus kein Ergebnis detektiert wurde und diese deshalb aus der vorliegenden Untersuchung ausgeschlossen wurde. Die Angaben der Frequenz beziehen sich auf jeweils 1×10^6 eingesetzte Knochenmarkszellen.

Im genaueren Vergleich wurde die Gruppe der B-Zelllymphome (n=4) mit den BL6 Kontrollmäusen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese Tumoruntergruppe der Tumormäuse statistisch signifikant ($p < 0.0159$) mehr LT – HSZ Zellen aufwiesen, als die gesunde Kontrollgruppe. In den weiteren Untergruppen war eine Verschiebung nicht ersichtlich (Abb. 20)

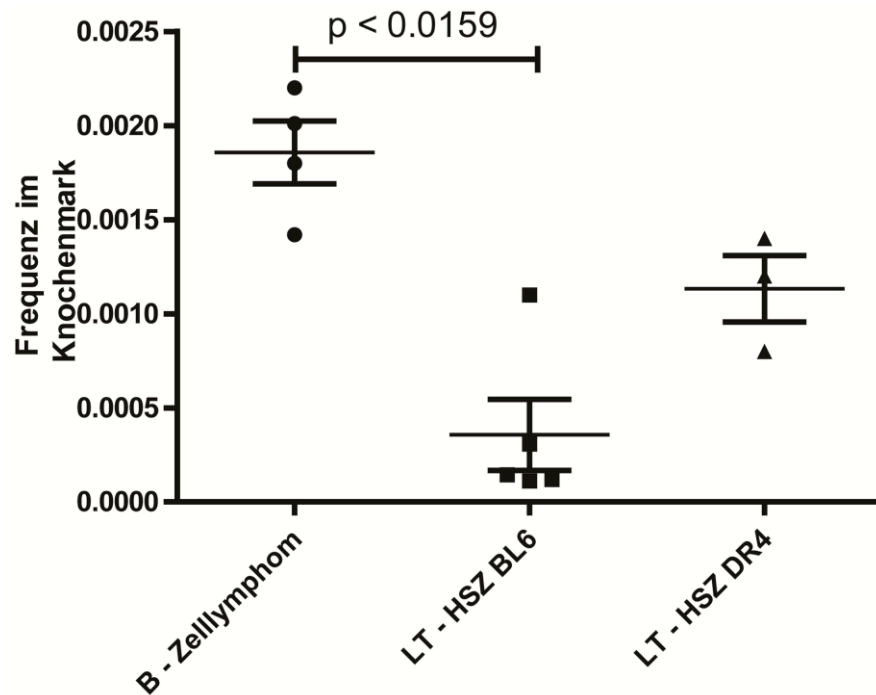


Abb. 20. Untergruppen LT-HSZ

Darstellung der kumulierten Frequenz der LT – HSZ mit Mittelwert und Standardabweichung im Knochenmark der drei Mauspopulationen: vier DR4-Tumormäuse, die als B-Zelllymphom klassifiziert wurden, drei DR4-Kontrollmäuse und fünf BL6-Kontrollmäuse. Die Angaben der Frequenz beziehen sich auf jeweils 1×10^6 eingesetzte Knochenmarkszellen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Zusammenfassend konnte für die vorliegende Untersuchung konstatiert werden, dass DR4-Tumormäuse im Vergleich zur gesunden Kontrolle mehr LT-HSZ aufwiesen. Dieser Unterschied war vor allem durch die Gruppe der, als B-Zelllymphom Subpopulation, klassifizierten DR4 – Tumormäuse bedingt. Bei anderen Tumorentitäten war diese nicht nachweisbar. Auch zeigten gesunde DR4-Mäuse im Vergleich zu den BL6-Kontrollmäusen eine erhöhte Frequenz an LT-HSZ (Abb. 20).

4.6.3. Messung der miRNA-Expression im Knochenmark

Nach Isolierung der Total-RNA, in der die miRNA enthalten waren, erfolgte die Messung der miRNA Expression mit dem neu etablierten Luminex-Testansatz.

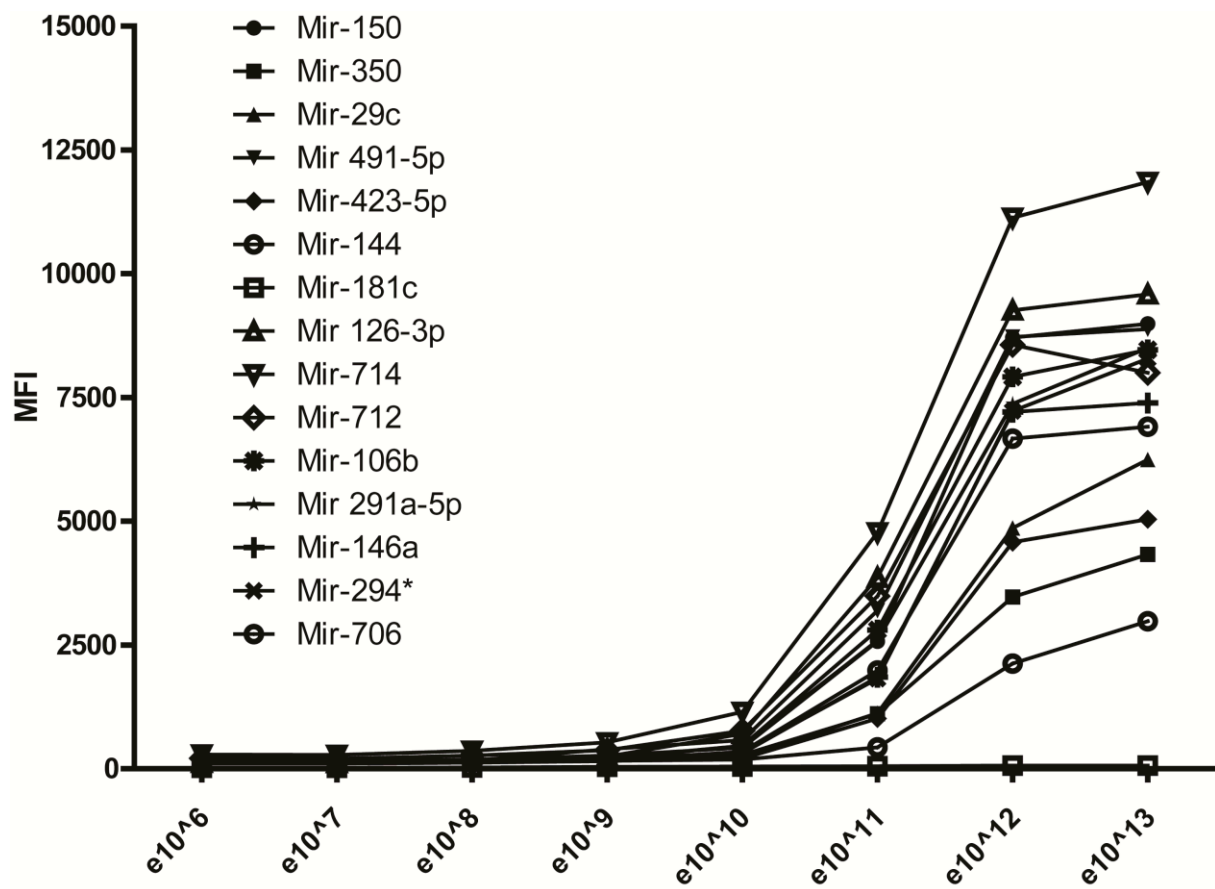


Abb. 21. Standardkurve Luminex-Versuch: Expression der miRNA im Knochenmark

y-Achse: MFI (Mediane Fluoreszenz Intensität), x-Achse: Verdünnungsreihe der artifiziellen miRNAs

Die Ergebnisse der Messung blieben hierbei leider unter dem Background. Es konnten keine relevanten Daten zur miRNA-Expression in den verschiedenen Subtypen generiert werden. Nachdem der Versuchsansatz funktionierte, wie das Expressionmuster der verwendeten artifiziellen Standard miRNA anzeigte (Abb. 21), muss von Gründen ausgegangen werden, die die Messung der miRNAs behindert hatten. Diese werden in der Diskussion unter Punkt 5.4. besprochen.

4.7. Untersuchung von Serumproben

Nachdem miRNA im Serum von Menschen und Mäusen nachgewiesen werden konnten und diese als potentielle diagnostische Marker für Tumorerkrankungen hämatologischer Erkrankungen deklariert wurden (Chen X et al. 2008, Fang et al. 2012), sollte mit dem Serum von 10 Tumormäusen, vier tumorfreien Kontrollmäusen und vier BL6-Kontrollmäusen der Versuch etabliert werden, miRNA mittels der Luminex-Methode zu detektieren und gegebenenfalls ein Unterschied in der Expressionshöhe nachgewiesen werden.

Die Gewinnung der Serumproben fand nach einem standardisierten Schema statt. Mittels einer Hohlkanüle wurde das Herz der Mäuse nach Abtötung mittels CO₂ punktiert. Das hierdurch gewonnene Blut wurde durch Zentrifugation in die Phasen Serum und korpuskulare Elemente aufgeteilt. Die Isolierung der RNA/miRNA aus dem Serum, (im Durchschnitt konnten ca. 1,0 ml murines Serum gewonnen werden) wurde mit Trizol LS Reagent durchgeführt. Bei der anschließenden Messung der miRNA-Expression lagen die detektierten Werte jedoch auch hier unter dem Hintergrundwert, so dass letztendlich keine Aussage über die Expression der miRNA im Serum getroffen werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass das vorliegende System zur miRNA-Messung nicht sensitiv genug ist, um diese in Serumproben zu messen.

4.8. Untersuchung von Splenproben

Zwei verschiedene Milzprobengruppen lagen zur Untersuchung vor. Zum einen Proben, die durch die aktuelle Zucht gewonnen wurden. Hierbei wurden den makroskopisch auffälligen Mäusen Milzproben entnommen und für die miRNA-Messung vorbereitet. Zudem lagen noch Milzproben aus einer früheren Zucht vor. Bei diesen Proben wurde die genaue

Tumorentität durch pathologische Untersuchungen festgestellt. Unter 4.8.1 werden die Ergebnisse der aktuellen Zucht dargestellt, folgend unter 4.8.2 die Ergebnisse der früheren Zucht.

4.8.1. Auswertung Tumorproben der aktuellen Zucht

Die miRNA Expression in der Milz wurde ebenfalls mit der xMAP™-Technologie von Luminex gemessen. Hierbei wurden sieben BL6-Mäuse, sechs gesunde und 25 erkrankte DR4-Mäuse untersucht. Die Isolierung wurde mit Tizol Reagent der Firma Sigma nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt (Mraz et al. 2009). Vorangehend wurden die Proben durch die, in Punkt 4.3. beschriebenen, Methoden klassifiziert. Die Auswertung der Expressionsmessung ergab hierbei folgende Ergebnisse:

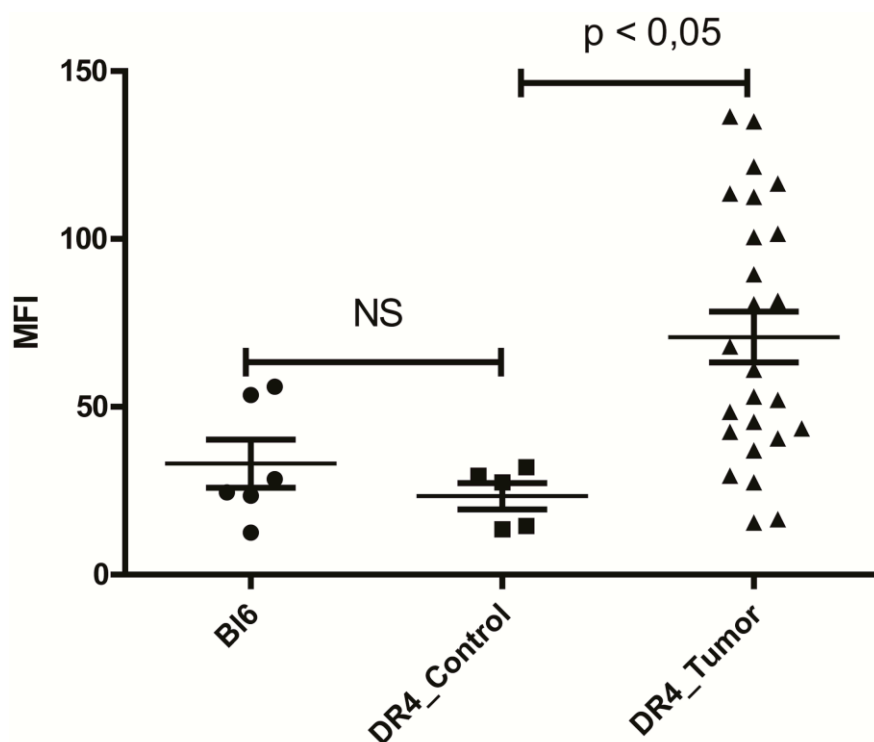


Abb. 22. MiRNA-714-Expression in der Splen

y-Achse: MFI (Mediane Fluoreszenz Intensität), x-Achse: BL6, DR4-Kontrollen und DR4-Tumormäuse, Statistische Untersuchung mittels Kruskal-Wallis-Test.

