

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Experimentelle Genetik

Beeinflussung der Expression von Cyclin D1 in Mantelzell- Lymphom-Zelllinien durch lentiviral produzierte siRNA

Margit Klier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis
2. Priv.-Doz. Dr. L. Quintanilla-Fend
(Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Die Dissertation wurde am 16.07.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.01.2009 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 DAS MANTELZELL-LYMPHOM UND CYCLIN D1	3
2.1.1 Entstehung eines Lymphoms	3
2.1.2 Allgemeine Charakteristika des Mantelzell-Lymphoms	4
2.1.2.1 Klinische Faktoren	4
2.1.2.2 Morphologie	4
2.1.2.3 Immunphänotyp	5
2.1.2.4 Genetik	6
2.1.2.5 Cyclin D1-negative Mantelzell-Lymphome	8
2.1.3 Allgemeine Funktionen von Cyclin D1	9
2.1.4 Cyclin D1 und Onkogenese	12
2.1.5 Genexpressionsprofile des Mantelzell-Lymphoms	14
2.1.6 Therapie-Möglichkeiten	17
2.2 VERMINDERUNG DER EXPRESSION VON CYCLIN D1 DURCH RNA-INTERFERENZ	19
2.3 LENTIVIRALE INFEKTION	21
2.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 HERSTELLUNG DES LEPTIVIRALEN VEKTORS MIT DER CYCLIN D1-SHRNA	26
3.2 DNA-METHODEN	28
3.2.1 Annealing der Primer	28
3.2.2 Phosphorylierung der annealten Primer	28
3.2.3 Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen	28
3.2.4 Ligation	28
3.2.5 Transformation	28
3.2.6 Plasmid-Präparationen	28
3.2.7 Vorbereitung pFUGW-Vektor / Cyclin D1-shRNAs für die Klonierung	29
3.2.8 DNA-Sequenzierung	29
3.3 EFFEKTIVITÄTSTEST FÜR DIE CYCLIN D1-SHRNA-SEQUENZEN	30
3.4 VERWENDETE ZELLLINIEN	30
3.5 VIRENPRODUKTION	31
3.6 BESTIMMUNG DES VIREN-TITERS	32
3.7 INFEKTION DER MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLLINIEN	33
3.8 RNA-METHODEN	33
3.8.1 RNA-Isolation	33
3.8.2 Reverse Transkription / quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	34
3.8.3 Quantitative Real-Time PCR im Großmaßstab durch Taqman [®] Arrays	35
3.8.4 Vorbereitung der RNA für die Genechip-Analyse	35
3.9 WESTERN BLOT	37
3.10 WACHSTUMSKURVE	38
3.11 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE VON ZELLZYKLUS UND APOPTOSE	39
3.12 CHEMIKALIEN	39

4. ERGEBNISSE	40
4.1 CHARAKTERISIERUNG DER MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN	40
4.1.1 Expression von Cyclin D1, D2 und D3 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien	40
4.1.2 Expression wichtiger Zellzyklus-Proteine in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien	42
4.2 IDENTIFIZIERUNG EINER SHRNA MIT HOHER EFFIZIENZ GEGEN CYCLIN D1	44
4.2.1 Überprüfung der Cyclin D1-shRNA-Sequenzen mittels β -Galaktosidase-Assay	44
4.2.2 Überprüfung der Cyclin D1-shRNA-Sequenzen mittels Western Blot	46
4.3 EFFIZIENTER TRANSFER DER CYCLIN D1-SHRNA IN DIE MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN MITTELS LENTIVIRALER INFEKTION	48
4.3.1 Titration des Optimums an Virenmenge am Beispiel der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Granta 519	48
4.3.2 Infektionsraten in den verschiedenen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien	50
4.3.3 Verminderung der Expression von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit mittlerer bis hoher Infektionsrate	50
4.4 EINFLUSS DER VERMINDERTEN EXPRESSION VON CYCLIN D1 AUF DIE WACHSTUMS-RATE DER ZELLEN	53
4.5 EINFLUSS DER VERMINDERTEN EXPRESSION VON CYCLIN D1 AUF DEN ZELLZYKLUS DER ZELLEN	54
4.6 EINFLUSS DER VERMINDERTEN EXPRESSION VON CYCLIN D1 AUF DIE APOPTOSE-RATE DER ZELLEN	56
4.7 UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON CYCLIN D2 UND D3 NACH CYCLIN D1-HINUNTERREGULATION	57
4.8 GLEICHZEITIGE HINUNTERREGULATION VON CYCLIN D1 UND CYCLIN D2 IN DEN MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN	59
4.9 VERGLEICHENDES GENEXPRESSIONSPROFIL VOR UND NACH HINUNTERREGULATION VON CYCLIN D1	61
4.9.1 RNA-Analyse	61
4.9.2 Cluster-Analyse	62
4.9.3 Genexpressionsprofil der drei Tage infizierten Granta 519-Zellen	64
4.9.4 Genexpressionsprofil der sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen	67
4.9.5 Genexpressionsprofil der sieben Tage infizierten Z-138-Zellen	69
4.9.6 Verteilung der Gene auf verschiedene biologische Prozesse	71
4.9.7 Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen	73

5. DISKUSSION	87
5.1 ETABLIERUNG EINES GEEIGNETEN SYSTEMS ZUR MANIPULATION VON GENEN IN MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN	87
5.2 ROLLE VON CYCLIN D1 IM HINBLICK AUF DIE ENTSTEHUNG UND ENTWICKLUNG DES MANTELZELL-LYMPHOMS	89
5.2.1 Kompensation von Cyclin D1 durch Cyclin D2?	89
5.2.2 Kompensation von Cyclin D1 durch sekundäre genetische Veränderungen?	91
5.2.3 Schlussfolgerungen zur Rolle von Cyclin D1 beim Mantelzell-Lymphom	93
5.3 ERGEBNISSE DER GENEXPRESSIONSPROFILE	95
5.3.1 Zellzyklus- und Replikationsgene	96
5.3.2 Gene „Proliferation signature“	96
5.3.3 DNA-Reparatur-Gene	96
5.3.4 Transkriptions-Gene	97
5.3.5 Signalling-Gene	98
5.3.6 Immun-Signalling-Gene	98
5.3.7 Apoptose-Gene	99
5.3.8 Gene verschiedener Prozesse	100
5.3.9 Schlussfolgerungen zu den Ergebnissen der Genexpressionsprofile	101
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	102
7. LITERATUR	104

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: EIN B-ZELL-LYMPHOM IST EINE KLONALE EXPANSION VON B-ZELLEN EINES BESTIMMTEN REIFUNGSSTADIUMS.	3
ABBILDUNG 2: MORPHOLOGIE-SUBTYPEN BEIM MANTELZELL-LYMPHOM.	5
ABBILDUNG 3: EXPRESSION VON CYCLIN D1 IN NORMALEN B-LYMPHOZYTEN UND IM MANTELZELL-LYMPHOM.	6
ABBILDUNG 4: STADIEN DER B-ZELL-REIFUNG.	7
ABBILDUNG 5: GENOMISCHER LOCUS VON CYCLIN D1.	8
ABBILDUNG 6: BIOCHEMISCHE FUNKTIONEN VON CYCLIN D1.	9
ABBILDUNG 7: p14 ^{ARF} -MDM2-p53-SIGNALWEG.	11
ABBILDUNG 8: EXPRESSION VON p27Kip1 BEIM MANTELZELL-LYMPHOM.	13
ABBILDUNG 9: GENEXPRESSIONSPROFIL ZUR ABGRENZUNG DES MANTELZELL-LYMPHOMS VON ANDEREN B-ZELL-LYMPHOMEN.	16
ABBILDUNG 10: ENTWICKLUNG NEUER THERAPEUTIKA ZUR BEHANDLUNG VON MANTELZELL-LYMPHOMEN.	18
ABBILDUNG 11: MECHANISMEN DER RNA-INTERFERENZ	20
ABBILDUNG 12: REPLIKATIONS-ZYKLUS EINES RETROVIRUS.	22
ABBILDUNG 13: VERGLEICH ZWISCHEN DEM AUFBAU DES LENTIVIRALEN VEKTORS pFUGW UND DEM NORMALEN AUFBAU DES HIV-GENOMS.	23
ABBILDUNG 14: SCHEMA DER KLONIERUNG IN DEN LENTIVIRALEN VEKTOR pFUGW (TEILE DER ABBILDUNG WURDEN AUS DEN PUBLIKATIONEN [151] UND [166] ENTNOMMEN).	27
ABBILDUNG 15: FLUORESCENZMIKROSKOP-BILDER VON INFIZIERTEN HEK293T-ZELLEN.	32
ABBILDUNG 16: LASERMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON KONTROLL-ZELLEN UND INFIZIERTEN ZELLEN 72H NACH INFEKTION.	33
ABBILDUNG 17: SCHEMATISCHER ABLAUF FÜR DIE GENECHIP-ANALYSE.	36
ABBILDUNG 18: STRUKTUR DER TETRAZOLIUM-VERBINDUNG (MTS) UND DES GEBILDETEN FORMAZANS.	39
ABBILDUNG 19: PROTEIN-EXPRESSION VON CYCLIN D1, D2 UND D3 IN DEN MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN.	40
ABBILDUNG 20: mRNA-EXPRESSION VON CYCLIN D1, D2 UND D3 IN DEN MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN.	41
ABBILDUNG 21: PROTEIN-EXPRESSION WICHTIGER ZELLYCYKLUS-PROTEINE IN DEN MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN.	43
ABBILDUNG 22: β -GALAKTOSIDASE-ASSAY ALS EFFIZIENZ-TEST FÜR DIE ERSTELLTEN CYCLIN D1-SHRNA-SEQUENZEN.	45
ABBILDUNG 23: WESTERN BLOT ALS EFFIZIENZ-TEST FÜR DIE ERSTELLTEN CYCLIN D1-SHRNA-SEQUENZEN.	47
ABBILDUNG 24: TITRATION DES OPTIMUMS AN VIRENMENGE AM BEISPIEL DER MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIE GRANTA 519.	49
ABBILDUNG 25: INFEKTIONS RATEN IN DEN VERSCHIEDENEN MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN.	51
ABBILDUNG 26: VERMINDERUNG DER EXPRESSION VON CYCLIN D1 IN DEN MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN MIT MITTLERER BIS HOHER INFEKTIONS RATE.	52
ABBILDUNG 27: EINFLUSS DER VERMINDERTEN CYCLIN D1-EXPRESSION AUF DIE WACHSTUMSRATE DER ZELLEN.	54
ABBILDUNG 28: EINFLUSS DER VERMINDERTEN CYCLIN D1-EXPRESSION AUF DEN ZELLYCYKLUS DER ZELLEN.	55
ABBILDUNG 29: EINFLUSS DER VERMINDERTEN CYCLIN D1-EXPRESSION AUF DIE APOPTOSE-RATE DER ZELLEN.	57