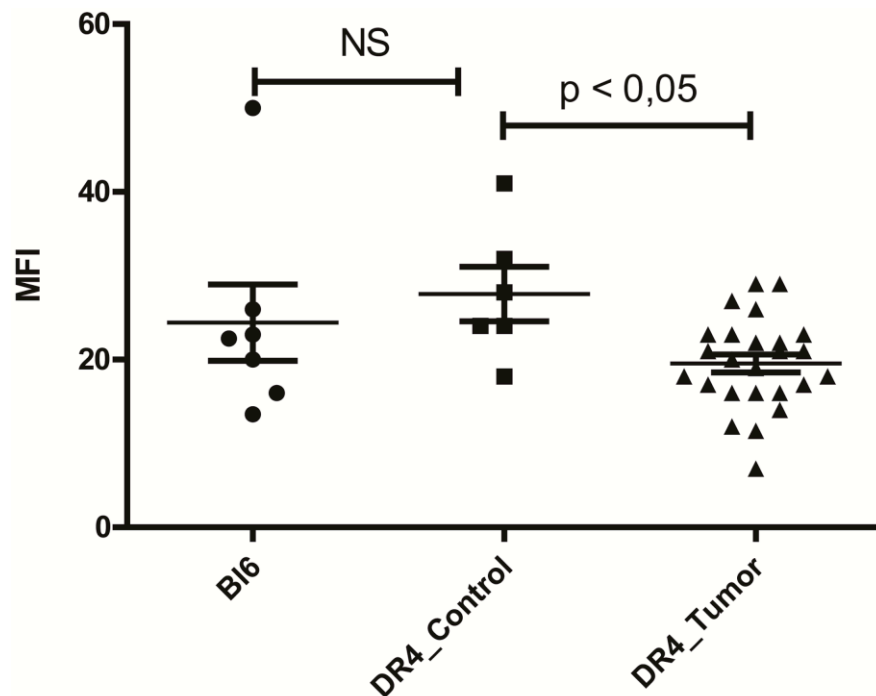


Abb. 23. MiRNA-423-5p-Expression in der Splen

y-Achse: MFI (Mediane Fluoreszenz Intensität), x-Achse: BL6, DR4-Kontrollen und DR4-Tumormäuse, Statistische Untersuchung mittels Kruskal-Wallis-Test.

Die Expression der miRNA-714 und miRNA-423-5p zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der gesunden DR4-Mäuse im Vergleich zu den erkrankten Tumormäusen.

miRNA-714 war hierbei in DR4-Tumormäusen im Vergleich zu gesunden DR4-Kontrollmäusen überexprimiert ($p < 0,05$). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen DR4-Tumormäusen und BL6-Kontrollmäusen war nicht darstellbar (Abb. 22).

MiRNA-423-5P war im Vergleich DR4-Tumormäusen zu gesunden DR4-Kontrollmäusen unterexprimiert ($p < 0,05$). Auch hier war kein signifikanter Unterschied zu BL6-Kontrollmäusen darstellbar (Abb. 23).

Die statistische Auswertung erfolgte in beiden Fällen mit dem Kruskal-Wallis-Test. Weitere getestete miRNA Kandidaten brachten kein signifikantes Ergebnis zum Vorschein.

Als nächster Schritt erfolgte die Einteilung der Tumorproben in verschiedene Untergruppen, abhängig von der Entität der Tumoren, die sich nach Analyse mittels der in Punkt 4.3. verwendeten Methoden ergaben. Vier unterschiedliche Tumorgruppen wurden definiert:

- T-Zelllymphome,
- B-Zelllymphome,
- Composite Tumoren
- Tumoren unklarer Entität.

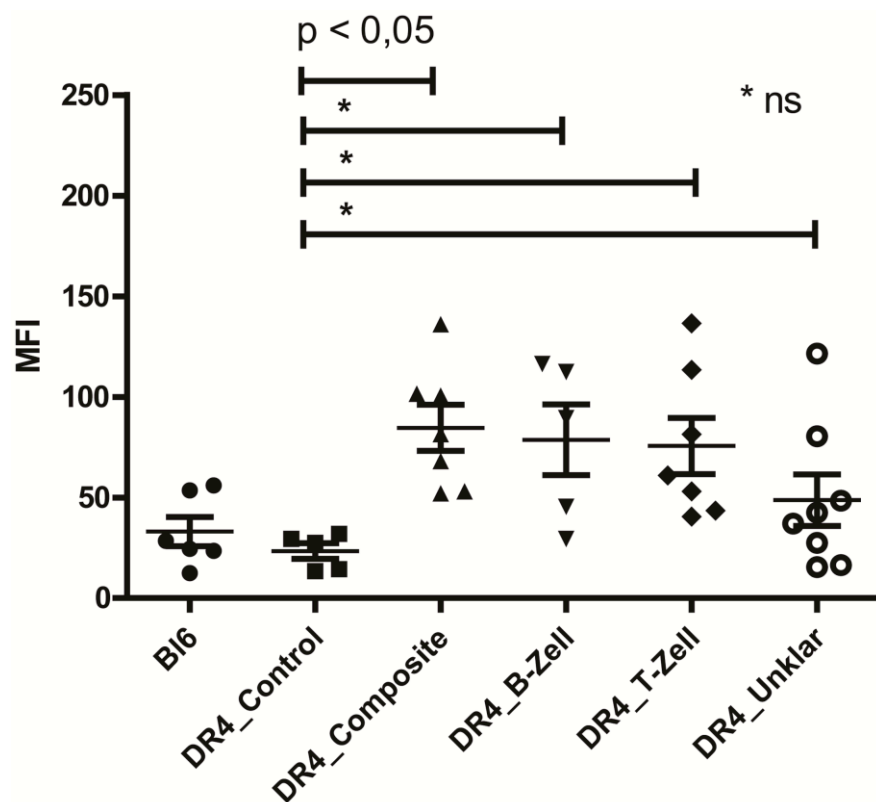


Abb. 24. miRNA-714-Expression in den definierten Untergruppen

miRNA-714-Expression in der Spleen, statistische Untersuchung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die y-Achse gibt die MFI = Median Fluoreszenz Intensität an.

Es konnte bei miRNA-714 nach statistischer Auswertung mit dem Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den gesunden DR4 Mäusen und der Composite Gruppe dargestellt werden. In den weiteren Untergruppen war kein signifikanter Unterschied erkennbar (Abb. 24). Auch verblieb die Überprüfung weiterer miRNA-Kandidaten ohne signifikantes Ergebnis.

4.8.2. Auswertung pathologisch klassifizierter Proben

Aus früheren Untersuchungen von Frau S. Raffeggerst lagen Milzproben vor, deren Tumorentität durch die Pathologie in Neuherberg bestimmt wurde. Insgesamt 64 Tumorproben wurden untersucht. 16 gesunde DR4-Kontrollen lagen zum Vergleich vor. In diesen Proben fand keine Isolierung der RNA mittels TriZol statt. Die Isolierung der Gesamt RNA/miRNA erfolgte vor Erstellung dieser Arbeit nach Protokoll mit dem RNAeasy MiniKit von Qiagen. Anschließend waren die Proben bei -80°C eingefroren.

Im ersten Schritt wurde mittels des nicht parametrischen Mann – Whitney-Test untersucht, ob ein statistisch signifikanter Unterschied in der miRNA-Expression zwischen allen Tumorproben, unabhängig von der Entität des Tumors und der Kontrollprobe vorliegt (Abb. 25, Abb. 26). Hierbei ergaben sich für zwei der getesteten miRNAs signifikante Unterschiede. Bei miRNA-712 liegt eine Überexpression in den getesteten Tumorproben im Vergleich zu den Kontrollen vor ($p = 0,016$). Das gleiche Ergebnis konnte auch für miRNA-714 beobachtet werden. Hier liegt ebenfalls eine Überexpression in den Tumorproben im Vergleich zu den Kontrollproben vor ($p = 0,0024$).

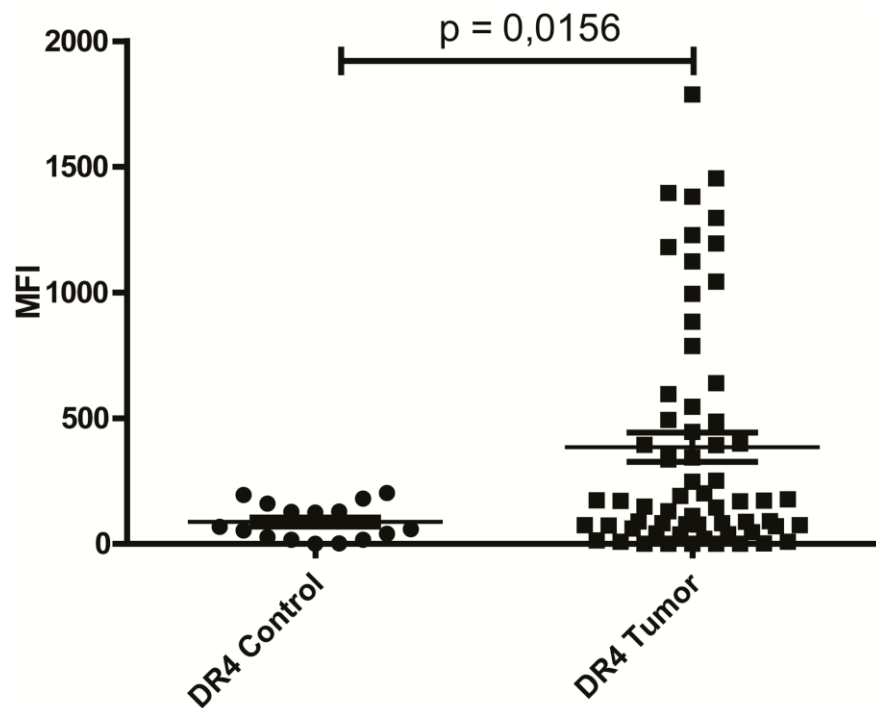


Abb. 25. miRNA-712-Expression in pathologisch klassifizierten Proben

miRNA-712-Expression in der Splen, statistische Untersuchung Mittels Mann – Whitney-Test, $p=0,0156$, n (Tumorproben) = 64, n (Kontrollen) = 16 . MFI = Median Fluoreszenz Intensität.

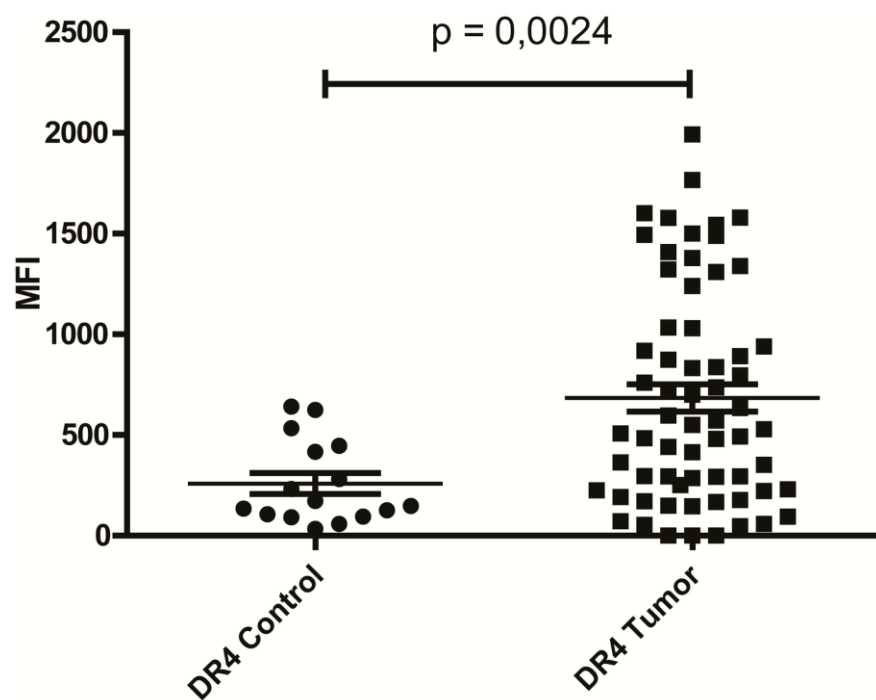
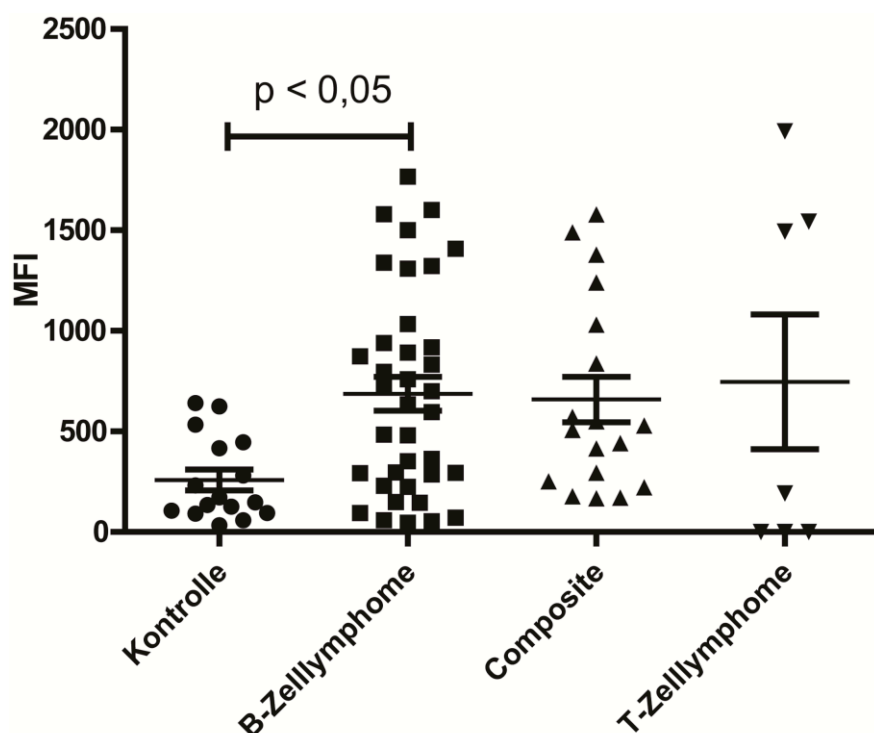


Abb. 26. miRNA-714 Expression in pathologisch klassifizierten Proben

miRNA-714 Expression in der Spleen, statistische Untersuchung Mittels Mann – Whitney-Test, $p=0,0024$, n (Tumorproben) = 64, n (Kontrollen) = 16 . MFI = Median Fluoreszenz Intensität

Anschließend wurden Tumorproben in ihre drei Untergruppen eingeteilt: T-Zelllymphome (7 Proben), B-Zelllymphome (37 Proben) und Composite Tumoren (18 Proben). Als Kontrolle dienten Proben von gesunden DR4-Mäusen (16 Proben).

Die Auswertung ergab bei miRNA-714 einen statistisch signifikanten Unterschied der Expression zwischen der Gruppe der B-Zelllymphome und der DR4-Kontrollgruppe (Abb.27). Die Auswertung erfolgte hier mittels des Kruskal-Wallis- Tests. MiRNA-712 zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede.

**Abb. 27. miRNA-714-Expression in pathologisch klassifizierten Spleenproben**

miRNA-714-Expression in der Spleen, statistische Untersuchung mittels Kruskal-Wallis-Test. MFI = Median Fluoreszenz Intensität

Zusammenfassend konnte für die Untersuchung der miRNA-Expression der Spleen beider Probengruppen festgestellt werden, dass miRNA-714 sowohl in der aktuell vorliegenden Zucht, als auch in den pathologisch klassifizierten Proben im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant überexprimiert war. Insbesondere in den, als B-Zelllymphomen diagnostizierten Tumoren, fiel der Unterschied als signifikant auf. Weiter auffällige miRNA Kandidaten waren miRNA-712 und miRNA-423-5p.

MiRNA-712 war statistisch signifikant überexprimiert in den pathologisch klassifizierten Tumorproben im Vergleich zu den gesunden DR4 Kontrollmäusen. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Tumorentitäten war nicht zu detektieren.

MiRNA-423-5p zeigte eine statistisch signifikante Unterexpression in den Tumorproben der aktuellen Zucht. Dieses Ergebnis konnte nicht in den pathologisch klassifizierten Proben wiederholt werden. In der Übersicht stellen sich die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs wie folgt dar:

- miRNA-714 war im Vergleich zu den DR4 Kontrollmäusen in beiden untersuchten Gruppen in den Tumorproben überexprimiert.
- miRNA-714 war hierbei in den Proben der aktuellen Zucht besonders auffällig in der Untergruppe der Composite Tumoren überexprimiert, in der Gruppe der pathologisch klassifizierten Mäuse traf dies auf Untergruppe der B-Zelllymphome zu.
- miRNA-423-5p war in der Gruppe der aktuellen Zucht unterexprimiert in den Tumorprobe im Vergleich zu DR4 Kontrollmäuse. In den Untergruppen war dieser Effekt nicht nachweisbar.

- miRNA-712 war in der Gruppe der pathologisch klassifizierten Tumorproben überexprimiert im Vergleich Tumorprobe gegen DR4 Kontrollmäuse. In den Untergruppen war dieser Effekt ebenfalls nicht nachweisbar.

4.9. Mögliche Zielgene von miRNA-714

MiRNA-714 war in beiden Gruppen nachweisbar, sowohl in den Milzproben aus der aktuellen Zucht, als auch in den pathologisch klassifizierten Milzproben. Deswegen sollte dessen Einfluss auf die Genexpression untersucht werden.

Mittels der Datenbank *www.Targetscan.org Release 6.2* (Abgerufen 08.04.2013) wurden die post-transkriptionel regulierten Gene detektiert, die von miRNA-714 reguliert werden. Wie eingangs beschrieben, erfolgt die Genregulierung durch miRNA dadurch, indem die, im RISC Komplex gebundene miRNA, an die 6-8 nt große 3' untranslatierte Region (3'UTR) der Ziel mRNA binden (Abb. 28 / Punkt 1.2).

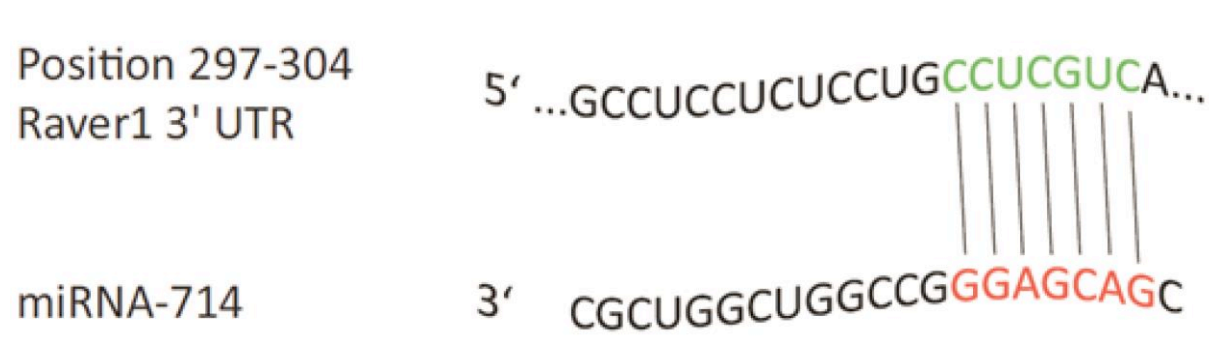


Abb. 28. MiRNA-714 mit Überlappungsbereich an Raver1

Beispielhafte Darstellung der Überlappung der Zielstruktur von miRNA-714 und der mRNA von Raver1 durch Targetscan 6.2.

Durch einen Algorithmus wird der sogenannte *Total context+score* berechnet. Dabei ergibt der niedrigste *Total context+score* Wert die bevorzugte Zielstruktur der miRNA an. (Garcia et

al. 2011, Grimson et al. 2007, Lewis et al. 2005) Bei miRNA-714 konnten so sechs relevante Zielgene detektiert werden (siehe Tabelle 2).

Zielgen	Zielgenname	Total context+score
<i>Raver1</i>	ribonucleoprotein, PTB-binding 1	-0.38
<i>Leng8</i>	leukocyte receptor cluster member 8	-0.21
<i>Pdgfb</i>	platelet derived growth factor, B polypeptide	-0.21
<i>Rnf165</i>	ring finger protein 165	-0.19
<i>Camk2b</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	-0.18
<i>Rasl10b</i>	RAS-like, family 10, member B	-0.07

Tabelle 2. Zielgene miRNA-714 nach Targetscan 6.2

Relevante Zielgene in der Maus von miRNA-714, welche durch Targetscan 6.2 detektiert wurden. Der niedrigste *Total context+ score* Wert gibt hierbei die bevorzugte Zielstruktur der miRNA an.

Nachdem die Zielgene feststanden, wurden spezifische Primer hergestellt, um in einer quantitativen RT-PCR die Expressionsunterschiede zwischen DR4-Tumormäusen, gesunden DR4-Kontrollmäusen und BL6-Kontrollmäusen zu untersuchen. Nach folgendem Schema wurde vorgegangen:

1. NCBI – Nucleotides

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> (Abgerufen 20.5.2013)

Sequenz der Zielstruktur wird hier festgestellt.

2. Primerblast:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd

(Abgerufen 20.5.2013)

Synthese des spezifischen Primers.

3. In Silico Überprüfung

[http://genome.ucsc.edu/cgi-](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?wp_target=&db=mm9&org=Mouse&wp_f=%09AACCCAATGCCAGCTCCTGT)

[bin/hgPcr?wp_target=&db=mm9&org=Mouse&wp_f=%09AACCCAATGCCAGCTCCTGT](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?wp_target=&db=mm9&org=Mouse&wp_f=%09AACCCAATGCCAGCTCCTGT)
[AAC&wp_r=%09TGGGCCACAAGTGCTCTCATGC&wp_size=4000&wp_perfect=15&wp_](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?wp_target=&db=mm9&org=Mouse&wp_f=%09AACCCAATGCCAGCTCCTGT)
[good=15&wp_showPage=true&hgside=209109907](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?wp_target=&db=mm9&org=Mouse&wp_f=%09AACCCAATGCCAGCTCCTGT) (Abgerufen 20.5.2013)

Hiermit erfolgte die Überprüfung, ob die Primer ein oder mehrere Produkte in der quantitativen RT-PCR generierten.

Anschließend wurde die Genexpression mittels quantitativer RT-PCR am LightCycler480 durchgeführt. Für den vorliegenden Versuch wurden Proben von dreizehn DR4 Tumormäusen (sieben B-Zelllymphome, drei T-Zelllymphome und drei Composite Tumoren) zwei DR4-Kontrollmäusen und zwei BL6-Kontrollmäusen verwendet, bei denen nach Standardprotokoll RNA und cDNA gewonnen wurde. Als Kontrolle und zur Normalisierung wurde für jede Probe die Expression des Haushaltsgen 18S rRNA quantifiziert. In den verwendeten Proben war miRNA-714 besonders stark überexprimiert, was sich durch einen höheren MFI-Wert in der Luminex xMap Messung im Vergleich zur jeweiligen Untergruppe darstellte.

- B-Zelllymphome: MFI-Mittelwert aller Proben = 687, MFI-Mittelwert der hier getesteten Proben = 1250.

- T-Zelllymphome: MFI-Mittelwert aller Proben = 707, MFI-Mittelwert der hier getesteten Proben = 1677.
- Composite Tumoren: MFI-Mittelwert aller Proben = 657, MFI-Mittelwert der hier getesteten Proben = 1482

Dadurch sollte ein möglicher Effekt der miRNA-714-Überexpression auf die Genexpression bei optimalen Bedingungen genutzt werden.

Zur Quantifizierung des Genprodukts wurde der interkalierende (in die doppelsträngige DNA einlagernde) Farbstoff SYBR Green verwendet. Je höher die Quantität des Genprodukts ausfällt, desto höher ist der Prozentsatz des interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffs. Durch Messung der Fluoreszenz kann so Rückschluss auf die Quantität des Genprodukts gezogen werden. Nachdem es das Ziel war, die Quantität von cDNA in mehreren Proben untereinander zu vergleichen, wurde ein Fluoreszenzwert festgelegt, die sogenannte Kreuzungslinie, die den linear-logarithmischen Bereich der Kurve schneidet. Der Kreuzungspunkt (CP) gibt die Zyklenzahl an, bei der die Fluoreszenz der Amplifikation diesen Wert erreicht. Eine niedrige Zyklenzahl korreliert so mit einer hohen Quantität in der Proben-cDNA (Raffegerst 2007).

Vor Auswertung wurden die gewonnen Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 29) und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Zeigten sich dabei mehr als ein PCR-Produkt je Probe, so mussten diese aus der Analyse ausgeschlossen werden, da diese eine Generierung des CP-Werts nicht zuließen und so einer Vergleichbarkeit der Proben untereinander im Wege standen.