ABBILDUNG 30: UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON CYCLIN D2 UND D3 NACH CYCLIN D1-HINUNTERREGULATION.	58
ABBILDUNG 31: PARALLELE HINUNTERREGULATION VON CYCLIN D1 UND D2 IN DER MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIE GRANTA 519.	60
ABBILDUNG 32: RNA-ANALYSE AM BEISPIEL DER GRANTA 519-PROBEN.	62
ABBILDUNG 33: HIERARCHISCHE CLUSTER-ANALYSE IM TEILENDEN VERFAHREN FÜR DIE NORMALISIERTEN DATEN ALLER DREI MIKROARRAY-EXPERIMENTE.	63
ABBILDUNG 34: GENEXPRESSIONSPROFIL DER DREI TAGE INFIZIERTEN GRANTA 519-ZELLEN.	65
ABBILDUNG 35: GENEXPRESSIONSPROFIL DER SIEBEN TAGE INFIZIERTEN GRANTA 519-ZELLEN.	68
ABBILDUNG 36: GENEXPRESSIONSPROFIL DER SIEBEN TAGE INFIZIERTEN Z-138-ZELLEN.	70
ABBILDUNG 37: VERTEILUNG DER GENE AUF VERSCHIEDENE BIOLOGISCHE PROZESSE.	72
ABBILDUNG 38: VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER GENE AUS DEN GENEXPRESSIONSPROFILEN GRUPPE: "PROLIFERATION SIGNATURE"	78
ABBILDUNG 39: VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER GENE AUS DEN GENEXPRESSIONSPROFILEN GRUPPE: ZELLZYKLUS/ REPLIKATION	79
ABBILDUNG 40: VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER GENE AUS DEN GENEXPRESSIONSPROFILEN GRUPPE: DNA-REPARATUR	80
ABBILDUNG 41: VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER GENE AUS DEN GENEXPRESSIONSPROFILEN GRUPPE: TRANSKRIPTION	81
ABBILDUNG 42: VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER GENE AUS DEN GENEXPRESSIONSPROFILEN GRUPPE: SIGNALLING	83
ABBILDUNG 43: VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER GENE AUS DEN GENEXPRESSIONSPROFILEN GRUPPE: IMMUN-SIGNALLING	84
ABBILDUNG 44: VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER GENE AUS DEN GENEXPRESSIONSPROFILEN GRUPPE: APOPTOSE	85
ABBILDUNG 45: VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER GENE AUS DEN GENEXPRESSIONSPROFILEN GRUPPE: VERSCHIEDENE PROZESSE	86
ABBILDUNG 46: PATHOGENETISCHES MODELL FÜR DIE ENTSTEHUNG UND WEITERENTWICKLUNG DES MANTELZELL-LYMPHOMS.	94

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: FÜR DIE TESTUNG HINSICHTLICH IHRER TATSÄCHLICHEN EFFIZIENZ GEGEN CYCLIN D1 AUSGEWÄHLTE siRNA-SEQUENZEN.	26
TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN.	31
TABELLE 3: FÜR DIE VALIDIERUNG MITTELS QRT-PCR AUSGEWÄHLTE GENE AUS DEN GEP.	74
TABELLE 4: HÄUFIG VERÄNDERTE, CHROMOSOMALE REGIONEN IM MANTELZELL-LYMPHOM.	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat	MOI	Multiplicity Of Infection
bidest.	bidestilliert	mRNA	messenger-RNA
BSA	Bovinseralbumin	ml/ μ l	Milliliter/ Mikroliter
$^{\circ}$ C	Grad Celsius	m/V	Massenkonzentration
CD	Clusters of Differentiation	ng/ μ g	Nanogramm/ Mikrogramm
cDNA	komplementäre DNA	nM/ μ M	nanomolar/ mikromolar
CMV	Cytomegalie-Virus	nm	Nanometer
cRNA	komplementäre RNA	ORF	Open Reading Frame
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure	PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
dsRNA	doppelsträngige RNA	PBS	Phosphate Buffered Saline
EBV	Epstein-Barr-Virus	PCR	Polymerasekettenreaktion
(E)GFP	(Enhanced) Green Fluorescence Protein	PIC	Prä-Integrations-Komplex
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting	qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
FAM	6-Carboxyfluorescein	RISC	RNA-Induced Silencing Complex
FDR	False Discovery Rate	RNA	Ribonukleinsäure
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization	RNAi	RNA-Interferenz
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat	rpm	Rotationen pro Minute
x g	relative Zentrifugalkraft	RT	Raumtemperatur
GEP	Genexpressionsprofil	SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	sec	Sekunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	siRNA	small interfering RNA
HRP	Meerrettich-Peroxidase	shRNA	short hairpin RNA
Ig	Immunglobulin	snRNA	small nuclear RNA
IVT	<i>in vitro</i> Transkription	TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
LB	Lysogeny Broth	TBS	Tris Buffered Saline
LTR	Long Terminal Repeat	TBP	TATA-Box Bindendes Protein
M	molar	UTR	Untranslatierte Region
MCL	Mantle Cell Lymphoma	ü.N.	über Nacht
min	Minute	VSV-G	Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus
Mio.	Million	V/V	Volumen pro Volumen
miRNA	mikro-RNA	WHO	Welt-Gesundheits-Organisation
miRNP	miRNA enthaltender Ribonukleoprotein-Partikel	WRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional Regulatory Element
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus		

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Mantelzell-Lymphom entwickelt sich aus den reifen B-Lymphozyten in der Mantelzone lymphatischer Follikel und ist infolge der charakteristischen Translokation t(11;14)(q13;q32) durch eine Überexpression von Cyclin D1 gekennzeichnet. Obwohl man aufgrund der zentralen Rolle von Cyclin D1 im Zellzyklus davon ausgeht, dass seine Überexpression eine initiierende Rolle in der Tumor-Entwicklung spielt, konnte dies durch bisherige Studien nicht klar bestätigt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, diese Fragestellung durch die gezielte Ausschaltung von Cyclin D1 mittels RNA-Interferenz (RNAi) zu lösen. Dabei dienten gut charakterisierte Mantelzell-Lymphom-Zelllinien als Modell-System.

Durch die Selektion einer hoch effizienten siRNA und dem erfolgreichen Transfer dieser siRNA in die Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mittels lentiviraler Infektion konnte eine ausreichende Verminderung der Expression von Cyclin D1 erreicht werden.

Überraschenderweise führte diese Verminderung der Cyclin D1-Expression in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien nur zu einer moderaten Wachstums-Verzögerung und induzierte keine Apoptose. Im Bezug auf den Zellzyklus zeigten die behandelten Zelllinien im Durchschnitt eine 15%ige Verschiebung von der S- zur G₁-Phase, eine schwache Induktion der Expression des Zellzyklus-Inhibitors p27^{Kip1} und eine Aktivierung des wachstumshemmenden Retinoblastoma-Proteins (Rb) durch eine Verminderung seiner Phosphorylierung an den Serin-Resten 807 und 811. Außerdem konnte in allen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien nach Hemmung der Cyclin D1-Expression eine Induktion von Cyclin D2 auf RNA- und Protein-Ebene beobachtet werden.

Da der kompensatorische Anstieg an Cyclin D2-mRNA und Cyclin D2-Protein eine mögliche Erklärung für die nur schwachen beobachteten Effekte nach der Blockierung von Cyclin D1 sein könnten, wurden in einem weiteren Experiment durch die parallele Zugabe einer Cyclin D1- und Cyclin D2-siRNA beide Proteine in ihrer Expression gehemmt. Obwohl diese Behandlung lediglich die vorher beobachtete Induktion der Cyclin D2-Expression verhinderte und keine Verminderung unter die Ausgangs-Konzentrationen von Cyclin D2 erreicht wurde, wurde dennoch deutlich, dass die parallele Repression beider D-Typ-Cycline die durch die alleinige Blockierung von Cyclin D1 erzielten Effekte nicht intensivierten.

Es ist also davon auszugehen, dass zwischen Cyclin D1 und Cyclin D2 nur eine regulatorische Abhängigkeit besteht, die für das Überleben der Zellen nicht entscheidend ist.

Somit liegt die Erklärung für die geringe Abhängigkeit der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien von der Cyclin D1-Expression wohl eher darin, dass das unverminderte Wachstum über Cyclin-unabhängige Mechanismen erreicht wird. Alternativ könnte der durch die Cyclin D1-Überexpression initiierte Wachstumsvorteil bei der Lymphomgenese durch sekundäre genetische Veränderungen abgelöst werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde von den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Granta 519 und Z-138 ein vergleichendes Genexpressionsprofil (GEP) vor und nach der Behandlung mit der Cyclin D1-siRNA erstellt. Dies sollte dazu dienen, ein umfassenderes Bild von den durch die Cyclin D1-Blockierung bewirkten Expressionsunterschieden zu bekommen. Im GEP der drei und sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen waren 139 bzw. 217 Gene signifikant verändert (mehrheitlich induziert) und im GEP der sieben Tage infizierten Z-138-Zellen waren 236 Gene signifikant verändert (mehrheitlich reprimiert). Dabei lag in den Granta 519-GEP mit einem Anteil von 18,6% der Schwerpunkt auf den Zellzyklus- und Signaltransduktions-Genen, während beim Z-138-GEP der Nukleinsäure-Stoffwechsel mit vielen veränderten Histon-Genen den größten Anteil hatte (19,2%). Insgesamt wurden einerseits Gene identifiziert, deren Zusammenhang mit Cyclin D1 bzw. mit dem Mantelzell-Lymphom schon bekannt war, andererseits war aber bezüglich einiger Gene ihre Abhängigkeit von der Cyclin D1-Überexpression eine neue Erkenntnis.

Die Übertragung der hier erhaltenen Ergebnisse auf Patienten-Material könnte in weiterführenden Arbeiten möglicherweise zur Entwicklung neuer prognostischer Marker und zu gezielteren Therapie-Möglichkeiten beim Mantelzell-Lymphom führen.

2. EINLEITUNG

2.1 Das Mantelzell-Lymphom und Cyclin D1

2.1.1 Entstehung eines Lymphoms

Zu den wesentlichen Komponenten des menschlichen Immunsystems gehören die weißen Blutkörperchen (Leukozyten), welche die angeborene und erworbene Immunantwort des Körpers steuern. Dabei wird die erworbene Immunantwort durch die Subgruppe der B- und T-Lymphozyten gesteuert, die zunächst im Knochenmark und im Thymus reifen und dann zum Aufspüren möglicher Fremdkörper im Blut und im lymphatischen System zirkulieren.

Name des Tumors	normales Zelläquivalent	Lokalisation	Zustand der V-Gene der Ig
chronische lymphatische Leukämie (CLL)	CD5-B-1-Zelle	Blut	normalerweise nicht mutiert
akute lymphatische Leukämie	lymphatischer Vorläufer	Knochenmark und Blut	nicht mutiert
Prä-B-Zell-Leukämie	Prä-B-Zelle	Prä-B-Rezeptor	nicht mutiert
Mantelzellenlymphom	ruhende naive B-Zelle		nicht mutiert
Lymphom von Zellen des Follikelzentrums Burkitt-Lymphom	reife B-Gedächtniszelle ähnelt der B-Zelle im Keimzentrum	Peripherie	mutiert, intraklonale Variabilität
Hodgkin-Lymphom	B-Zelle aus dem Keimzentrum		mutiert, +/- intraklonale Variabilität
Waldenström-Makroglobulinämie	IgM-sezierende B-Zelle		mutiert, keine Variabilität im Klon
multiple Myelome	Plasmazelle, verschiedene Isotypen	Knochenmark	mutiert, keine Variabilität im Klon

Abbildung 1: Ein B-Zell-Lymphom ist eine klonale Expansion von B-Zellen eines bestimmten Reifungsstadiums. Jedem Tumortyp kann eine entsprechende normale B-Zelle zugeordnet werden. Dabei bewahrt die Tumorzelle viele Charakteristika der ursprünglichen Zelle wie z.B. Aussehen, Lokalisation und Zustand der Immunglobulin-Gene. Das Mantelzell-Lymphom (rote Markierung) entsteht aus B-Zellen, die einerseits schon aus dem Knochenmark in das lymphatische System übergegangen sind, andererseits aber noch keinen Antigen-Kontakt hatten (= naiv) und sich in der Mantelzone lymphatischer Follikel befinden. Die Abbildung wurde aus der Publikation [1] entnommen.

Vor allem beim Reifungsprozess können sich die B- und T-Lymphozyten krebsartig verändern und zu einem B- bzw. T-Zell-Lymphom entwickeln. Je nachdem, bei welchem Reifungsschritt diese Fehlentwicklung stattfindet, unterscheidet man allein beim B-Zell-Lymphom 25 verschiedene Entitäten [2]. Eine dieser Krankheiten ist das Mantelzell-Lymphom, bei dem man davon ausgeht, dass es aus reifen, ruhenden B-Zellen entsteht, die noch keinen Antigen-Kontakt hatten (= naiv) und sich in der Mantelzone lymphatischer Follikel befinden (Abbildung 1) [1].

2.1.2 Allgemeine Charakteristika des Mantelzell-Lymphoms

2.1.2.1 Klinische Faktoren

Bezogen auf die Zahl der Krebs-Neuerkrankungen in Deutschland haben Lymphome einen Anteil von 7%. Davon liegt der Anteil der diagnostizierten Mantelzell-Lymphome bei etwa 5%, d.h. die Inzidenz dieser Tumoren ist insgesamt relativ gering. Das mittlere Alter der Patienten, die etwa zu zwei Dritteln Männer sind, beträgt etwa 60 Jahre und zum Zeitpunkt der Diagnose wächst der Tumor meistens disseminiert [3]. Das Mantelzell-Lymphom, das vereinzelt auch familiär auftreten kann [4], hat aufgrund seines aggressiven Verlaufs eine sehr schlechte Prognose mit einer mittleren Überlebensrate von 3 Jahren, die sich bei der aggressiveren, blastischen Variante (siehe nächster Abschnitt) sogar noch auf unter 2 Jahre verringert [2, 3]. Im Übrigen gibt es bis für Mantelzell-Lymphome keine standardisierte Therapie (siehe Abschnitt 2.1.6).

2.1.2.2 Morphologie

Nach der WHO-Klassifikation [2] wird beim Mantelzell-Lymphom zwischen zwei morphologischen Subtypen unterschieden (Abbildung 2). Die klassische Variante ist charakterisiert durch die monomorphe Expansion kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten mit irregulären Kernen, kondensiertem Chromatin, unauffälligen Nucleoli und wenig Zytoplasma [2, 5-7]. Die Zellen bei der blastischen Variante sind mittelgroße Lymphozyten, die Lymphoblasten ähneln, mit hellem Cytoplasma, abgerundeten Kernen mit fein verteiltem Chromatin und unauffälligen Nucleoli. Der mitotische Index (Zellteilungs-Index) als Maß für die Proliferationsrate in einem Gewebe ist niedrig in der klassischen und hoch in der blastischen Variante. Es wird oft angenommen, dass die blastische Variante die Transformation der klassischen Variante repräsentiert (siehe Abschnitt 5.2.3), obwohl diese Transformation selten zu

sehen ist. Weiterhin unterscheidet man in Abhängigkeit vom Muster der Infiltration des Lymphknotens durch den Tumor zwischen Mantelzonen-Wachstum, nodulärem oder diffusem Wachstum.

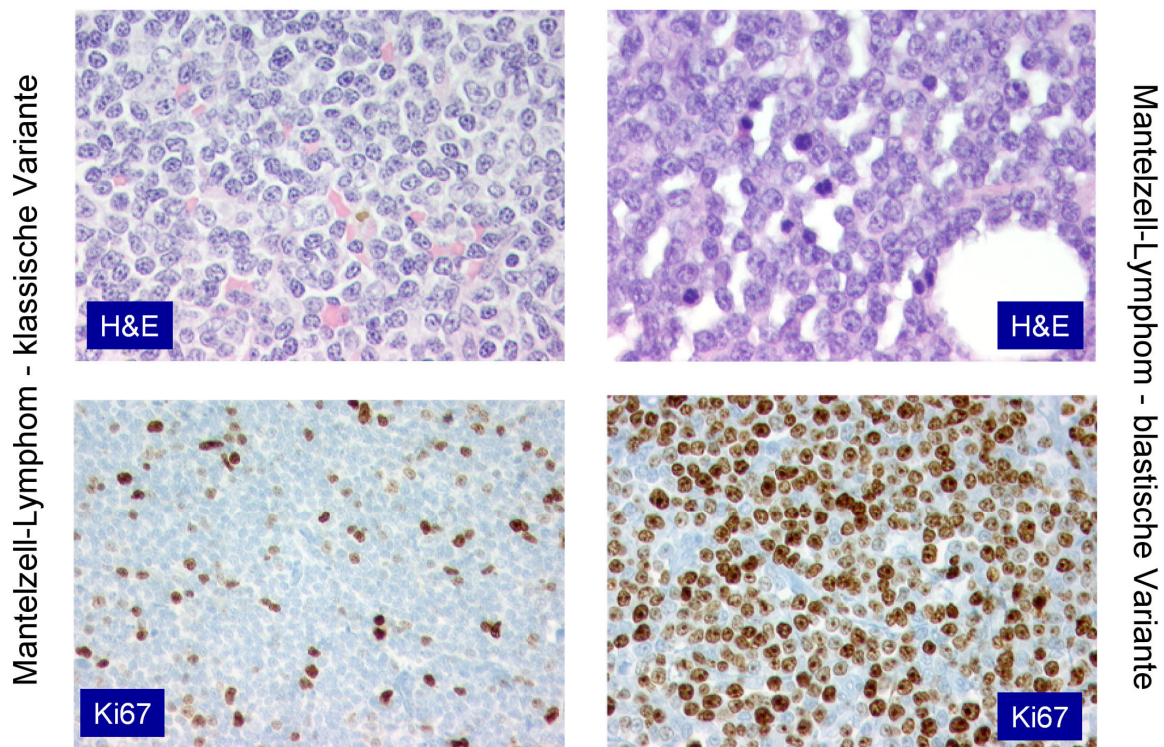


Abbildung 2: Morphologie-Subtypen beim Mantelzell-Lymphom. Bild links oben: klassische Variante des Mantelzell-Lymphoms mit kleinen bis mittelgroßen Zellen, die sich durch ein hohes Kern/Cytoplasma-Verhältnis auszeichnen (H&E = Hämatoxylin-Eosin-Färbung). Bild links unten: mitotischer Index bei der klassischen Variante des Mantelzell-Lymphoms, dargestellt durch die immunhistochemische Färbung des Proliferations-Markers Ki67. Der Anteil der positiven Zellen (braun gefärbt) beträgt 15%. Bild rechts oben: blastische Variante des Mantelzell-Lymphoms mit mittelgroßen Zellen, die sich durch blastisches Chromatin und viele Mitosen auszeichnen. Bild rechts unten: mitotischer Index bei der blastischen Variante des Mantelzell-Lymphoms, dargestellt durch die immunhistochemische Färbung des Proliferations-Markers Ki67 (80% positive Zellen).

2.1.2.3 Immunphänotyp

Die Mantelzell-Lymphom-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche diejenigen Marker, die normalerweise von reifen B-Zellen exprimiert werden, d.h. sie sind positiv für IgM und/oder IgD, CD19, CD20, CD22, CD24, CD45 und CD79A [2, 5, 7, 8]. Außerdem exprimieren sie meist CD5 und CD43, aber nicht CD10 und CD23 als Oberflächen-Antigene. Ein weiterer Marker ist die Expression von Cyclin D1 infolge der für das Mantelzell-Lymphom charakteristischen t(11;14)-Translokation. Da in den normalen B-Lymphozyten ausschliesslich die Expression von Cyclin D2 und Cyclin D3 vorkommt und speziell im Mantelzell-Lymphom von der abnormen Cyclin D1-Expression hinunterreguliert wird (Abbildung 3) [9-11], ist die nukleäre Cyclin D1-

Positivität bei der immunhistochemischen Färbung ein diagnostisches Kriterium für das Mantelzell-Lymphom.

Das Mantelzell-Lymphom entwickelt sich aus B-Zellen, die noch keinen Antigen-Kontakt hatten, daher sollten die variablen Regionen der Immunglobulin-Gene noch nicht den Prozess der somatischen Hypermutation durchlaufen haben [12]. Vor ein paar Jahren wurde aber festgestellt, dass etwa 25% aller Mantelzell-Lymphome Mutationen in den Immunglobulin-Genen, die für die schweren Ketten kodieren, tragen. Dies deutet darauf hin, dass die Ausgangs-Zellen des Lymphoms schon eine gewisse Antigen-Selektion durchlaufen haben müssen [13].

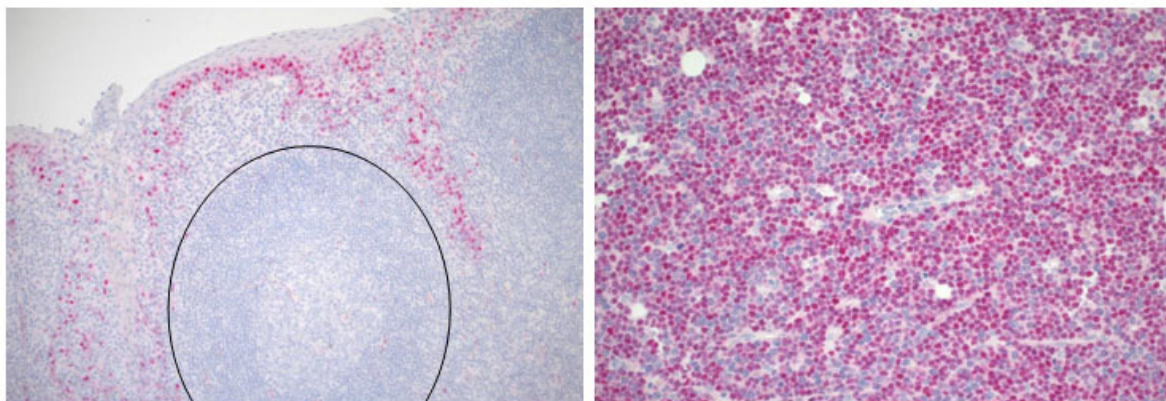


Abbildung 3: Expression von Cyclin D1 in normalen B-Lymphozyten (Bild links, schwarze Umrandung) und im Mantelzell-Lymphom (Bild rechts). Immunhistochemische Färbung von Cyclin D1: im Mantelzell-Lymphom sind nahezu 100% der Zellen Cyclin D1-positiv (violett), während die normalen B-Lymphozyten negativ für Cyclin D1 sind (blaue Färbung). Die im linken Bild positiven Zellen entsprechen den epithelialen Zellen der Tonsille.

2.1.2.4 Genetik

Das genetische Charakteristikum beim Mantelzell-Lymphom ist die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, die zu einer deregulierten Expression von Cyclin D1 führt [14-18]. Ursache dafür ist die Neu-Positionierung des Cyclin D1-Gens (11q13) in die Nähe starker transkriptioneller Enhancer-Sequenzen des Immunglobulin-Gens, das für die schweren Ketten kodiert (IgH) (14q32). Aufgrund der Analyse der Neuordnung an den Bruchpunkten geht man davon aus, dass die Translokation bei der Rekombination des D- und J-Gensegments der schweren Ketten in Prä-B-Zellen stattfindet (Abbildung 4) [19]. Da diese Translokation ein Hauptmerkmal des Mantelzell-Lymphoms ist, wird ihr Nachweis mittels FISH (= fluorescence in situ hybridization) für die Diagnostik genutzt [20, 21].