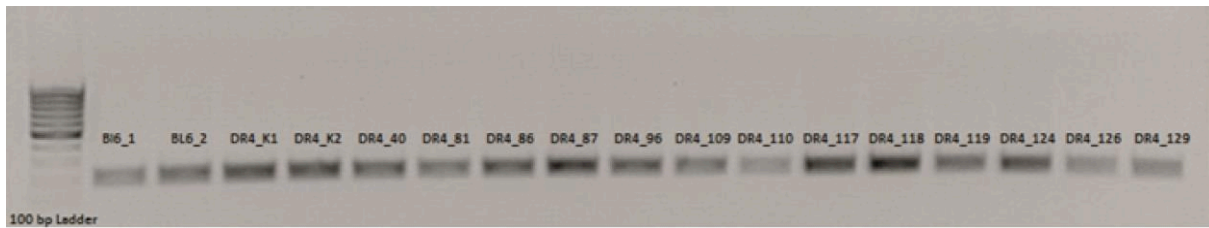


Abb. 29. Gelelektrophorese Leng8

Beispielhaft wird hier die, nach erfolgter quantitativer RT-PCR Gelelektrophorese von *Leng8* aufgezeigt. Als Referenz wurde eine 100 bp Ladder verwendet. Bei jeder Probe entstand ein einzelnes PCR Produkt, so dass dieser PCR-Lauf ausgewertet werden kann.

In die Analyse aufgenommen wurden *Raver1*, *Leng8* und *Pdgfb*. Diese wiesen einen *Total context + score* von -0.38, -0.21 und -0.21 auf und zählen so zu den drei wahrscheinlichsten Zielgenen von miRNA-714.

Die Auswertung erfolgte mittels der Light-CyclerSoftware-v.4.05. Hier wurde die Kreuzungslinie definiert und so die CP-Werte generiert. Anschließend erfolgte die Normalisierung der CP-Werte mit dem Haushaltsgen 18S rRNA. Die Proben wurden mit den Kontrollen verglichen und der Unterschied als x-fache Expression, ein negatives Vorzeichen bezeichnet eine Unterexpression, ein positives Vorzeichen bezeichnet eine Überexpression dargestellt. Nach Normalisierung der gewonnen Rohdaten wurde bei den DR4-Tumormäusen die Mittelwerte aus zwei konsekutiven Messungen (Dupletten) gebildet. Bei den Kontrollproben wurden die Mittelwerte von vier normalisierten Werten aus zwei aufeinanderfolgende Messungen (Dupletten) gewonnen.

4.9.1. Ribonucleoprotein PTB-binding 1 (*Raver1*)

Raver1, das ubiquitär exprimiert wird, wurde bisher als Koaktivator der MDA5-vermittelten zellulären Immunantwort gegen Viren und als relevantes Protein in der Muskeldifferenzierung durch Interaktion mit dem *polypyrimidine tract-binding protein* (PTB)

beschrieben (Chen H et al. 2013, Joshi et al. 2011, Spellman et al. 2005). Ein Zusammenhang mit der Entwicklung von Lymphomen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

In der vorliegenden Untersuchung ist *Raver1* in Tumorproben besonders in T-Zelllymphomen im Vergleich zu gesunden DR4 Proben (im Durchschnitt) überexprimiert: 9,07-fache Überexpression in T-Zelllymphomen (Standardabweichung, $SD \pm 9,1$) , 2,9-fache in B-Zelllymphomen ($SD \pm 2,08$) bzw. 2,2-fache Überexpression Composite Tumoren.

Als entscheidend war zu betrachten, dass es keine Korrelation zwischen miRNA-714 und *Raver1* in den Tumorproben gab. Nach der Eingangstheorie müsste ein hoher MFI-Wert (gleichbedeutend mit einer hohen Expressionsstärke von miRNA-714 im Tumorgewebe) mit einer Unterexpression von *Raver1* im Tumorgewebe einhergehen. Dies konnte für den betreffenden Versuch nicht dargestellt werden (Abb. 31).

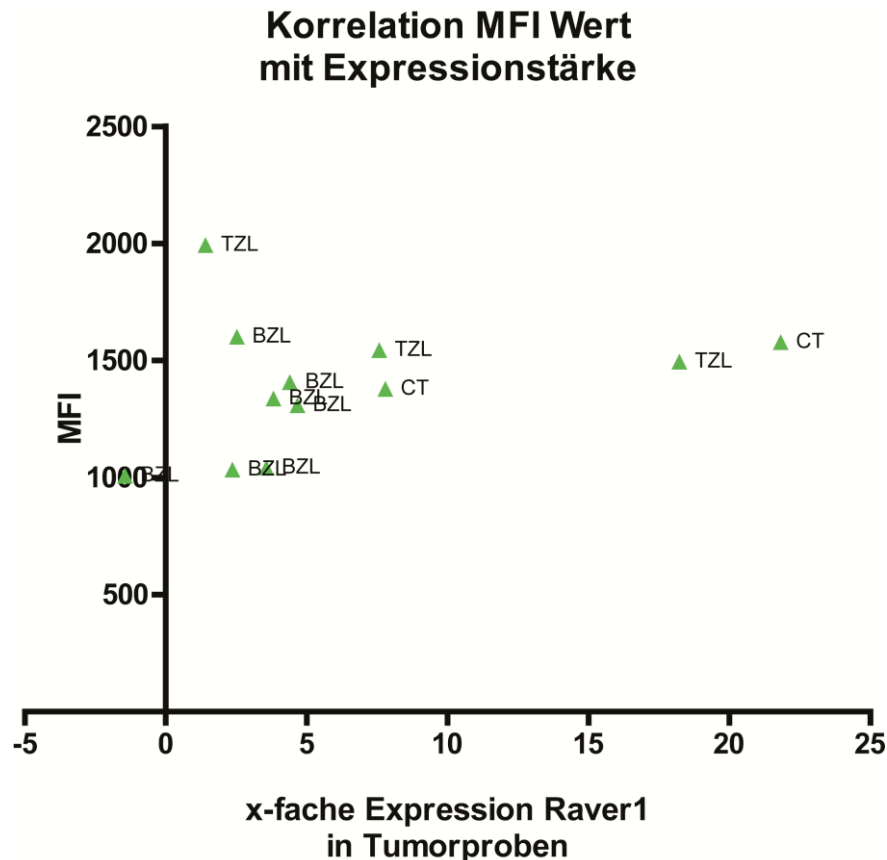


Abb. 30. Korrelation MFI-Signalstärke und Ergebnisse der quantitativen RT-PCR bei *Raver1*

y-Achse: Mediane Fluoreszenz Intensität, x-Achse: x-fache Expression von *Raver1* im Vergleich Tumorprobe zu gesunder DR4 Kontrollmaus. Dargestellt ist die Korrelation zwischen MFI-Wert, dessen Höhe die Expressionsstärke von miRNA-714 im Tumor anzeigt und der Expressionsstärke von *Raver1* im Tumorgewebe. TZ = T-Zelllymphom, BZL = B-Zelllymphom, CT = Composite Tumor

4.9.2. Platelet derived growth factor B (*PDGFB*)

PDGFB induziert Zellwachstum, Wundheilung, kann zur Tumorangiogenese beitragen und es wurde beschrieben, dass *PDGFB* die Expression und Funktion von miRNA in verschiedenen Tumorgeweben beeinflussen kann, wie beispielsweise von miRNA-21 (Costa et al. 2012, Chan et al. 2010, Greenhalgh et al. 1990, Yao et al. 1995, Shao et al. 2011, Xue et al. 2011).

In der vorliegenden Untersuchung war *PDGFB* einzig in B-Zelllymphomen im Vergleich zu gesunden DR-Kontrollmäusen 4,4-fach überexprimiert ($SD \pm 26,3$), in T-Zelllymphomen -

4,93-fach unterexprimiert ($SD \pm 13,4$) und Composite Tumoren -0,95-fach ($SD \pm 11,5$) unterexprimiert.

Bei der Korrelation zwischen dem MFI-Wert und der Expressionsstärke von *PDGFB* konnte ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang mittels der Statistiksoftware GraphPad Prism5 dargestellt werden.

4.9.3. Leukocyte receptor cluster member 8 (*LENG8*)

Über das, auf Chromosom 15 lokalisierte, leukocyte receptor cluster member 8 (*LENG8*) Gen ist in der Literatur bisher wenig beschrieben. Lediglich der Nachweis auf Proteinebene liegt bis dato vor (Carninci et al. 2005).

In T-Zelltumoren, sowie in Composite Tumoren lag nur eine geringe Überexpression im Vergleich zur gesunden DR4- vor; T-Zelltumor 0,44-fach ($SD \pm 2,3$), Composite Tumor 0,64-fach ($SD \pm 4,2$). In B-Zelltumoren lag eine 2,3-fache Überexpression ($SD \pm 2,5$) im Vergleich zur gesunden Kontrolle vor. Hier konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen dem MFI-Wert und der Genexpression von *Leng8* mittels der Statistiksoftware GraphPad Prism5 dargestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt zeichnete sich jedoch bei jedem der drei getesteten Gene ein sehr heterogenes Expressionsmuster ab. Innerhalb einzelner Tumorentitäten liegt eine große Heterogenität vor, was sich allein aus dem Wert der Standardabweichung schließen lässt, so dass letztendlich kein Rückschluss auf die Regulierung der genannten Gene durch miRNA – 714 gezogen werden kann (Tabellarische Darstellung der Ergebnisse siehe Anhang, Punkt 7.5)

5. Diskussion

5.1. Grundlegende Überlegungen zum Mausmodell

Die „Two-Hits“ beziehungsweise „Multiple-Hits“ – Theorien, basierend auf Überlegungen von Alfred Knudson aus dem Jahr 1971, schafften die Grundlage für das moderne Verständnis von Tumorerkrankungen (Knudson 1971). Die Entstehung von malignen Tumorerkrankungen wird als mehrstufiger Prozess verstanden. Am Beispiel der Entwicklung eines hochmalignen diffusen großzelligen B-Zelllymphom aus einem niedrigmalignen folliculären B-Zelllymphom heraus, kann dieser Prozess anhand der stufenweise aberranten Genexpression nachvollzogen werden. Ebenfalls ist dieser Prozess assoziiert mit einer Veränderung des miRNA-Expressionsmusters (Lawrie et al. 2009, Martinez-Climent et al. 2003).

Übertragen auf das vorliegende Mausmodell kann die Einbringung des Transgens als Basis für die Entwicklung der Tumorerkrankung gesehen werden, die in der hämatopoetischen Blutzellkaskade ihren Ursprung hat. Erster auffälliger Befund der Langzeituntersuchung des DR4-Mausstammes war, dass nur ca. 70 % aller Mäuse im Untersuchungszeitraum erkrankten. Aus dieser Tatsache ließ sich folgern, dass ein primär tumorwirksamer Einfluss durch das eingebrachte Transgen allein nicht ausschlaggebend für die Entwicklung der Tumoren war. In diesem Fall wäre von einer höheren Tumorfrequenz auszugehen. Weitere Effekte mussten vorliegen, um auch die ausbleibende Tumorentstehung bei 30 % Langzeitüberleber zu erklären. Direkte Implikationen, die die Integration des Transgens verursachten, sei es zum Beispiel als Onkogen, waren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, sind jedoch denkbar. In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich, dass die F1 DR4-Generation, welche im Gegensatz zur homozygoten Elterntiergeneration, heterozygot auf

das betreffende Transgen war, weniger Tumoren entwickelten. Bei einem Onkogeneffekt ist das Vorliegen eines funktionsfähigen Allels ausreichend. Bei einem Tumorsuppressoreffekt müssten beide Allele betroffen sein. Aus dieser Beobachtung konnte also geschlossen werden, dass im DR4- Mausmodell von einem bisher ungeklärten Onkogeneffekt auszugehen war. Durch Untersuchung der miRNA Expression sollten Rückschlüsse auf die Tumorgenese gezogen werden. Ebenfalls erfolgte die Untersuchung der Hämatopoese im Vergleich zwischen erkrankter und gesunder DR4-Maus. Hier sollte geklärt werden, ob in der frühen Phase der Blutzellkaskade bereits ein abnormes Proliferationsverhalten der Zellen erkennbar ist.

5.2. Langzeitbeobachtung des Mausmodells

Am Anfang des Projekts stand die Langzeitbeobachtung der Tiere die zeigte, dass männliche und weibliche Tiere eine ähnlich hohe Erkrankungsfrequenz (70% zu 64%) aufweisen. Die Tumorerkrankung wurde bei weiblichen Tieren im Durchschnitt 26 Tage früher morphologisch auffällig. Dies resultiert wahrscheinlich aus dem geringen Gewicht gesunder weiblicher DR4-Tiere. So wird eine Umfangszunahme des Abdomens, das entscheidende Kriterium für eine Sektio, früher erkennbar, als bei männlichen Tieren. Auch wurde in weiteren Untersuchungen, wie der Messung der miRNA Expression, kein geschlechtsspezifischer Unterschied detektiert, so dass beide Geschlechter dieses Mausstamms für weitere Untersuchungen als geschlossene Gruppe betrachtet wurden.