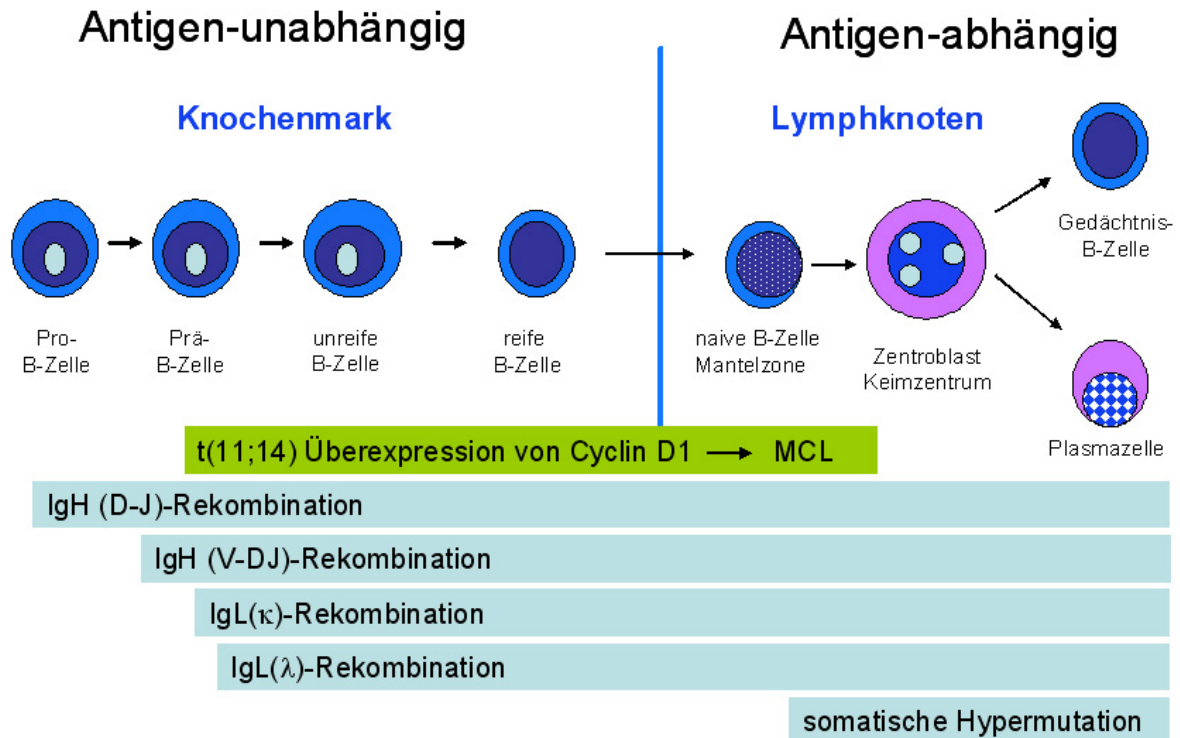


Abbildung 4: Stadien der B-Zell-Reifung. Die ersten Schritte der B-Zell-Reifung finden Antigen-unabhängig im Knochenmark statt, die späteren Schritte Antigen-abhängig im Lymphknoten. Man geht davon aus, dass die zur Cyclin D1-Überexpression führende Translokation t(11;14) bei der Rekombination des D- und J-Segments der schweren Ketten (IgH) in Prä-B-Zellen stattfindet. Das Mantelzell-Lymphom (MCL) selbst entwickelt sich aus den reifen, naiven B-Zellen in der Mantelzone lymphatischer Follikel. Was zwischen diesen beiden Schritten hinsichtlich der Entwicklung des Mantelzell-Lymphoms passiert, ist noch unbekannt.

Ausgehend vom Cyclin D1-Gen existieren zwei verschiedene Transkripte mit etwa 4,5 kb und 1,7 kb Länge (Abbildung 5). Während beide Transkripte die kodierende Region enthalten, unterscheiden sie sich in der Länge der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) [22]. Diese enthält nur beim längeren Transkript ein AU-reiches Element, welches das Transkript insgesamt destabilisiert [23]. Bezogen auf das Mantelzell-Lymphom hat man herausgefunden, dass infolge von sekundären DNA-Umbrüchen oder genomischen Deletionen und Punktmutationen in der 3'-UTR bei manchen Fällen kein langes Transkript, sondern nur kürzere Transkripte von Cyclin D1 exprimiert werden [9, 24, 25]. Die Expression dieser kürzeren Transkripte korreliert mit hohen Konzentrationen an Cyclin D1-mRNA, einer erhöhten Wachstumsrate und einer schlechteren Prognose, so dass man davon ausgeht, dass die sekundären Veränderungen in der 3'-Region von Cyclin D1 entscheidend für die Ausbreitung des Lymphoms sind [25-27]. Außerdem existiert eine Spleiß-Variante des Cyclin D1-Proteins (Cyclin D1b), sie scheint aber nach bisherigen Untersuchungen aufgrund

ihrer geringen Expressions-Rate beim Mantelzell-Lymphom keine wichtige Rolle zu spielen [28, 29].

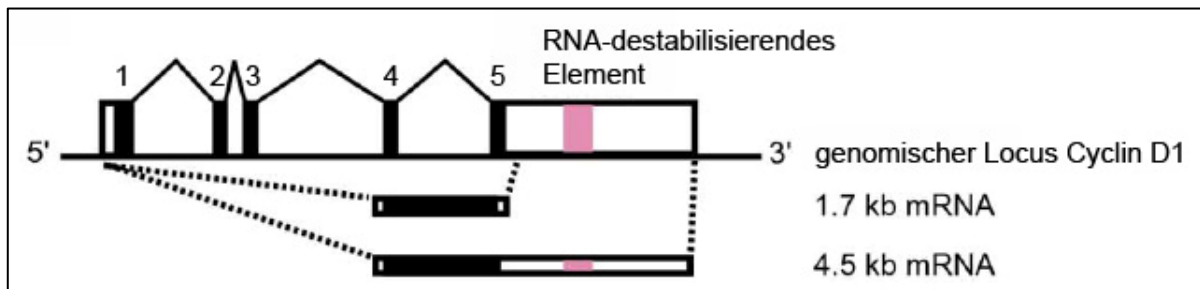


Abbildung 5: Genomischer Locus von Cyclin D1. Alternative 3'-Polyadenylierungsstellen führen zur Expression einer kurzen (1,7 kb) und einer langen (4,5 kb) Cyclin D1-mRNA. Die Abbildung wurde der Publikation [26] entnommen und modifiziert.

Neben der Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ treten beim Mantelzell-Lymphom weitere, immer wiederkehrende genomische Veränderungen auf. Genomische Zugewinne treten dabei häufig auf den langen Armen der Chromosomen 3 und 18 und genomische Verluste auf den kurzen Armen der Chromosomen 1 und 9 sowie auf den langen Armen der Chromosomen 9, 6 und 11 auf. Die von diesen genomischen Veränderungen betroffenen Zielgene beeinflussen vor allem die Regulation des Zellzyklus (*CDKN2A/ARF1*, *CDK4*, *RB1*, *BMI1*, *p53*, *MDM2*), der DNA-Reparatur (*ATM*, *CHK2*) und der Apoptose (*BCL2*, *BIM*, *MCL1*) betreffen (siehe Diskussion, Abschnitt 5.2.2). Dabei haben Fälle mit drei oder mehr genomischen Veränderungen, DNA-Zugewinnen im Bereich 3q27 und DNA-Verlusten im Bereich 8p21, 9p21 und 9q21-q32 eine schlechte Prognose zur Folge, was den klinischen Verlauf betrifft [30].

2.1.2.5 Cyclin D1-negative Mantelzell-Lymphome

Vor drei Jahren konnte innerhalb einer Genexpressionsprofil-Studie zum Mantelzell-Lymphom eine kleine Gruppe von Tumoren identifiziert werden, die negativ für die $t(11;14)$ -Translokation war, jedoch vom Mantelzell-Lymphom nicht unterscheidbar bezüglich anderer Merkmale (Morphologie, Immuno-Phänotyp, Genexpressionsprofil) [31]. Diese seltenen Fälle Cyclin D1-negativer Mantelzell-Lymphome exprimieren meist Cyclin D2 oder Cyclin D3 anstelle von Cyclin D1 über und die Überexpression von Cyclin D2 kann hier Folge einer Translokation sein, die zu einer Fusion zwischen dem Cyclin D2-Gen auf Chromosom 12 und dem Immunglobulin-Gen der leichten ($Ig\kappa$; Chromosom 2) oder der schweren Ketten (IgH ; Chromosom 14) führt.

2.1.3 Allgemeine Funktionen von Cyclin D1

Grundsätzlich kann man Cyclin D1 drei Funktionen zuordnen: zum ersten spielt es über die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/ CDK6) eine wichtige Rolle beim Übergang von der G₁- zur S-Phase im Zellzyklus (Abbildung 6A). Die zweite Funktion, das Abfangen der CDK-inhibitorischen Proteine p21^{Cip1} und p27^{Kip1} im Komplex mit CDK4 und CDK6 trägt ebenfalls zum Voranschreiten der G₁-Phase im Zellzyklus bei (Abbildung 6B). Schließlich besitzt Cyclin D1 auch noch die Eigenschaft, unabhängig von seinen katalytischen Partnern CDK4 und CDK6 die Aktivität von Transkriptionsfaktoren zu verändern (Abbildung 6C) [32].

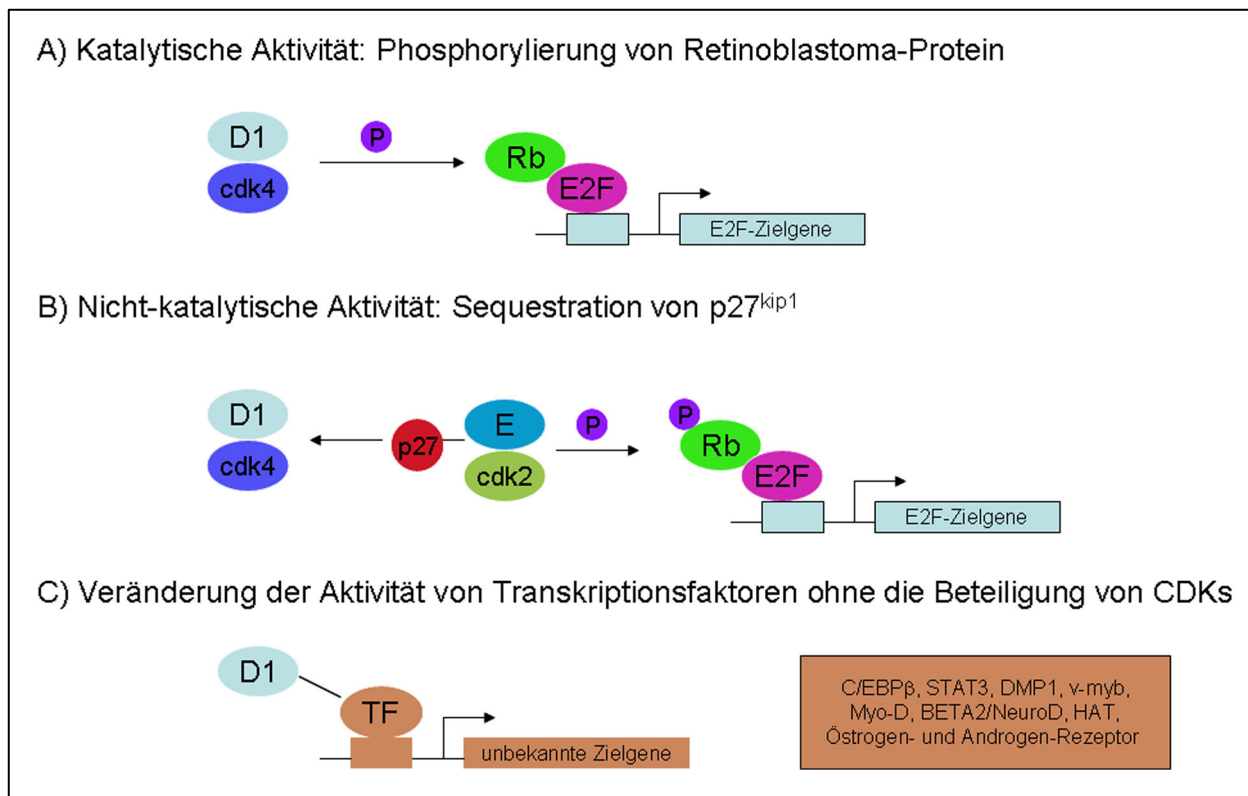


Abbildung 6: Biochemische Funktionen von Cyclin D1. Die Abbildung wurde der Publikation [32] entnommen und modifiziert.