Die Latenzzeit der Tumore war beachtlich. Im Durchschnitt entwickelten sich die Tumoren nach 434 Tagen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Tumorgenese im Sinne einer progressiven Anhäufung von tumorwirksamen Ereignissen in diesem Zeitraum von stattenging. Wenn das betroffene Tier erkrankte, war die Tumorprogression dramatisch rapide und

zwischen ersten Auffälligkeiten und Tod der betroffenen Tiere verblieben oft nur wenige Tage Zeit für die Durchführung der Sektion. Waren also in ausreichendem Maße tumorfördernde Ereignisse eingetreten, so kam es zu einem raschen Ausbruch der Erkrankung. Möglicherweise entwickelte sich aus einer niedrig malignen Grunderkrankung, die nicht morphologisch sichtbar war, ein hochmalignes Tumorleiden.

5.3. Ergebnisse der T-Zellrezeptoranalyse und IgH – Analyse

Durch die Ergebnisse der T-Zell-Rezeptoranalyse und IgH – Analyse konnte nachgewiesen werden, dass das Mausmodell unterschiedlichste hämatopoetische Tumoren zum Vorschein brachte. 30 % der untersuchten Proben wurden als T-Zelllymphom, 22,5 % als B-Zelllymphom und 17,5 % als Composite Tumoren klassifiziert. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, erfolgte die Untersuchung auf mRNA-Ebene. Bei humanen Lymphomen ist die Klassifikation von Lymphomen/Leukämien als langwieriger Entwicklungsprozess zu verstehen. So basieren Klassifikation auf zytomorphologischen, genetischen und immunhistochemischen Untersuchungen, wie in der, inzwischen überholten, Kiel Klassifikation und in der Luke- und Collins-Klassifikation verwirklicht (Gerard-Marchant et al. 1974, Jaffe et al. 2009, Lennert et al. 1992, Lukes et al. 1974, Rappaport et al. 1966). In dem Fall der vorliegenden Studie wurde nicht auf solche Möglichkeiten der Klassifikation zurückgegriffen, sondern eine vereinfachte und praktikablere Form der Klassifikation eingeführt, die auf der Lymphozytenrezeptoranalyse beruhte. Die gewonnen Daten korrelierten mit Untersuchungen, die an dem gleichen Mausstamm durch ausgeweitete Untersuchungen gewonnen wurden (Raffegerst et al. 2007). Interessant war die Beobachtung, dass der überwiegende Teil der klassifizierten T-Zelltumore monoklonal bzw. biklonal war. Ein, in der frühen Hämatopoese vorliegender, tumorauslösender Effekt hätte

eher die Entwicklung polyklonaler Tumore begünstigen. So konnte gefolgert werden, dass der, letztendlich zur Tumorentstehung führende, zweite, oder dritte Effekt, erst in der späteren Phase der Hämatopoese eintrat. Jedoch war unklar in welcher Phase der Kaskade dieser Schritt auftritt. Hier stellen miRNA ein interessantes Werkzeug zur Diagnostik dar. Sie sind bei der Regulation der Hämatopoese entscheidend beteiligt (Bissels et al. 2012, Buza – Vidas et al. 2012, Chen et al. 2004). Durch Vergleich von Zellpopulationen unterschiedlicher Stufen der Hämatopoese sollte versucht werden, diese Verschiebung vom Benigen hin zum Malignen nachzuvollziehen.

5.4. Untersuchung der miRNA Expression

Um einen ersten Einblick in das Expressionsmuster der miRNA zu gewinnen, wurde ein Array angefertigt und Expressionsunterschiede zwischen erkrankten und gesunden DR4- Mäusen untersucht. Um die Aussagekraft dieser Untersuchung zu validieren, wurden 15 miRNA Kandidaten mit Luminex Systems an einer bedeutend größeren Gruppe getestet.

Zur Analyse wurden folgende miRNA Kandidaten ausgewählt: miRNA-150, miRNA-350, miRNA-29c, miRNA-491-5p, miRNA-423-5p, miRNA-144, miRNA-181c, miRNA-706, miRNA-126-3p, miRNA-714, miRNA-712, miRNA-106b, miRNA-291a-5p, miRNA-146a und miRNA-294*.

Am niedrigsten im Tumor im Vergleich zur gesunden Kontrolle herabreguliert zeigten sich hierbei miRNA-150 (ReRatio-Werte von 0,07). MiRNA-150 nimmt durch die Kontrolle des Transkriptionsfaktors *c-Myb* eine prominente Rolle in der Kontrolle der B-Zelldifferenzierung ein. Dessen Funktion als Tumorsuppressor in malignen Lymphomen wurde ebenfalls bereits beschrieben (Xiao et al. 2007, Watanabe et al. 2011). Die starke Herabregulierung in

Tumormäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen stellte eine interessante Beobachtung dar, die durch Validierung bestätigt werden sollte.

Als vorbereitender Schritt fand die Sortierung der Zellen nach dem Lineage-Marker-Cocktail und dem ckit-Marker statt. Zellen, die zur Population der Lin^{neg} , ckit^{pos} Fraktion gehören, sind Teil der noch undifferenzierten Vorläuferzellen im Knochenmark (Bryder et al. 2006, Weissman et al. 2008). Sie umfassen die sogenannten $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{Sca1}^{\text{pos}}\text{kit}^{\text{pos}}$ (LSK) Zellpopulationen, die entweder sich selbst erneuern, oder weiter ausdifferenzieren können und auch die Gruppe der multipotenten Vorläuferzellen, die proliferieren und ausdifferenzieren können, jedoch nicht mehr über die Fähigkeit der langfristigen Selbsterneuerung verfügen. Lin^{pos} , ckit^{neg} Zellen, die die zweite Fraktion der Sortierung darstellten, sind weiter ausdifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit der Proliferation und Differenzierung verloren haben. Durch Messung der miRNA Expression in beiden Fraktionen, sollte der Fragestellung nachgegangen werden, zu welchem Zeitpunkt der Hämatopoese eine Aberration zwischen erkrankter und gesunder Tumormaus vorlag, also der Effekt des zweiten Hits zum Tragen kam.

Wie erwartet war die Frequenz der Lin^{neg} , ckit^{pos} Zellen bei 19 sortierten Tumormäusen niedrig und betrug im Durchschnitt 0,83 %, was einer absoluten Zellzahl von durchschnittlich ≈ 420.000 Zellen pro Maus entsprach. Nach Isolierung und konsekutiver Messung der miRNA Expression blieben die Ergebnisse unterhalb der Detektionsschwelle, so dass letzten Endes die Validierung und vergleichende Untersuchung der miRNA Expressionsstärke im Knochenmark nicht möglich war.

Mehrere Gründe können hierfür ausschlaggebend gewesen sein:

Ein nicht funktionaler Testansatz erscheint unwahrscheinlich. Zur Kontrolle und Normalisierung wurden bei jeder Messung gleichzeitig auch artifizielle miRNA in abgestuften Konzentrationen mitgemessen (siehe Abb. 25). Wäre der Testansatz so nicht durchführbar gewesen, hätte auch keine Messung artifizieller miRNA stattfinden können.

Ein weiterer Punkt ist die niedrige absolute Zellzahl bei einem Teil der Proben. Nach Isolierung lagen im Durchschnitt 420.000 Zellen pro Probe vor. Teilweise lagen je Probe bedeutend weniger Zellen vor. Hinzu kommt, dass vor Isolierung der Zellen in Trizol diese erst aus dem Sortiermedium mittels Zentrifugation gewonnen werden mussten. Allein durch diesen Schritt war ein Verlust an Zellen zu erwarten, der bis zu 30 % betragen konnte (eigene Beobachtung). Bei einer geschätzten Anzahl von ~ 500 miRNA Typen pro Zelle könnte sich der Verlust an Zellen erheblich auf die Expressionsmessung ausgewirkt haben. (Liang et al. 2007, Ragan et al. 2011).

Ebenfalls war als problematisch anzusehen, dass der Sortierungsvorgang und die anschließenden Schritte bis hin zur miRNA Expressionsuntersuchung notwendigerweise einen langen Zeitraum beanspruchten. Zehn Stunden, vom Auftauen der Zellen, der weiteren Bearbeitung bis hin zur eigentlichen Messung mussten hierfür einkalkuliert werden. Die Proben wurden bei -80°C gelagert und bei den anschließenden Arbeitsschritten stets auf Eis gekühlt. Trotz Kühlung auf Eis konnte es in diesem Zeitraum zu einem Qualitätsverlust der Total-RNA kommen, was anschließende Messungen der miRNA Expression beeinträchtigte, bzw. zu einem Verlust der miRNA zur Folge hatte (Ibberson et al. 2009).

Eine weitere Möglichkeit war, dass es bei geringen Probengrößen durch die Isolierung mit Trizol zu einem selektiven Verlust an miRNA mit geringem Guanin/Cytosin-Anteil (GC)

kommen konnte (Kim et al. 2011, siehe *Letter to the Editor*). Die, von der Autorin aufgeführten miRNA miRNA-141, miRNA-29b, miRNA-21, miRNA-106b, miRNA-15a und miRNA-34a haben einen durchschnittlichen GC-Anteil von 44 %. Die in dieser Studie verifizierten miRNA haben einen durchschnittlichen GC-Anteil von 48,5 %. Einzelne miRNA, wie miRNA-714 mit einem GC-Gehalt von 80 % und miRNA-712 mit einem GC-Gehalt von 67 % lagen jedoch über dem Durchschnitt und blieben bei der Messung im Knochenmark ebenfalls unter der Detektionsschwelle. Es erscheint daher fraglich, dass die verwendete Isolierungsmethode alleine ausschlaggebend für die aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Messung war. Auch ist Trizol als Standardmethode zur Isolierung von Total-RNA für miRNA Expressionsuntersuchungen etabliert (Mraz et al. 2009).

Interessant war die Beobachtung, dass die Mediane Fluoreszenz Intensität (MFI), die die miRNA Quantität widerspiegelt, bei Milzproben um zwei Zehnerpotenzen höher lag, die mit dem RNeasy Mini-Kit von Qiagen isoliert wurden, im Vergleich zu Proben, bei denen Trizol verwendet wurde. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Isolierungsmethode von Qiagen in Verbindung mit dem Luminex xMap System besser funktionierte, als in Verbindung mit Trizol.

Aufgrund der geringen Probenquantität wurde für diesen Versuch das gesamte Material verwendet, was eine Wiederholung des Versuchs unmöglich machte. So kann letztendlich keine definitive Ursache über das Ausbleiben von Daten zur miRNA Expression im Knochenmark getroffen werden.

Das neu etablierte System wurde im Anschluss auf weitere Gewebeproben ausgeweitet. Einerseits sollte geklärt werden, weshalb die miRNA Messung im Knochenmark nicht funktionierte. Andererseits sollte durch Messung der miRNA Expression in sekundär-

lymphatischen Organen fortgesetzt werden und Unterschiede zwischen DR4-Tumormäusen und gesunden Kontrollen festgestellt werden. Hier zeigte sich bei Messung der miRNA Expression im Serum das gleiche Problem. Es ist davon auszugehen, dass in den Serumproben die Kopienzahl von miRNA zu niedrig war, um ihre Expressionsstärke messen zu können.

Bei Milzproben verlief die Messung erfolgreich. Zwei Probenkollektive wurden hierbei untersucht, bei denen mit zwei verschiedenen Isolierungsmethoden die Total-RNA gewonnen wurde. Es zeigte sich in der Gruppe der, mit Trizol isolierten Proben, eine Überexpression von miRNA-714. Am auffälligsten konnte dieser Effekt im Vergleich Composite Tumoren gegenüber gesunde DR4-Maus nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich, dass miRNA-423-5p unterexprimiert in den Tumorproben im Vergleich zu DR4-Kontrollmäusen war. Bei den Proben, die in vorangehenden Untersuchungen gewonnen und mit dem RNAeasy Mini-Kit von Qiagen isoliert wurden, zeigte sich eine signifikante Überexpression von miRNA-712 und ebenfalls von miRNA-714 in den Tumorproben. In der Untergruppe der B-Zelllymphome war miRNA-714 signifikant überexprimiert im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Das Vorkommen von miRNA-712 und miRNA-714 wurde 2006 in Mausembryonen erkannt (Mineno et al. 2006). Ihre Rolle in der lymphogenen Tumorgenese wurde bisher noch nicht beschrieben, einzig ein Zusammenhang von miRNA-712 und der vaskulären Kalzifizierung durch Regulierung der Kalziumeffluxproteine *NCX1*, *PMCA1* und *NCKX4* ist bekannt (Gui et al. 2012). Auch hat sich miRNA-423-5p in Hinblick auf die Entwicklung lymphogener Tumore bisher nicht hervor getan. Nachdem miRNA-714 in beiden untersuchten Probenkollektiven überexprimiert war, wurde diese ausgewählt, um eine mögliche Implikation der Überexpression dieser miRNA auf ihre Zielgene zu untersuchen.