Generell wird der Übergang von der G₁- zur S-Phase im Zellzyklus von zwei Enzym-Familien kontrolliert, den Cyclin D- und den Cyclin E-abhängigen Kinasen [33-36]. Während diese Kinasen relativ langlebige Proteine sind, sind die dazugehörigen Cycline instabil und in ihrer Aktivität abhängig von andauernden mitogenen Signalen [37]. Liegen diese Signale vor, so können zunächst die D-Typ-Cycline an ihre Partner-Kinasen CDK4 bzw. CDK6 binden und sie dadurch aktivieren, worauf es zu einer Phosphorylierung des wachstumshemmenden Retinoblastoma-Proteins (Rb) kommt (Abbildung 6A) [38, 39]. Rb reprimiert die Transkription von Genen, die zur

DNA-Synthese benötigt werden, in dem es einerseits die entsprechenden Transkriptionsfaktoren direkt bindet (E2F) und andererseits die zugehörigen Promotoren blockiert [40-43]. Nach Aufhebung dieser Interaktionen durch die Phosphorylierung von Rb können die E2F-Zielgene aktiviert werden, unter denen sich neben vielen Genen für den DNA-Stoffwechsel auch Cyclin E befindet. Da Cyclin E im Komplex mit seiner zugehörigen Kinase CDK2 ebenfalls fähig ist Rb zu phosphorylieren, ist der G₁-S-Restriktionspunkt im Zellzyklus damit endgültig überwunden [44-46].

Ein großer Unterschied zwischen den Cyclin E- und Cyclin D-abhängigen Kinasen besteht darin, dass die ersteren von den CDK-Inhibitoren p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} blockiert werden können, während die zweiten diese Inhibitoren benötigen, um überhaupt einen aktiven Komplex bilden zu können [47, 48]. Während also in ruhenden Zellen die hohen Konzentrationen an Cip/Kip-Proteinen die Cyclin E-CDK2-Komplexe vollständig inhibieren, werden in sich teilenden Zellen die Inhibitoren mehr und mehr für die Komplexbildung der Cyclin D-abhängigen Kinasen benötigt und damit abgefangen (Abbildung 6B) [49]. Dadurch werden die Cyclin E-CDK2-Komplexe frei und aktiviert und können nun selbst als Gegenspieler ihrer Inhibitoren fungieren, indem sie p27^{Kip1} phosphorylieren und damit für den Abbau im Proteasom markieren [50-54]. Somit führt auch hier das Zusammenspiel beider Kinase-Familien zur endgültigen Überwindung des G₁-S-Restriktionspunkts.

Die dritte Funktion von Cyclin D1 liegt in der Beeinflussung der Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren unabhängig von CDK4 oder CDK6 und ist noch nicht lange bekannt. Zu den beeinflussten Transkriptionsfaktoren gehören neben dem Östrogen-, Androgen- und Schilddrüsenhormon-Rezeptor sowie myogenen Faktoren auch Myb, DMP1, STAT3, SP1, BETA2/NeuroD und CEBP β (Abbildung 6C). Dabei erfolgt meistens eine Repression der transkriptionellen Aktivität [32, 55-63]. Der Effekt von Cyclin D1 hängt in diesem Fall meist von einem direkten oder indirekten Kontakt zwischen Cyclin und Transkriptionsfaktor ab. Zusätzlich wurde auch gezeigt, dass Cyclin D1 mit verschiedenen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie interagiert [64-68]. Insgesamt ist diese Funktion von Cyclin D1 noch umstritten, da sie bisher nur mit transfizierten Reporter-gen-Konstrukten gezeigt werden konnte und noch keine Daten zu direkten Effekten auf endogene Gene existieren.

Im Bezug auf den Zellzyklus sind im Zusammenhang mit Cyclin D1 noch folgende Proteine zu erwähnen (Abbildung 7): neben den zwei Absätze vorher beschriebenen CDK-Inhibitoren der Cip/Kip-Familie existieren noch die CDK-Inhibitoren der INK4-Familie mit den Mitgliedern p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}, die Cyclin D und die Cip/Kip-Proteine aus ihrem Komplex mit CDK4 und CDK6 verdrängen (INK4 = inhibit CDK4). Durch die Freisetzung der Cip/Kip-Proteine wird dadurch indirekt auch Cyclin E-CDK2 inhibiert [49].

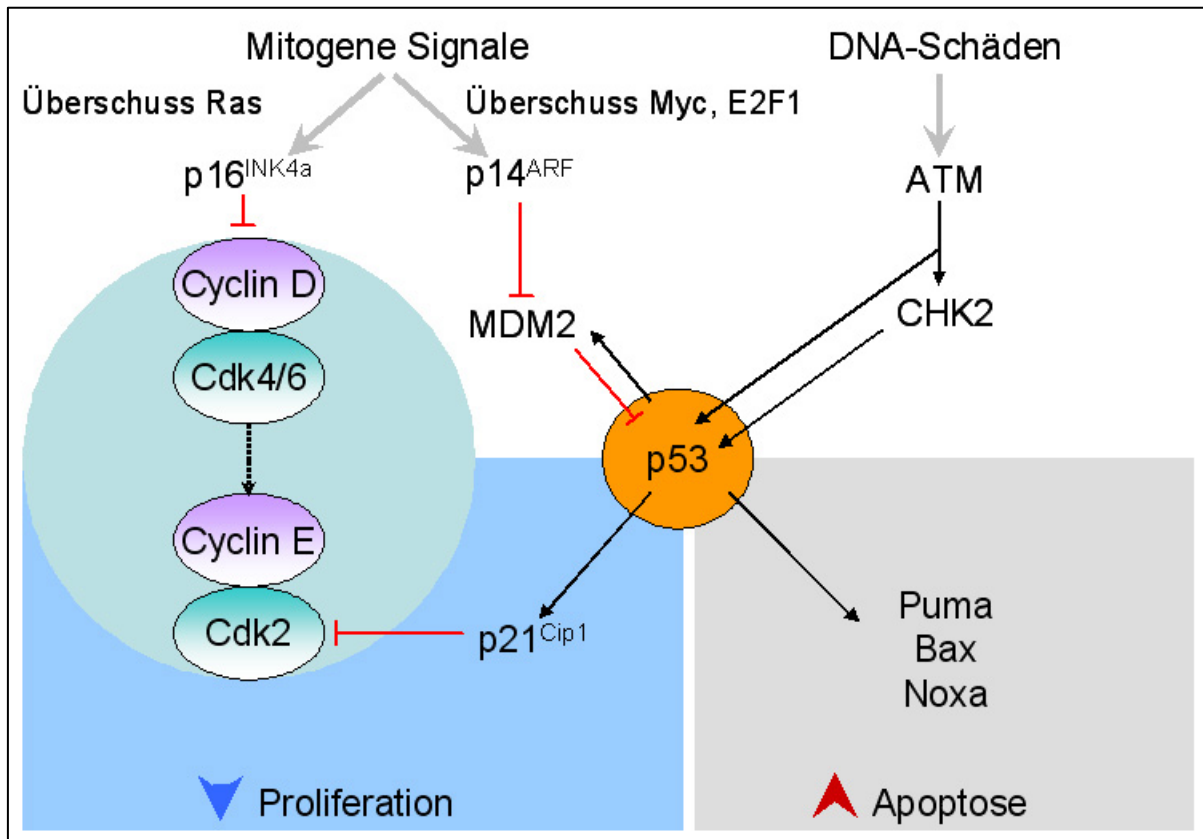


Abbildung 7: p14^{ARF}-MDM2-p53-Signalweg. Aberrante mitogene Signale (z.B. durch die Überexpression der Onkoproteine Ras, Myc oder E2F1) entziehen sich der Kontrolle des Tumorsuppressor-Proteins Rb. Alternativ wird durch diese Signale der Tumorsuppressor p14^{ARF} induziert, der als Gegenspieler des MDM2-Proteins fungiert und damit p53 aktiviert. Die Induktion von p53 führt über verschiedene Signalwege zum Wachstumsarrest und/oder zu Apoptose.

Außerdem entsteht aus dem Gen, das für den CDK-Inhibitor p16^{INK4a} kodiert, über ein alternatives Leseraster ein zweiter Tumorsuppressor (= p14^{ARF}; ARF = Alternative ReadinG Frame) [69]. Dieser beeinflusst das Gleichgewicht zwischen dem Tumorsuppressor-Protein p53 und seinem Gegenspieler Mdm2, indem es Mdm2 inhibiert und damit p53 stabilisiert [70-73]. p53 ist ein wichtiger Sensor für DNA-Schäden und kann auf diese hin Wachstumsarrest und Apoptose induzieren. p14^{ARF} funktioniert in diesem gesamten System als eine Art Schalter zwischen dem Rb- und dem p53-Signalweg und übermittle abberante mitogene Signale an p53 (Abbildung

7) [74]. Beide Signalwege werden daher in Tumoren häufig durch Gen-Mutationen ausgeschaltet [75].

2.1.4 Cyclin D1 und Onkogenese

Eine deregulierte Cyclin D1-Expression scheint bei vielen verschiedenen Tumor-Arten eine entscheidende Rolle zu spielen, denn sie tritt ausser bei B-Zell-Lymphomen (Mantelzell-Lymphom und Multiples Myelom) auch bei Karzinomen des Magens, der Kopf-Hals-Region sowie der Brust und des Darms auf [76-82]. Dabei kann die Überexpression Folge einer Gen-Amplifikation (z.B. beim Multiplen Myelom und bei den Karzinomen), einer chromosomalen Translokation (Mantelzell-Lymphom) oder einer Stabilisierung auf RNA- oder Proteinebene sein [75]. Dass der dritte Punkt, die Stabilisierung auf RNA- oder Proteinebene, beim Mantelzell-Lymphom ebenfalls eine nicht unerhebliche Rolle spielt, wurde schon im Abschnitt 2.1.2.4 bei der Beschreibung der Cyclin D1-Transkriptvarianten deutlich.

Aufgrund der zentralen Rolle von Cyclin D1 im G₁-S-Übergang des Zellzyklus (Abschnitt 2.1.3) könnte man erwarten, dass durch die Überexpression von Cyclin D1 der supprimierende Effekt von Rb überwunden wird und die E2F-Zielgene vermehrt transkribiert werden können, es insgesamt also zu einer Deregulation des Zellzyklus kommt.