5.5. Untersuchung der Zielstrukturen von miRNA-714

Die Zielgene wurden mit der, zum Zeitpunkt der Untersuchung, aktuellsten Datenbank detektiert (www.Targetscan.org Release 6.2). Nach Design und Austestung der Primer mit den entsprechenden Kontrollen, wurde die Expression von Ribonucleoprotein PTB-binding 1 (*Raver1*), Platelet derived growth factor B (*PDGFB*) und Leukocyte receptor cluster member 8 (*LENG8*) untersucht. Als Ergebnis zeigte sich, dass ähnliche MFI-Werte in der gleichen Tumorentität, beispielsweise die, als diffuse großzellige B-Zelllymphome klassifizierten, Tumormäuse DR4_87 und DR4_124 (MFI-Werte 1008, bzw. 1042), keinen gleichgerichteten Effekt der Genexpression bewirkten. Zu erwarten wäre eine verminderte Expression von *Raver1*, *PDGFB* und *LENG8*. Dies ließ sich in dieser Untersuchung jedoch nicht darstellen. Vielmehr war das Expressionsprofil heterogen und unabhängig von der Expressionsstärke der miRNA-714. So war das Gen *PDGF1* in DR4_87 35-fach unterexprimiert im Vergleich zur gesunden DR4-Kontrollmaus. In DR4_124 war eine 43-fache Überexpression selbigen Gens bei gleichen MFI-Werten zu beobachten. Deswegen erscheint eine direkte, durch miRNA-714 vermittelte, Steuerungen der getesteten Gene in diesem Mausmodell fraglich. Weiterführende Untersuchungen sind denkbar. Zum einen könnte eine größere Probengruppe untersucht werden. Aufgrund von eingeschränktem Materialvorrat war dies in der aktuellen Untersuchung nicht möglich. Zum anderen ist die artifizielle Überexpression von miRNA-714 in gesunden DR4-Mausmilzzellen möglich, um einen direkten Zusammenhang zwischen der Überexpression von miRNA-714 und der Tumorentstehung ziehen zu können.

5.6. Heterogenität des DR4-Mausmodells

Insgesamt zeichnete sich das in dieser Studie verwendete Mausmodell durch seine Heterogenität aus. Angefangen bei der Beobachtung, dass nur ein Teil der Mäuse Tumoren entwickelten, über die Entwicklung unterschiedlicher Tumorentitäten, der Messung der miRNA Expression in den einzelnen Tumorentitäten bis hin zur Untersuchung der Genexpression. Von einem gemeinsamen Startpunkt aus, dem Einbringen des Transgens, schien in jeder Maus ein individueller Prozess abzulaufen, der zur Krankheitsentstehung führte. Einzelne Subentitäten zeigten ebenfalls unterschiedliche Expressionsmuster, so dass eine gruppierte Betrachtung mehrerer Mäuse schwer fiel. Diese Beobachtung deckt sich mit Erfahrungen aus der Humanmedizin. Untersuchungen, beispielsweise an diffusen großzelligen B-Zelllymphomen, zeigten eine erstaunliche genetische Heterogenität in den Tumoren untereinander. Auch das miRNA Expressionsmuster, wie am Beispiel von miRNA-142 gezeigt, gestaltet sich variabel (Kwanhian et al. 2011, Zhang et al. 2013). Unterschiedliche Faktoren, wie beispielsweise chromosomale Instabilität, können hierbei eine Rolle spielen. Das vorliegende Mausmodell dient als Exempel, wie ein erster ‚Hit‘ eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte auslösen kann. Diese haben verschiedenste Tumorentitäten zur Folge. Auch muss jeder Tumor für sich wohl als individuell betrachtet werden. Übertragen auf die Humanmedizin bedeutet das, dass der bereits in Gang gesetzte Prozess der personalisierten Medizin weiter fortgesetzt werden sollte. Individuelle Tumordiagnostik und anschließende Behandlung kann entscheidend zur Verbesserung der Versorgungsqualität von Patienten beitragen, da jede Tumorerkrankung wohl für sich einzigartig ist.

6. Zusammenfassung

Insgesamt wurden 110 transgene DR4-Mäuse in die vorliegende Untersuchung miteinbezogen. Nach Abzug von zehn Kontrollproben und acht Mäusen, die über Nacht verstarben, verblieben 92 Mäuse im Kollektiv, das über einen Zeitraum von 550 Tage beobachtet wurde. 28 Tiere blieben erkrankungsfrei, sieben Tiere verstarben an einer Dickdarmobstruktion, so dass 57 Tiere (28 männliche, 29 weibliche Tiere) nach Sectio als tumorbefallen eingestuft wurden. Die durchschnittliche Zeit bis zur Tumorerkrankung betrug geschlechterübergreifend 434 Tage, bei weiblichen Tieren wurde die Erkrankung im Durchschnitt nach 412 Tagen augenscheinlich, bei männlichen Tieren nach 438,5 Tagen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Geschlechtern war nicht zu erkennen.

Bei 40 Tieren wurde mittels T-Zell-Rezeptoranalyse und IgH-Analyse eine Untersuchung der Tumorentität durchgeführt. Zwölf Proben (30 %) wurden hierbei als T-Zelllymphom definiert, neun Proben (22,5 %) als B-Zelllymphom, sieben Proben (17,5 %) als Composite Tumore und bei weiteren zwölf Proben (30 %) zeigte sich kein verwertbares Ergebnis.

Vor Untersuchung der miRNA Expression im Knochenmark, unter besonderer Berücksichtigung der frühen Vorläuferzellen der Blutzellkaskade, wurde eine Methode zur suffizienteren Gewinnung von Knochenmarkszellen etabliert. Hierbei konnte eine entscheidende quantitative und qualitative Verbesserung der Probengewinnung erreicht werden (25-35 % mehr vitale Knochenmarkszellen pro Maus im Vergleich zur vorangehenden Methode).

Zur Untersuchung der miRNA Expression im Knochenmark wurde im ersten Schritt ein miRNA Array mit 766 getesteten murinen miRNA an vier Proben (eine DR4-Kontrollmaus,

eine BL6-Kontrollmaus und zwei DR4-Tumormäusen) durchgeführt. Dabei wurden nach Auswertung 15 miRNA Kandidaten detektiert (miRNA-150, miRNA-350, miRNA-29c, miRNA-491-5p, miRNA-423-5p, miRNA-144, miRNA-181c, miRNA-706, miRNA-126-3p, miRNA-714, miRNA-712, miRNA-106b, miRNA-291a-5p, miRNA-146a und miRNA-294*), deren Expression in einem weiteren Schritt im Knochenmark, Serum und Spleen verifiziert wurde.

Der Verifizierung der miRNA Expression im Knochenmark ging eine Sortierung der Zellen in verschiedene Untergruppen voran. Hierbei wurde bei jeweils 26 Mäusen drei Untergruppen gewonnen: Gesamtknochenmark, Lin^{neg} ckit^{pos} und Lin^{pos} ckit^{neg} Fraktionen. Aufgrund zu niedriger Messwerte, die jeweils unter dem Hintergrundwert blieben, konnte keine Aussage über die Expression der getesteten miRNA im Knochenmark getroffen werden. Auch war die Untersuchung der miRNA Expression im Serum nicht aussagekräftig. Das neu etablierte System zur Verifizierung der miRNA Kandidaten wurde im Anschluss auf Proben der Milz ausgeweitet. Hierbei lagen zwei Probenkollektive vor: Proben der aktuellen Zucht (1) und bei -80°C gelagerte Proben aus einer vorangehenden Zucht (2). In den Proben der aktuellen Zucht (1) zeigte sich eine statistisch signifikante Überexpression von miRNA-714 und Unterexpression von miRNA-423-5p im Vergleich Tumormaus gegen gesunde Kontrollmaus. Speziell in der Gruppe der, als Composite Tumoren klassifizierten Mäuse, war dieser Unterschied auffällig. Eine Überexpression von miRNA-714 konnte auch in dem zweiten Probenkollektiv (2) nachgewiesen werden, das sich durch eine exakte pathologische Klassifizierung der Tumorentitäten hervor tut. Neben miRNA-714 war ebenfalls miRNA-712 in den DR4 Tumorproben überexprimiert im Vergleich zu gesunden DR4 Kontrollproben. Nachdem miRNA-714 in beiden Probenkollektiven überexprimiert war, sollte dessen Effekt auf die Genexpression untersucht werden. Mittels *in silico* Analyse wurden die Zielstrukturen

von miRNA-714 detektiert (*Raver1*, *Leng8*, *Pdgfb*, *Rnf165*, *Camk2b*, *Rasl10b*) und mittels quantitativer PCR deren Expression in Milzproben zwischen gesunden DR4 Kontrollmäusen und pathologisch klassifizierter DR4 Mäuse verglichen. Nach Analyse der Daten zeigte sich, dass *Raver1* 9,07-fache überexprimiert in T-Zelllymphomen und 2,9-fache/2,2-fach überexprimiert in B-Zelllymphomen bzw. Composite Tumoren war. *PDGFB* zeigte sich in T-Zelllymphomen (-4,93-fach) und Composite Tumoren (-0,95-fach) unterexprimiert im Vergleich zur gesunden Kontrolle. Bei *LENG8* zeigte sich in T-Zelltumoren, sowie in Composite Tumoren nur eine geringe Überexpression im Vergleich zur gesunden DR4 Kontrolle, je 0,44-fach bzw. 0,64-fach. In B-Zelltumoren lag eine 2,3-fache Überexpression im Vergleich zur gesunden Kontrolle vor.

Die ausgeprägte Frequenzheterogenität der unterschiedlichen Zellpopulationen in der Blutzellkaskade, die sich im Sortierungsversuch zeigte, war der Anlass, um in einem FACS-Versuch diese exakt darzustellen. Hierbei konnte eine statistisch signifikante Erhöhung ($p < 0,0127$) der multipotenten Vorläuferzellen der Hämatopoese bei den DR4-Tumormäusen im Vergleich zu BL6 Kontrollmäusen nachgewiesen werden.

7. Anhang:

7.1. Literaturverzeichnis:

1. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." *Nature* 2000 Mar 9;404(6774):193-7
2. Alemdehy MF, Erkeland SJ "MicroRNAs: key players of normal and malignant myelopoiesis." *Curr Opin Hematol.* 2012 Jul;19(4):261-7
3. Aribi M, Moulessehoul S, Benabadji AB, Kendoucitani M. "HLA DR phenotypic frequencies and genetic risk of Type 1 diabetes in west region of Algeria, Tlemcen." *BMC Genet.* 2004 Aug 24;5:24.
4. Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, Liang X, Weidhaas JB, Saltzman WM, Slack FJ. „Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 26;109(26):E1695-704.
5. Bhagavathi S, Czader M „MicroRNAs in Benign and Malignant Hematopoiesis." *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Sep;134(9):1276-81
6. Biscontin A, Casara S, Cagnin S, Tombolan L, Rosolen A, Lanfranchi G, De Pittà C. "New miRNA labeling method for bead-based quantification" *BMC Mol Biol.* 2010 Jun 16;11:44.
7. Bissels U, Bosio A, Wagner W. "MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape" *Haematologica.* 2012 Feb;97(2):160-7
8. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL „ RNA polymerase III transcribes human microRNAs" *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097-101. Epub 2006 Nov 12.
9. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. „bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila" *Cell.* 2003 Apr 4;113(1):25-36.
10. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. "Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell." *Am J Pathol.* 2006 Aug;169(2):338-46.
11. Buza-Vidas N, Cismasiu VB, Moore S, Mead AJ, Woll PS, Lutteropp M, Melchiori L, Luc S, Bouriez-Jones T, Atkinson D, O'Carroll D, Jacobsen SE, Nerlov C. "Dicer is selectively important for the earliest stages of erythroid development" *Blood* September 20, 2012 vol. 120 no. 12 2412-2416
12. Carlos C, Brenton JD „Sizing up miRNAs as cancer genes" *Nature Medicine* 2005 Jul 11, 712 - 714
13. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 26;99(24):15524-9
14. Carninci P, Kasukawa T et al. "The transcriptional landscape of the mammalian genome." *Science* 2005 Sep 2;309(5740):1559-63. .