Dagegen spricht aber, dass Rb in der Mehrheit der Mantelzell-Lymphome normal exprimiert wird und nur in Fällen mit der aggressiveren, blastischen Variante des Lymphoms teilweise hyperphosphoryliert vorliegt [83, 84]. Außerdem wurden vor kurzem bei einigen Mantelzell-Lymphom-Fällen Deletionen innerhalb des Rb-Gens gefunden, so dass Cyclin D1 in diesen Tumoren eine onkogene Rolle unabhängig von Rb spielen muss [85]. Zusätzlich zeigen Cyclin D1-überexprimierende Tumore weder erhöhte Konzentrationen des E2F-Zielgens Cyclin E noch insgesamt eine erhöhte Proliferationsrate [86, 87].

Weiterhin ist noch nicht geklärt, ob die Cyclin D1-Überexpression hinsichtlich des nicht-katalytischen Abfangens des CDK-Inhibitors p27^{Kip1} (Abschnitt 2.1.3) eine tumorfördernde Rolle spielt. Bei allen Non-Hodgkin-Lymphomen außer dem Mantelzell-Lymphom findet man eine inverse Korrelation zwischen der Expression von p27^{Kip1} und der Proliferationsrate der Tumoren. Dagegen konnte bei einer immunhistochemischen Untersuchung der p27^{Kip1}-Expression im Mantelzell-Lymphom nur eine Expression in Fällen mit der blastischen Variante des Lymphoms,

die sich durch eine hohe Proliferationsrate auszeichnen, gefunden werden [88] (Abbildung 8). Dass beim Mantelzell-Lymphom keine Korrelation zwischen $p27^{Kip1}$ -Expression und Proliferationsrate festgestellt werden konnte, liegt möglicherweise daran, dass hier $p27^{Kip1}$ vermehrt über das Proteasom abgebaut wird [89, 90], oder dass es aufgrund der Komplexbildung mit dem überexprimierten Cyclin D1 nicht möglich ist, vorhandenes $p27^{Kip1}$ immunhistochemisch nachzuweisen (kein Zugang des Antikörpers) [91].

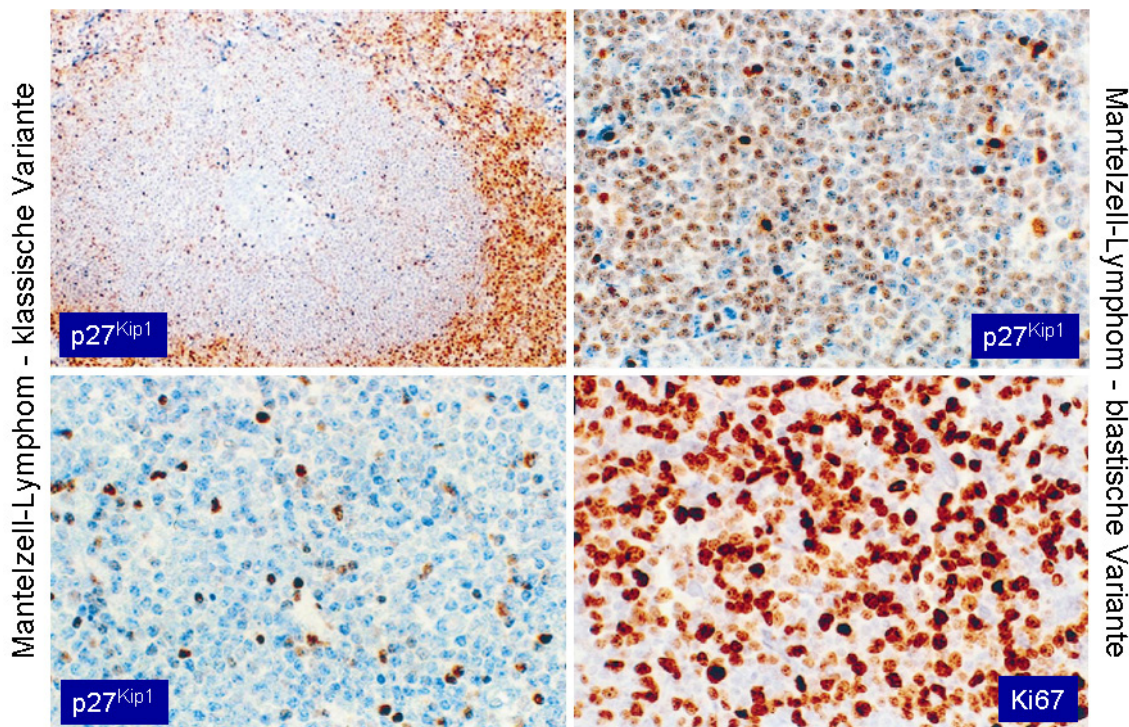


Abbildung 8: Expression von p27^{Kip1} beim Mantelzell-Lymphom. Bilder links: keine Expression von p27^{Kip1} bei einem klassischen Mantelzell-Lymphom mit Mantelzonen-Wachstum (links oben) bzw. diffusem Wachstum (links unten). Bilder rechts: schwache Expression von p27^{Kip1} in der Mehrzahl der Tumorzellen eines blastischen Mantelzell-Lymphoms trotz hoher Wachstumsrate, dargestellt durch die immunhistochemische Färbung des Proliferations-Markers Ki67. Positive Zellen sind braun gefärbt, die einzelnen, stark angefärbten Zellen bei den immunhistochemischen Nachweisen von p27^{Kip1} sind verstreute normale T-Lymphozyten. Die Abbildung wurde der Publikation [88] entnommen und modifiziert.

In den letzten Jahren wurde mittels Reportergeren-Assays festgestellt, dass Cyclin D1 unabhängig von CDK4 oder CDK6 einige Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität beeinflusst. Daher könnte die onkogene Aktivität von Cyclin D1 nicht nur in der Beschleunigung des Zellzyklus, sondern theoretisch auch im Einfluss auf die Transkription seine Ursache haben [86, 92]. Passend dazu wurde festgestellt, dass sich bei Überexpression von Cyclin D1 oder einer Cyclin D1-Mutante, die nicht fähig ist CDK4 zu aktivieren, die resultierenden Genexpressionsprofile sehr ähnlich sind [32]. Außerdem befanden sich unter den veränderten Genen kaum E2F-Zielgene. Da

der letztendliche Beweis für die CDK-unabhängige, transkriptionelle Aktivität von Cyclin D1 (Abschnitt 2.1.3) durch die nachweisliche Beeinflussung endogener Gene aber bis jetzt noch nicht erbracht ist, bleibt diese Theorie sehr vage.

Abschließend stellt sich noch die Frage, ob Cyclin D1 dazu in der Lage ist, Zellen zu transformieren und durch seine Überexpression zur Entstehung des Mantelzell-Lymphoms führt. Erste Studien dazu in kultivierten Nierenzellen von Ratten zeigten, dass Cyclin D1 nur in Kooperation mit einem zweiten Onkogen transformierend wirkt [93]. Auch im transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cyclin D1 in B-Lymphozyten nicht zur Entstehung eines Lymphoms führte [94, 95]. Erst nach dem Kreuzen dieser Tiere mit anderen Mäusen, die transgen für MYC oder RAS waren, entwickelten die Nachkommen Lymphome. Trotz dieser Ergebnisse lässt sich eine gewisse transformierende Aktivität von Cyclin D1 nicht bestreiten, da Zellen, in denen die Expression aller drei D-Typ-Cycline ausgeschaltet ist, eindeutig viel schwerer zu transformieren sind [96]. Das bedeutet insgesamt, dass auf der einen Seite Cyclin D1 alleine nicht ausreicht, um Zellen zu transformieren, auf der anderen Seite wird es aber für die Transformation benötigt.

Zusammengefasst weist alles darauf hin, dass die t(11;14)-Translokation bei der Entstehung und Entwicklung des Mantelzell-Lymphoms ein sehr frühes und notwendiges Ereignis darstellt. Noch nicht verstanden hat man hingegen, was zwischen der Translokation in den frühen Stadien der B-Zell-Differenzierung und dem voll ausgeprägten Mantelzell-Lymphom im Stadium einer reifen, naiven B-Zelle passiert (Abbildung 4).

2.1.5 Genexpressionsprofile des Mantelzell-Lymphoms

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind in der Literatur elf Publikationen zu finden, die Analysen von Genexpressionsprofilen (GEP) des Mantelzell-Lymphoms beschreiben. Ein Großteil dieser Untersuchungen vergleicht Normalgewebe aus den Lymphknoten oder aufgereinigte B-Lymphozyten mit Mantelzell-Lymphom-Fällen [97-101], während mittels anderer GEP das Mantelzell-Lymphom von anderen B-Zell-Lymphomen abgegrenzt wird [26, 102]. Mit weiteren GEP werden die morphologischen Subtypen des Mantelzell-Lymphoms bzw. schwach und stark proliferierende Fälle untereinander verglichen [103-105] oder ein Vergleich zwischen Expressionsprofil und genomischem Profil gezogen [106].

In der ersten Publikation werden durch den Vergleich von Lymphknoten-Normalgewebe oder B-Lymphozyten mit Mantelzell-Lymphomen vor allem apoptotische Gene als differentiell exprimiert identifiziert (*FADD*, *DAXX*, *CASP2*, *RAIDD*), deren Expression beim Mantelzell-Lymphom vermindert ist [97]. Eine andere Arbeitsgruppe findet neben vielen weiteren differentiell exprimierten Genen eine Überexpression des Cannaboid-Rezeptors 1 (*CB1* = Wachstums-Stimulator B-Zellen) und einen Verlust des Regulator of G protein signalling 13 (*RGS13* = Steuerung Chemokin-Sensitivität B-Zellen) in Mantelzell-Lymphomen [98]. Martinez *et al.* (2003) definiert als im Mantelzell-Lymphom induzierte Gene vor allem anti-apoptotische Gene, Gene des NF κ B-Signalwegs und weitere Gene der Signaltransduktion, während außer Cyclin D1 (*CCND1*) alle veränderten Zellzyklus-Gene als reprimiert beschrieben werden [99]. In dieser Publikation werden außerdem Gen-Profile erstellt, welche die Mantelzell-Lymphome aufgrund bestimmter Charakteristika in Gruppen einteilen (z.B. Fälle mit und ohne somatischer Hypermutation, Fälle mit der klassischen und blastischen Variante, stark und schwach proliferierende Fälle und Fälle mit guter und schlechter Prognose). Im Rahmen einer anderen Arbeit, bei der aufgereinigte naive B-Zellen mit Mantelzell-Lymphomen verglichen werden, können die im Lymphom deregulierten Gene vor allem dem PI3K/AKT-, WNT- und TGF β -Signalweg zugeordnet werden [101]. Eine weitere Studie zeigte kürzlich nach Validierung von 46 differentiell exprimierten Genen mittels siRNA-Experimenten vor allem bei drei Genen (*HDGFRP3*, *FZD2*, *DUSP2*) einen funktionellen Zusammenhang mit der Lymphom-Entwicklung [100].

Andere Analysen von GEP vergleichen das Mantelzell-Lymphom mit anderen B-Zell-Lymphomen. Durch die Identifikation einer Gruppe von 42 Genen in einer Studie kann das Mantelzell-Lymphom auf Genexpressions-Ebene vom kleinzelligen lymphozytischen Lymphom (SLL) und vom diffusen großzelligen Lymphom (DLBCL) ausreichend abgegrenzt werden [26] (Abbildung 9A). Zusätzlich werden neun Cyclin D1-negative Mantelzell-Lymphome untersucht, von denen sieben mit den Cyclin D1-positiven Fällen clustern, was als Beweis für die Existenz Cyclin D1-negativer Mantelzell-Lymphome gewertet wurde (Abbildung 9B). Diese exprimieren zum Teil alternativ hohe Mengen an Cyclin D2 und Cyclin D3. In dieser Publikation wird außerdem eine Signatur von 20 Genen erstellt, deren Expression ein Maß für die Proliferationsrate des Tumors ist, gleichzeitig kann über diese Signatur auch eine Prognose für die Überlebensrate des Patienten getroffen werden (Abbildung 9C/D).

In einer anderen Analyse wird eine wesentlich höhere Zahl an Genen (~150) benötigt, um das Mantelzell-Lymphom vom kleinzelligen lymphozytischen Lymphom (SLL) und Marginalzonenlymphom der Milz (MZL) abzugrenzen [102]. Diese Gene stammen vor allem aus den Bereichen Zellwachstum, Transkription und Wirkstoff-Resistenz bei Arzneimitteln.

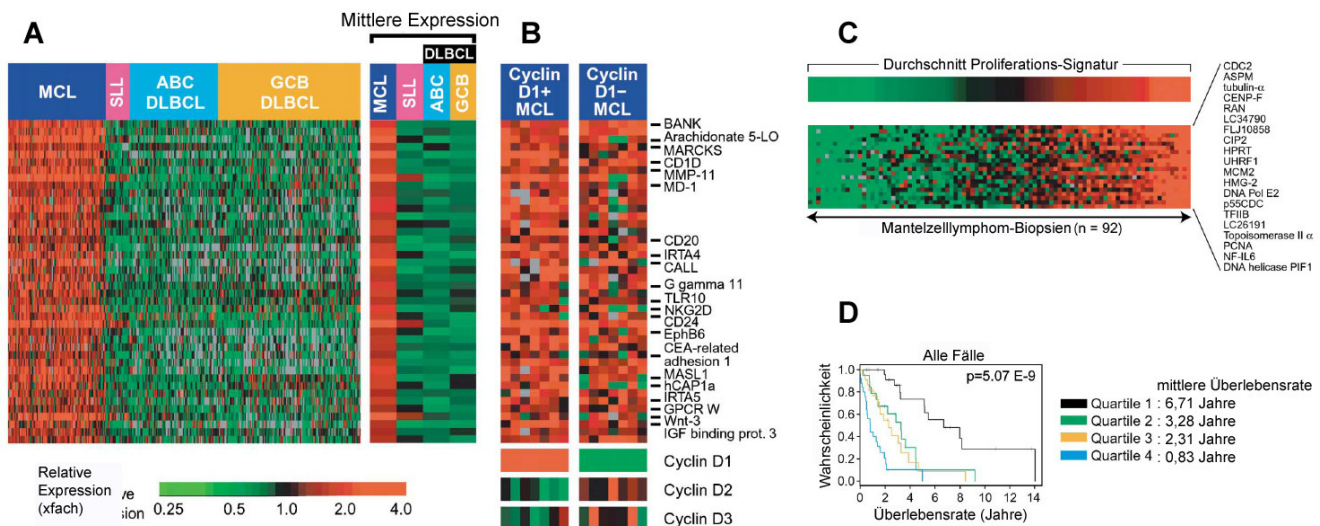


Abbildung 9: Genexpressionsprofil zur Abgrenzung des Mantelzell-Lymphoms von anderen B-Zell-Lymphomen. (A) Hierarchische Clusteranalyse der Expressionswerte von 42 Mantelzell-Lymphom-Signatur-Genen, die in 92 Mantelzell-Lymphomen stärker exprimiert sind als in 20 SLL- und 217 DLBCL-Fällen. Jede Spalte stellt einen Lymphom-Fall und jede Reihe ein Gen dar (Farbgebung anhand der Skala). (B) Expression der Mantelzell-Lymphom-Signatur-Gene in sieben Cyclin D1-positiven und sieben Cyclin D1-negativen Fällen. Darunter ist die relative Expression von Cyclin D1, Cyclin D2 und Cyclin D2 in den jeweiligen Fällen zu sehen. (C) Relative Expression von 20 Proliferations-Signatur-Genen, die Mantelzell-Lymphom-Fälle sind im Bezug auf die Expressions-Stärke dieser Gene angeordnet. (D) Kaplan-Meier-Plot der Überlebensrate der Patienten. Die Patienten wurden anhand ihrer Proliferations-Signatur eingestuft und in vier Gruppen (Quartiles) zusammengefasst. Die Abbildung wurde der Publikation [26] entnommen und modifiziert.

Im Rahmen von drei Arbeiten werden morphologische Subtypen des Mantelzell-Lymphoms bzw. schwach und stark proliferierende Fälle untereinander im GEP verglichen. Die erste identifiziert acht Gene, die zwischen beiden Varianten unterschiedlich exprimiert sind (*CMYC*; *BCL2*; *PIM1*; *TOP1*; *CD23*; *CD45*; *CD70*; *NFATC*) [105]. Da die drei ersten, in der blastoiden Variante hochregulierten Gene aus dieser Gruppe dem STAT3-Signalweg angehören, wird vermutet, dass dieser Weg an der blastoiden Transformation beim Mantelzell-Lymphom beteiligt ist. Weiterhin werden 18 Gene detektiert, die in beiden Gruppen dereguliert sind. Die zweite Arbeit identifiziert vor allem Gene aus dem Bereich Zellzyklus (*CDK4*; *CKS1*; *B-myb*; *PIM1*; *PIM2*; *Cdc25B*; *DAD1*; *RSK1*) als differentiell exprimiert zwischen beiden morphologischen Subtypen [103]. In der dritten Analyse werden die Fälle anhand der Expression des Proliferations-Markers Ki67 in schwach und stark

proliferierend eingeteilt und verglichen [104]. Die resultierende Signatur von 32 Genen zeigt vor allem Gene aus den Bereichen der Transkription, des Zellzyklus (p53- und Rb-Signalweg) und der Formation der mitotischen Spindel. Weiterhin werden primäre Tumore mit Rezidiven verglichen, hier stammen einige der identifizierten Gene aus dem Bereich der Zelladhäsion.

Eine weitere Untersuchung zeigt mit einem Vergleich zwischen Expressionsprofil und genomischen Profil von insgesamt 26 Mantelzell-Lymphom-Fällen eine hohe Korrelation zwischen beiden Profilen, z.B. befinden sich überexprimierte Gene wie BCL2 und MYC in den Regionen mit genomischen Gewinnen (3q; 6p; 8q; 9q; 16p; 18q) [106]. Da unter anderem eine deutlich erhöhte Expression der B-Zell-assoziierten Tyrosin-Kinase SYK in den Mantelzell-Lymphomen gefunden wurde, könnte dieses Protein ein neues therapeutisches Target darstellen.

2.1.6 Therapie-Möglichkeiten

Die Standard-Therapie für Mantelzell-Lymphom-Patienten war über Jahre die Poly-Chemotherapie, normalerweise basierend auf Adriamycin-enthaltenden Präparaten [107]. Dabei war die am meisten angewendete Kombination von Wirkstoffen das CHOP-Therapieschema (Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin™ (Vincristin) und Prednisolon), das zu einem kompletten Rückgang der Tumoren bei 20 bis 50% der Patienten und einer mittleren Überlebensrate von etwa 3 Jahren führte. Die Ergebnisse der CHOP-Therapie konnten mit anderen Poly-Chemotherapie-Behandlungen (hyper-CVAD; Fludarabin-enthaltende Präparate) nur wenig verbessert werden.

Vor einiger Zeit hat sich allerdings aufgrund der Einführung der Immuno-Therapie und der damit verbundenen, gezielteren Eingreifmöglichkeit in die molekularen Mechanismen des Tumors die Strategie zur Behandlung von Mantelzell-Lymphom-Patienten geändert [108, 109]. Die Kombination von Chemotherapie-Regimes wie CHOP, hyperCVAD oder FCM (Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron) mit Rituximab, einem chimären monoklonalen anti-CD20-Antikörper mit limitierter Effizienz als Einzel-Präparat, kann zu maximalen Ansprech-Raten der Patienten auf die Therapie von 80 bis 95% und zu einem kompletten Rückgang der Tumoren in 30 bis 87% der zuvor unbehandelten Patienten führen [110-112]. Auch die Überlebensrate der Patienten kann durch die Kombination von Rituximab und Chemotherapie verbessert werden [113], außerdem wirkt sich eine Immuntherapie

mit Rituximab im Anschluss an eine kombinierte Behandlung günstig auf die Ansprech-Dauer der Patienten auf die Therapie aus [110].

Das größte Problem bleibt aber nach wie vor die Rate an Rezidiven, d.h. trotz hoher Ansprech-Raten bleiben die Patienten nicht dauerhaft tumorfrei. Die mangelnden Möglichkeiten konventioneller Therapie-Strategien und das gestiegene Wissen um die Zellbiologie der Mantelzell-Lymphome haben in diesem Zusammenhang zur Entwicklung neuer Therapeutika geführt (Abbildung 10). Um die Signalwege zu treffen, die für den Tumor entscheidend sind, werden unter anderem Zellzyklus-Inhibitoren (Flavopiridol, R-Roscovitin, UCN-01, Styrolsulfone), BCL2-Inhibitoren (Oblimersen, Obatoclax), Proteasom-Inhibitoren (Bortezomib), mTOR-Inhibitoren (Sirolimus, Temsirolimus, Everolimus), Histondeacetylase-Inhibitoren (SAHA) und HSP90-Inhibitoren (Geldanamycin) hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bei Mantelzell-Lymphomen getestet [114-122]. Die Kombination dieser neuen Strategien miteinander oder mit Präparaten der Standard-Chemotherapie könnte die Behandlung von Mantelzell-Lymphom-Patienten deutlich verbessern [123-126].

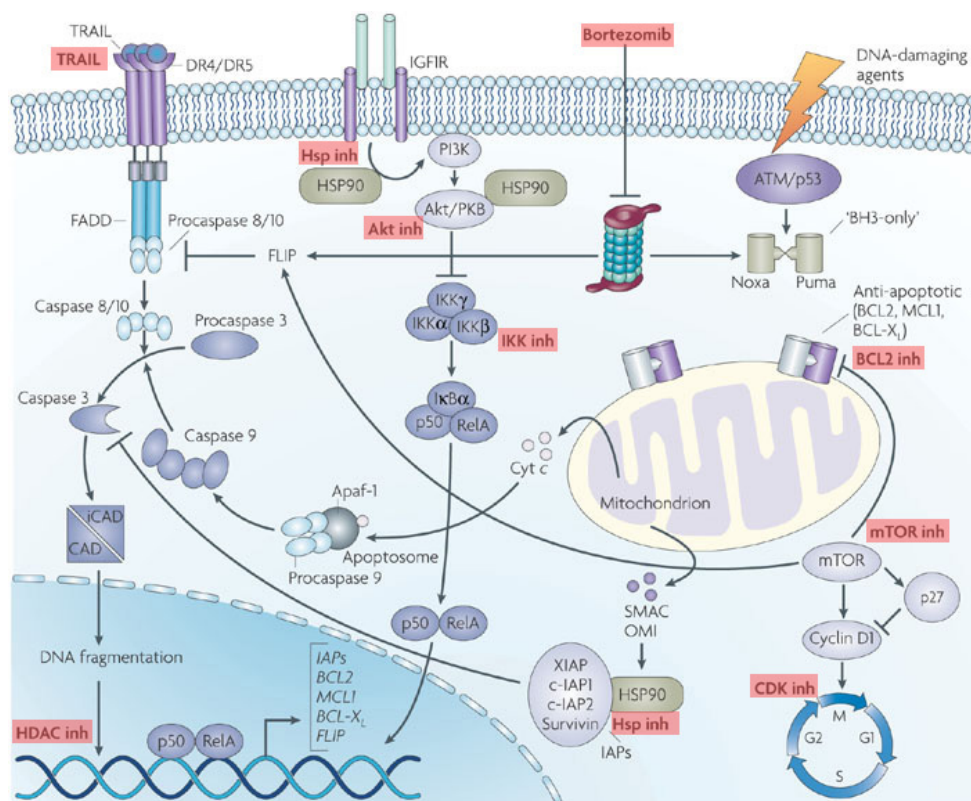


Abbildung 10: Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung von Mantelzell-Lymphomen. Da in Mantelzell-Lymphomen einige Signalwege wie z.B. der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg oder der NFκB-Signalweg sowie der Zellzyklus und die Apoptose verändert sind, versucht man Inhibitoren einzusetzen (rot hinterlegt), die diese Signalwege blockieren. Die Abbildung wurde der Publikation [109] entnommen und modifiziert.