15. Challen GA, Boles N, Lin KK, Goodell MA "Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis" *Cytometry A*. 2009 Jan;75(1):14-24
16. Chan MC, Hilyard AC, Wu C, Davis BN, Hill NS, Lal A, Lieberman J, Lagna G, Hata A "Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGFbeta family of signalling pathways by control of miR-24 expression." *EMBO J*. 2010 Feb 3;29(3):559-73.
17. Chaudhuri AA, So AY, Mehta A, Minisandram A, Sinha N, Jonsson VD, Rao DS, O'Connell RM, Baltimore D. „Oncomir miR-125b regulates hematopoiesis by targeting the gene Lin28A." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 13;109(11):4233-8.
18. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP „MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation" *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):83-6. Epub 2003 Dec 4
19. Chen H, Li Y, Zhang J, Ran Y, Wei J, Yang Y, Shu HB „RAVER1 is a coactivator of MDA5-mediated cellular antiviral response." *J Mol Cell Biol*. 2013 Apr;5(2):111-9.
20. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. „Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases" *Cell Res*. 2008 Oct;18(10):997-1006.
21. Coleman J, Green PJ, Inouye M. "The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes" *Cell*. 1984 Jun;37(2):429-36.
22. Costa PM, Cardoso AL, Pereira de Almeida LF, Bruce JN, Canoll P, Pedroso de Lima MC. "PDGF-B-mediated downregulation of miR-21: new insights into PDGF signaling in glioblastoma." *Hum Mol Genet*. 2012 Dec 1;21(23):5118-30.
23. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. "Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3627-32. Epub 2005 Feb 28.
24. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs". *Genome Res*. 2009 Jan;19(1):92-105.
25. Fang C, Zhu DX, Dong HJ, Zhou ZJ, Wang YH, Liu L, Fan L, Miao KR, Liu P, Xu W, Li JY. „Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma" *Ann Hematol*. 2012 Apr;91(4):553-9.
26. Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K, Rilke F, Stansfeld AG, van Unnik JAM. "Classification of non-Hodgkin's lymphomas." (Letter to the Editor). *Lancet* 1974;II:406-8.
27. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. „Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of Isy-6 and other microRNAs." *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Sep 11;18 (10):1139-46.
28. Goodfellow SJ, White RJ "Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth." *Cell Cycle*. 2007 Oct 1;6(19):2323-6.
29. Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. „PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse." *Am J Pathol*. 1990 Jun;136(6):1235-46.

30. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R.B "Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing" *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):631-40. Epub 2005 Nov 3.
31. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):235-40. Epub 2004 Nov 7.
32. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing" *Mol Cell*. 2007 Jul 6;27(1):91-105.
33. Gui T, Zhou G, Sun Y, Shimokado A, Itoh S, Oikawa K, Muragaki Y „MicroRNAs that target Ca(2+) transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification" *Lab Invest*. 2012 Sep;92(9):1250-9.
34. Guo S, Lu J, Schlanger R, Zhang H, Wang JY, Fox MC, Purton LE, Fleming HH, Cobb B, Merkenschlager M, Golub TR, Scadden DT. "MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 10;107(32):14229-34.
35. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3016-27.
36. He J, Zhang F, Wu Y, Zhang W, Zhu X, He X, Zhao Y, Zhang W, Zhao Y. "Prognostic role of microRNA-155 in various carcinomas: Results from a meta-analysis." *Dis Markers*. 2013;34(6):379-86.
37. Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M. "RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling" *BMC Biotechnol*. 2009 Dec 21;9:102.
38. Ito K, Bian HJ, Molina M, Han J, Magram J, Saar E, Belunis C, Bolin DR, Arceo R, Campbell R, Falcioni F, Vidović D, Hammer J, Nagy ZA. "HLA-DR4-IE chimeric class II transgenic, murine class II-deficient mice are susceptible to experimental allergic encephalomyelitis." *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2635-44..
39. Jaffe S (2009) "The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research" *ASH Education Book vol*. 2009 no. 1 523-531
40. Jianwei Z, Fan L, Xiancheng L, Enzhong B, Shuai L, Can L. „MicroRNA 181a improves proliferation and invasion, suppresses apoptosis of osteosarcoma cell." *Tumour Biol*. 2013 Dec;34(6):3331-7.
41. Joshi A, Coelho MB, Kotik-Kogan O, Simpson PJ, Matthews SJ, Smith CW, Curry S "Crystallographic analysis of polypyrimidine tract-binding protein-Raver1 interactions involved in regulation of alternative splicing." *Structure*. 2011 Dec 7;19(12):1816-25.
42. Kwanhian W, Lenze D, Alles J, Motsch N, Barth S, Döll C, Imig J, Hummel M, Tinguely M, Trivedi P, Lulitanond V, Meister G, Renner C, Grässer FA. „MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma." *Cancer Med*. 2012 Oct;1(2):141-55.
43. Kim VN "MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export." *Trends Cell Biol*. 2004 Apr;14(4):156-9

44. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den Berg "BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas." *J Pathol.* 2005 Oct;207(2):243-9.
45. Kluiver JL, Chen CZ „MicroRNAs regulate B-cell receptor signaling-induced apoptosis." *Genes Immun.* 2012 Apr;13(3):239-44.
46. Kogan SC, Ward JM, Anver MR, Berman JJ, Brayton C, Cardiff RD, Carter JS, de Coronado S, Downing JR, Fredrickson TN, Haines DC, Harris AW, Harris NL, Hiai H, Jaffe ES, MacLennan IC, Pandolfi PP, Pattengale PK, Perkins AS, Simpson RM, Tuttle MS, Wong JF, Morse HC 3rd; Hematopathology subcommittee of the Mouse Models of Human Cancers Consortium. „Bethesda proposal for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasm in mice" *Blood.* 2002 Jul 1;100(1):238-45
47. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow" *Cell.* 1997 Nov 28;91(5):661-72.
48. Kutemeier G, Harloff C, Mocikat R. „Rapid isolation of immunoglobulin variable genes from cell lysates of rat hybridomas by polymerase chain reaction." *Hybridoma.* 1992 Feb;11(1):23-32.
49. Lakshmipathy U, Davila J, Hart RP. „MicroRNA in pluripotent stem cells" *Regen Med.* 2010 Jul;5(4):545-55.
50. Lawrie CH, Chi J, Taylor S, Tramonti D, Ballabio E, Palazzo S, Saunders NJ, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS. "Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma." *J Cell Mol Med.* 2009 Jul;13(7):1248-60.
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V „The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.
52. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. „MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *EMBO J.* 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
53. Lennert K, Feller AC. *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphoma (according to the up-dated Kiel classification).* Berlin: Springer; 1992.
54. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):15-20.
55. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues" *BMC Genomics.* 2007 Jun 12;8:166.
56. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." *Nature.* 2005 Feb 17;433(7027):769-73.
57. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. „Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi" *Science.* 2004 Sep 3;305(5689):1437-41.
58. Lotterman CD, Kent OA, Mendell JT "Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways" *Cell Cycle.* 2008 Aug 15; 7(16): 2493–2499.

59. Lukes RJ, Collins RD. "Immunologic characterization of human malignant lymphomas." *Cancer*. 1974 Oct;34(4 Suppl):suppl:1488-503
60. Luminex (2011), "microRNA expression analysis of different murine cell samples using miRXplore™ Microarrays" Seite 15
61. Luminex "Custom miRNA Assay on Luminex platform" 01.03.2011
62. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs" *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
63. Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R, Blesa D, Rubio-Moscardo F, Albertson DG, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Levy R, Pinkel D, Lossos IS. "Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations." *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3109-17. Epub 2002 Oct 24.
64. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs" *Mol Cell*. 2004 Jul 23;15(2):185-97.
65. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. "High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma." *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 Feb;39(2):167-9.
66. Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, Takayama M, Asada K, Mirochnitchenko O, Inouye M, Kato I. "The expression profile of microRNAs in mouse embryos" *Nucleic Acids Res*. 2006 Mar 31;34(6):1765-71. Print 2006.
67. Shao M, Rossi S, Chelladurai B, Shimizu M, Ntukogu O, Ivan M, Calin GA, Matei D. "PDGF induced microRNA alterations in cancer cells" *Nucleic Acids Res*. 2011 May;39(10):4035-47.
68. Morrison SJ, Weissman IL "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." *Immunity* 1994 Nov;1(8):661-73.
69. Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. "MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples" *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 4;390(1):1-4.
70. Mühlhardt C (2002) In: „Molekularbiologie/Genomics.“ 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg.
71. Nana-Sinkam SP, Croce CM "Clinical applications for microRNAs in cancer." *Clin Pharmacol Ther*. 2013 Jan;93(1):98-104.
72. Ng YY, Baert MR, de Haas EF, Pike-Overzet K, Staal FJ "Isolation of human and mouse hematopoietic stem cells." *Methods Mol Biol*. 2009;506:13-21.
73. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, Kahn ME, Rao DS, Baltimore D.) „MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development." *Immunity*. 2010 Oct 29;33(4):607-19.
74. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT "C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression." *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):839-43.

75. Ooi AG1, Sahoo D, Adorno M, Wang Y, Weissman IL, Park CY. „MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 14;107(50):21505-10.
76. Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zöller M, Kourilsky P. „The sizes of CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments“ *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 1;90(9):4319-23.
77. Raffegerst S. (2007) Dissertation „Hämatologische Neoplasien in einem transgenen Mausmodell: Ein Modell für das Hodgkin-Lymphom?“
78. Raffegerst SH, Hoelzlwimmer G, Kunder S, Mysliwietz J, Quintanilla-Martinez L, Schendel DJ. „Diverse hematological malignancies including hodgkin-like lymphomas develop in chimeric MHC class II transgenic mice.“ *PLoS One*. 2009 Dec 31;4(12):e8539.
79. Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, Keyvanfar K, McCoy JP Jr, Sloand EM, Kajigaya S, Young NS „Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells“ *Leuk Res*. 2006 May;30(5):643-7.
80. Rappaport H. (1966) „Tumors of the hematopoietic system.“ *Atlas of Tumor Pathology, Sect 3, Fasc. 8. Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) 1966: pp.97–8.*
81. Ragan C, Zuker M, Ragan MA. „Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations“ *PLoS Comput Biol*. 2011 Feb;7(2):e1001090.
82. Rooij E „The Art of MicroRNA“ *Circ Res*. 2011 Jan 21;108(2):219-34.
83. Seita J, Weissman IL „Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation“ *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 Nov-Dec;2(6):640-53
84. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. „Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity“ *Science*. 2004 Sep 3;305(5689):1434-7
85. Sontheimer EJ, Carthew RW „Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs.“ *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):9-12.
86. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. „Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells.“ *Science*. 1988 Jul 1;241(4861):58-62.
87. Spellman R, Rideau A, Matlin A, Gooding C, Robinson F, McGlincy N, Grellscheid SN, Southby J, Wollerton M, Smith CW. „Regulation of alternative splicing by PTB and associated factors.“ *Biochem Soc Trans*. 2005 Jun;33(Pt 3):457-60.
88. Wang DT, Ma ZL, Li YL, Wang YQ, Zhao BT, Wei JL, Qi X, Zhao XT, Jin YX. „miR-150, p53 protein and relevant miRNAs consist of a regulatory network in NSCLC tumorigenesis“ *Oncol Rep*. 2013 Jul;30(1):492-8
89. Wang Y, Shi J, Wu Y, Xu W, Wang Q, Zhang J, Jiang M, Gu G. „Use of Luminex xMAP bead-based suspension array for detecting microRNA in NSCLC tissues and its clinical application.“ *Tumori*. 2012 Nov;98(6):792-9
90. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sawada K. „The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma“ *Leukemia*. 2011 Aug;25(8):1324-34.

91. Weissman IL, . Shizuru JA "The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases" *Blood* 2008 Nov 112(9): 3543–3553.
92. Wightman B, Ha I, Ruvkun G „Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855-62.
93. Witkos TM, Koscińska E, Krzyżosiak WJ „Practical Aspects of microRNA Target Prediction." *Curr Mol Med*. 2011 Mar;11(2):93-109.
94. Yao R, Cooper GM. (1995) "Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor." *Science*. 1995 Mar 31;267(5206):2003-6.
95. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev*. 2003 Dec 15;17(24):3011-6.
96. YK Kim, Yeo J, Ha M, Kim B, Kim VN "Cell Adhesion-Dependent Control of MicroRNA Decay" *Mol Cell*. 2011 Sep 16;43(6):1005-14.
97. Xue Y, Lim S, Yang Y, Wang Z, Jensen LD, Hedlund EM, Andersson P, Sasahara M, Larsson O, Galter D, Cao R, Hosaka K, Cao Y "PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells" *Nat Med*. 2011 Dec 4;18(1):100-10.
98. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor *c-Myb*." *Cell*. 2007 Oct 5;131(1):146-59
99. Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, Dunphy C, Choi W, Au WY, Srivastava G, Lugar PL, Rizzieri DA, Lagoo AS, Bernal-Mizrachi L, Mann KP, Flowers C, Naresh K, Evens A, Gordon LI, Czader M, Gill JI, Hsi ED, Liu Q, Fan A, Walsh K, Jima D, Smith LL, Johnson AJ, Byrd JC, Luftig MA, Ni T, Zhu J, Chadburn A, Levy S, Dunson D, Dave SS „Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 22;110(4):1398-403
100. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF„miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 24;104(17):7080-5
101. Zhou Y, Tan L, Que Q, Li H, Cai L, Cao L, Ye Q, Xiong J "Study of association between *hla-dr4* and *dr53* and autoantibody detection in rheumatoid arthritis." *J Immunoassay Immunochem*. 2013;34(2):126-33.
102. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4663-70.
103. Peter ME "Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step." *Oncogene*. 2010;29(15):2161–4
104. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP "The impact of MicroRNAs on protein output." *Nature*. 2008;455:64–71.
105. Caldas C, Brenton JD "Sizing up miRNAs as cancer genes." *Nat Med*. 2005 Jul;11(7):712-4.

106. Knudson AG Jr. "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A. 1971 Apr;68(4):820-3.

7.2. Verwendete Antikörper:

Antikörper	Firma
FITC Conjugated Anti-mouse CD34 Clone: RAM34 Cat# 11 – 0341 – 82 0.2 ml at 0.5mg/ml	eBioscience
Anti-Mouse Ly-6A/E (Sca – 1) Alexa Fluor® 700 Clone:D7 Cat# 56 – 5981 – 82 0.5 ml at 0.2 mg/ml	eBioscience
Mouse Hematopoietic Lineage Flow Panel Cat# 88 – 7774 - 75	eBioscience
Streptavidin Pe – Cy7 Cat# 25 – 4317 – 82 0.5 ml at 0.2 mg/ml	eBioscience
Anti-Mouse CD117 (c-Kit) APC Clone: 2B8 Cat# 17 – 1171 – 82 0.5 ml at 0.2 mg/ml	eBioscience
Anti-Mouse CD 150 PerCP-eFluor® 710 Clone.mShad150 Cat# 46 – 1502 – 80 0.125 ml at 0.2 mg/ml	eBioscience
RmT1 (CD90)-PB F/P = 53.2	
Anti-Mouse CD11b PE Clone: M1/70 Cat# 12 – 0112 – 81 0.25ml at 0.2 mg/ml	eBioscience
Anti – Hu/Mo CD45R (B220) PerCP – Cy5.5 Clone: RA3-6B2 Cat# 45 – 0452 - 82	eBioscience

Kompensationsbeads	Firma

Anti – Rat and Anti – Hamster Ig K /Negative Control Compensation Particle Set Cat# 552845	BD™ CompBeads
---	---------------

7.3. Verwendete Primer:

GEN	NM_Transcript	5' Sequence	3' Sequence	Tm
18S RNA	NR_003278	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	58°C
IgH _{RM}	Ralph Mocikat	AGGTC/GA/CAA/GCTGCAGC/GA GTCATGG	TGAGGAGACGGTGACCGT GGTCCCTTGGCCCC	65°C
Vβ1	Pannetier et al. 1993	CTGAATGCCCAGACAGCTCCAAG C		60°C
Vβ2	Pannetier et al. 1993	TCACTGATACGGAGCTGAGGC		60°C
Vβ3.1	Pannetier et al. 1993	CCTTGCAGCCTAGAAATTCAGT		60°C
Vβ4	Pannetier et al. 1993	GCCTCAAGTCGCTTCCAACCTC		60°C
Vβ5.1	Pannetier et al. 1993	CATTATGATAAAATGGAGAGAGA T		60°C
Vβ5.2	Pannetier et al. 1993	AAGGTGGAGAGAGACAAAGGAT TC		60°C
Vβ6	Pannetier et al. 1993	CTCTCACTGTGACATCTGCCC		60°C
Vβ7	Pannetier et al. 1993	TACAGGGTCTCACGGAAGAAGC		60°C
Vβ8.1	Pannetier et al. 1993	CATTACTCATATGTCGCTGAC		60°C
Vβ8.2	Pannetier et al. 1993	CATTATTCATATGGTGCTGGC		60°C
Vβ8.3	Pannetier et al. 1993	TGCTGGCAACCTTCGAATAGGA		60°C

Vβ9	Pannetier et al. 1993	TCTCTCTACATTGGCTCTGCAGGC		60°C
Vβ10	Pannetier et al. 1993	ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGGA		60°C
Vβ11	Pannetier et al. 1993	GCACTCAACTCTGAAGATCCAGA GC		60°C
Vβ12	Pannetier et al. 1993	GATGGTGGGGCTTTCAAGGATC		60°C
Vβ13	Pannetier et al. 1993	AGGCCTAAAGGAACTAACTCCAC		60°C
Vβ14	Pannetier et al. 1993	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC		60°C
Vβ15	Pannetier et al. 1993	CCCATCAGTCATCCCAACTTATCC		60°C
Vβ16	Pannetier et al. 1993	CACTCTGAAAATCCAACCCAC		60°C
Vβ18	Pannetier et al. 1993	CAGCCGGCCAAACCTAACATTCT C		60°C
Vβ20	Pannetier et al. 1993	TCTGCAGCCTGGGAATCAGAA		60°C
LiGC	Mocikat		CGCCCGCCGCGCCCCGCGC CCGTCCCGCCGCCCCCGCC GGCTTGGGTGGAGTCACAT TTCTC	60°C

7.4. Luminex xMap® Regents

Mir Name	MTAG Nummer	Primersequenz
Mir 150	MTAG- A039	CACUGGUACAAGGGUUGGGAGAACAAATATCTAACTACTATCACAA
Mir 350	MTAG- A029	CAAATACATAATCTTACATTCACTTACTACTTCTATAACTCACTTAAA

Mir 29c	MTAG-A014	UAACCGAUUUCAAUUGGUGCUAAATTTCTTCTCTTTCTTTACAAT
Mir 491-5p	MTAG-A012	CCUCAUGGAAGGGUCCCCACUCATAATCAATTTCACTTTCTACT
Mir 423 – 5p	MTAG-A048	AAAGUCUCGCUCUCUGCCCCUCAAATCAACACACAATAACATTCATA
Mir 144	MTAG-A018	AGUACAUCAUUAUACUGUAACACTTATCTTTCAATTCAATTAC
Mir 181c	MTAG-A076	ACUCACCGACAGGUUGAAUGUUTCTCATCTATCATACTAATTCTTT
Mir 126 – 3p	MTAG-A020	CGCAUUUUUACUCACGGUACGACTTTCTCATACTTTCAACTAATTT
Mir 714	MTAG-A062	GCGACCGACCGGCCUCGUCGCTAAACATACAAATACACATTTCA
Mir 712	MTAG-A022	GGUACCGCCCGGGUGAAGGAGCAAACAAACATTCAAATATCAATC
Mir 106b	MTAG-A052	AUCUGCACUGUCAGCACUUUATTCTTCATTAACCTTCTAATCTTAC
Mir 291 – 5p	MTAG-A044	AGAGAGGGCCUCCACUUUGAUGTCATCACTTTCTTTACTTTACATT
Mir 146a	MTAG-A033	AACCCAUGGAAUUCAGUUCUAACTACTTATTCTCAAACCTTAATA
Mir 294*	MTAG-A036	ACUCAAAAUGGAGGCCCUAUCUATTAAACAACCTCTTAACCTACACAA

Mir 706	MTAG-A078	UUUUUUUGAGACAGGGUUUCUCUTTTACAAATCTAATCACACTATAC

7.5. Auswertung der Genexpression (x-fache Expression) in der Übersicht

Übersicht der Genexpression bei allen Tumorentitäten, DR4-Kontrolle auf den Wert 1 festgelegt, negative Werte entsprechen einer Unterexpression, positive Werte einer Überexpression B = B-Zelllymphom, T = T-Zelllymphom, C = Composite Tumor, MFI = Mediane Fluoreszenz Intensität

Tumorprobe	<i>Raver1</i>	<i>Pdgf1</i>	<i>Leng8</i>	MFI miR714
DR4_40_B	4,68	-1,89	7,12	1309
DR4_86_B	4,40	2,13	1,69	1408
DR4_87_B	-1,44	-37,14	-1,13	1008
DR4-96_B	2,53	-2,57	2,41	1602
DR4_177_B	2,37	-4,79	1,22	1034
DR4_124_B	3,57	43,11	2,97	1042
DR4_129_B	3,82	32,00	1,38	1338
DR4_81_T	1,41	-20,04	-2,20	1993
DR4_119_T	7,58	-0,21	1,79	1544
DR4_126_T	18,22	5,46	1,74	1495
DR4_109_C	7,79	1,57	3,31	1379
DR4_110_C	-23,14	-13,45	-4,19	1578
DR4_118_C	21,82	9,03	2,81	1379
Bl6 Kontrolle	-2,86	-6,24	2,03	396
DR4 Kontrolle	1,00	1,00	1,00	536

7.6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1. Übersichtsdarstellung der miRNA in der normalen Hämatopoese
- Abb. 2. Unterschiedlicher Effekt von miRNA auf Tumorsuppressor Gene/Onkogene
- Abb. 3. Vergleich Überlebenszeit Zucht S. Raffegerst und M. Höck
- Abb. 4. Kaplan – Meier Überlebenskurve DR4 Mäuse in Langzeitbeobachtung
- Abb. 5. Gelbild TZR Maus Nr. 26.
- Abb. 6. Auswertung TZR–Analyse
- Abb. 7. Gelbild IgH – Analyse DR4 1517
- Abb. 8. Auswertung IgH-Analyse
- Abb. 9. Vergleich Tumorentität S. Raffegerst und M. Höck
- Abb. 10. Auszug ReRatio Liste miRNA Array
- Abb. 11. ReRatio DR4 Gesund vs. BL6
- Abb. 12. ReRatio DR4 Tumor 1 vs DR4 Gesund
- Abb. 13. ReRatio DR4 Tumor 2 vs. DR4 Gesund
- Abb. 14. Heatmapdarstellung der 30 putativsten miRNA kandidaten
- Abb. 15. Fünfzehn Top miRNA Kandidaten mit maturer miRNA Sequenz
- Abb. 16. Frequenz der Lin^{neg}/ckit^{pos} Zellen an den Gesamtzellen im Knochenmark
- Abb. 17. Frequenz Lin^{pos}/ckit^{neg} Zellen im Knochenmark
- Abb. 18. Gating Strategie FACS-Schema
- Abb. 19. Frequenz LT-HSZ
- Abb. 20. Untergruppen LT-HSZ
- Abb. 21. Standardkurve Luminex Versuch Expression der miRNA im Knochenmark
- Abb. 22. MiRNA-714 Expression in der Splen
- Abb. 23. MiRNA-423-5p Expression in der Splen
- Abb. 24. MiRNA-714 Expression in den definierten Untergruppen
- Abb. 25. MiRNA-712 Expression in pathologisch klassifizierten Proben

- Abb. 26. MiRNA-714 Expression in pathologisch klassifizierten Proben
- Abb. 27. MiRNA-714 Expression in pathologisch klassifizierten Proben, unterteilt in Untergruppen
- Abb. 28. MiRNA-714 mit Überlappungsbereich an *Raver1*
- Abb. 29. Gelelektrophorese *Leng8*
- Abb. 30. Korrelation MFI-Signalstärke und Ergebnisse der quantitativen PCR bei *Raver1*

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Frau Prof. Schendel für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit meine Dissertation an Ihrem Institut anzufertigen und Ihre kompetente Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Silke Raffegerst. Ihr großes Engagement, Geduld und Kreativität stellte eine hervorragende Betreuung bei Erstellung der Arbeit dar.

Auch gilt mein Dank Herrn Adam Slusarski. Bei der Umsetzung verschiedenster Vorhaben war seine Fachwissen stets von großem Nutzen. Auch waren seine aufmunternden Kommentare oft eine große Motivationshilfe.

Darüber hinaus bedanke ich mich sehr herzlich bei dem gesamten Team des Instituts für Molekulare Immunologie. Bei den verschiedensten Fragen, die im Laufe der Promotionsarbeit auftraten, war stets gewiss, dass ein Mitarbeiter mit Rat und Tat zu Seite stand.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch für das Doktorandenstipendium der Charité Berlin im Rahmen des SFB TR-36. Ebenfalls möchte ich mich für das Stipendium der Hanns Seidel Stiftung bedanken. Dadurch wurde mir ermöglicht, während des Studiums, viele interessante Themengebiete zu ergründen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie für all das, was Ihr mir ermöglicht habt. Danke.