2.2 Verminderung der Expression von Cyclin D1 durch RNA-Interferenz (RNAi)

Im Jahr 1998 entdeckten Andrew Fire und Craig Mello, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Fadenwurm *C. elegans* zu einem effizienten und sequenzspezifischen Ausschalten von Genen führte. Dieser Mechanismus wurde fortan als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet [127]. Einerseits wurde das Ganze als ein Schutz-Mechanismus gegen virale RNA angesehen [128], andererseits fand man aber heraus, dass solche Transkripte auch endogen vorlagen und die Genexpression gezielt regulierten [129]. Weiterhin entwickelte sich daraus durch die künstliche Einführung von dsRNA in Zellen eine elegante und wirkungsvolle Methode zur Ausschaltung von Genen.

Die Wege, auf denen zum einen exogene dsRNA (virale oder künstlich eingeführte RNA) und zum anderen endogene dsRNA (Regulation der Genexpression) verarbeitet werden, sind sich ähnlich, aber nicht gleich (Abbildung 11). Bei der Prozessierung endogener dsRNA (= mikro-RNA oder miRNA), werden im Zellkern aus den längeren primären Transkripten zunächst durch die Endonuklease/TyplIII-RNase Drosha die miRNA-Präkursor herausgeschnitten (Abbildung 11A) [130]. Durch Exportin-5, einem Rezeptor für den nukleären RNA-Transport, gelangen die Vorläufer-Moleküle ins Cytoplasma, wo sie durch eine andere Endonuklease/TyplIII-RNase Dicer weiter prozessiert werden [131, 132]. Die resultierenden, etwa 21 Nukleotide langen miRNA-Duplexe werden ATP-abhängig über RNA-Helikasen aufgewunden und die jeweiligen Einzelstränge lagern sich mit verschiedenen Proteinen zu einem Ribonukleoprotein-Partikel (miRNP) zusammen [133, 134]. In diesem Komplex ist die einzelsträngige miRNA stark mit einem Argonaut-Protein (Ago) assoziiert und leitet den gesamten Komplex zu komplementären Sequenzen in der mRNA [135]. Sind diese erreicht, erfolgt entweder eine endonukleolytische Restriktion der mRNA durch das Argonaut-Protein oder eine Inhibierung der Translation [136, 137].

Virale oder künstlich eingeschleuste dsRNA (siRNA) wird wie die miRNA-Vorläufer-Moleküle im Cytoplasma durch die Endonuklease/TyplIII-RNase Dicer zu kurzen RNA-Duplexen prozessiert (Abbildung 11B). Nach Aufwindung der Duplexe in die Einzelstränge kommt es zur Zusammenlagerung des RIS-Komplexes (RISC = RNA-induced silencing complex) und damit ausschließlich zur endonukleolytischen

Restriktion der komplementären mRNA und nicht zu einer translationalen Inhibierung.

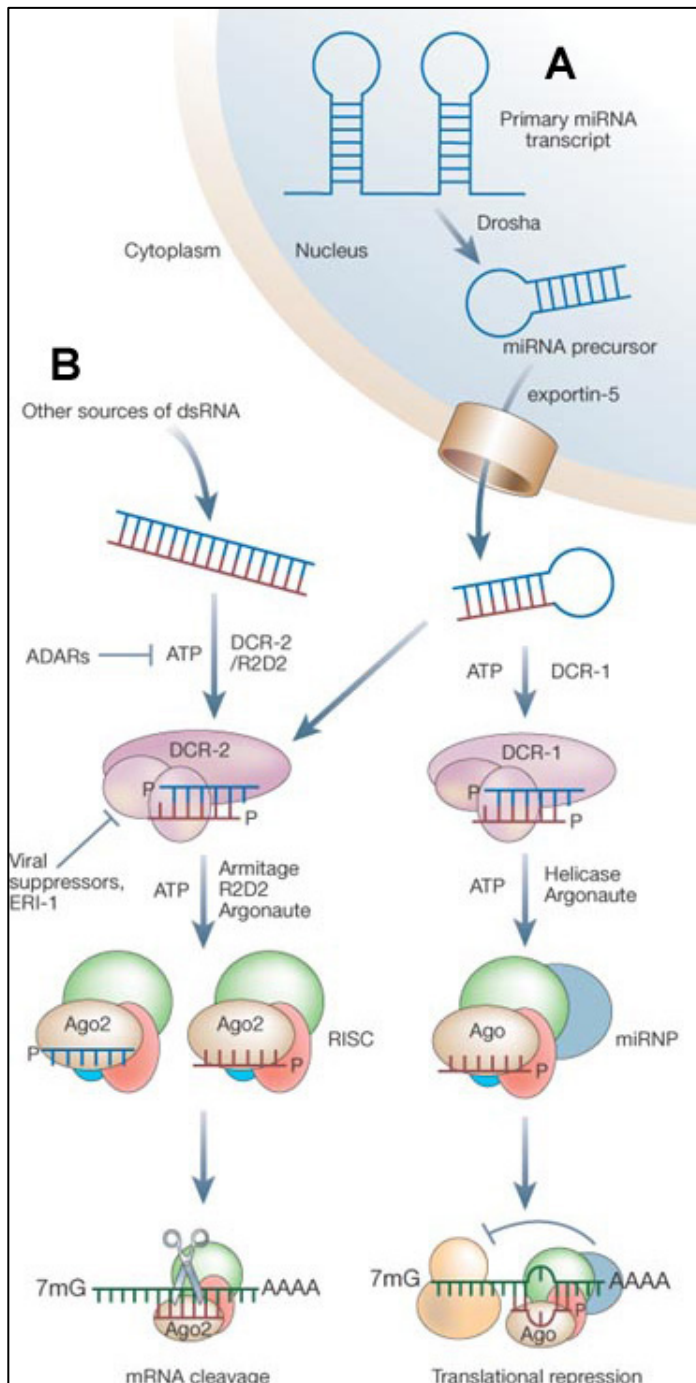


Abbildung 11: Mechanismen der RNA-Interferenz.

(A) Prozessierung endogener dsRNA (miRNA): aus dem primären Transkript wird durch das Enzym Drosha der miRNA-Präkursor herausgeschnitten. Nach dem Export ins Cytoplasma erfolgt die weitere Prozessierung über das Enzym Dicer (DCR-1/DCR-2) zu kurzen RNA-Duplexen. Die Einzelstränge dieser Moleküle werden in miRNA-enhaltende Ribonukleoprotein-Partikel (miRNP) eingeschleust. Durch die Assoziation mit einem Argonaut-Protein (Ago) und das Heranführen des Komplexes an komplementäre Stellen in der mRNA kommt es entweder zum Abbau der mRNA oder zur Inhibierung der Translation.

(B) Prozessierung exogener dsRNA (siRNA): virale oder künstlich eingeschleuste dsRNA wird ebenfalls über das Enzym Dicer zu kurzen RNA-Duplexen prozessiert. Die Einlagerung der Einzelstränge dieses Moleküls in den RISC-Komplex (= RNA-induced silencing complex) führt ausschließlich zum Abbau komplementärer mRNA.

Die Abbildung wurde der Publikation [138] entnommen.

Die unterschiedlichen Funktionen der siRNA- und miRNA-Moleküle werden nicht, wie zunächst vermutet, über ein unterschiedliches Maß an Komplementarität mit der mRNA gesteuert, sondern über die Zusammensetzung der Protein-Komplexe, in die sie integriert werden [139]. So konnte z.B. bei der Familie der Argonaut-Proteine nur für Ago2, nicht aber für Ago1 und Ago3 eine Nuklease-Aktivität nachgewiesen werden.

Schon bald nach ihrer Entdeckung wurde die RNA-Interferenz als Methode zur Untersuchung der Funktion von Genen in verschiedenen Organismen angewendet [140-143]. Dabei wurden zunächst längere Stücke an dsRNA in die Zellen eingeschleust, was den Nachteil hatte, dass dadurch in Säugetier-Zellen eine unspezifische Interferon-Antwort ausgelöst wurde [144]. Erst 2001 konnte gezeigt werden, dass durch die Einschleusung von nur 21 Nukleotiden langen siRNA-Duplexen die unspezifische Interferon-Antwort umgangen werden konnte [145]. Da die direkte Transfektion dieser Duplexe oft Schwierigkeiten bereitete, wurden in den folgenden Jahren verschiedene Vektoren zur Expression von siRNA-Vorläufern entwickelt, deren weitere Prozessierung zur fertigen siRNA dann erst in der Zelle stattfindet [146-149]. Dabei erfolgt die Expression entweder unter einem RNA Polymerase II- oder einem RNA Polymerase III- Promotor, wobei im zweiten Fall vor allem der U6- und H1-Promotor (= snRNA-Promotoren) genutzt werden [150]. Bei den Konstrukten mit RNA Polymerase III- Promotoren wird die siRNA entweder in zwei getrennten Strängen unter Tandem-Promotoren exprimiert oder als kurzer Hairpin (= short hairpin RNA/ shRNA) [151, 152]. Da im Vergleich die shRNA-Moleküle durch die endogene Prozessierung mit größerer Effizienz als die fertigen siRNA-Moleküle umgesetzt werden, wird in dieser Arbeit ein Vektor verwendet, der die siRNA unter einem H1-Promotor als Hairpin exprimiert [153].

2.3 Lentivirale Infektion

Ein Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit einer Cyclin D1-shRNA-Sequenz zu transfizieren. Da diese Zelllinien in Suspension wachsen und mittels herkömmlicher Transfektionsmethoden nur schwer zu manipulieren sind, sollte dieses Ziel mit Hilfe lentiviraler Infektion erreicht werden. Wie alle Retroviren können Lentiviren stabil in das Genom ihrer Wirtszellen integrieren (Abbildung 12). Darüber hinaus besitzen sie aber noch den Vorteil, dass sie auch ruhende Zellen infizieren können [154, 155]. Onko-Retroviren scheitern nach Infektion der Zielzellen und reverser Transkription der viralen RNA durch die Größe des Präintegrations-Komplexes (PIC; ~ 56 nm Durchmesser) an der Zellkern-Membran (Kern-Poren: ~ 26 nm Durchmesser) und können daher nur während der Mitose die Zellen infizieren [156]. Dagegen enthält der PIC der Lentiviren Signale für eine nukleäre Lokalisation, die den aktiven Transport durch die Kern-Poren auch während der Interphase vermitteln [157, 158].

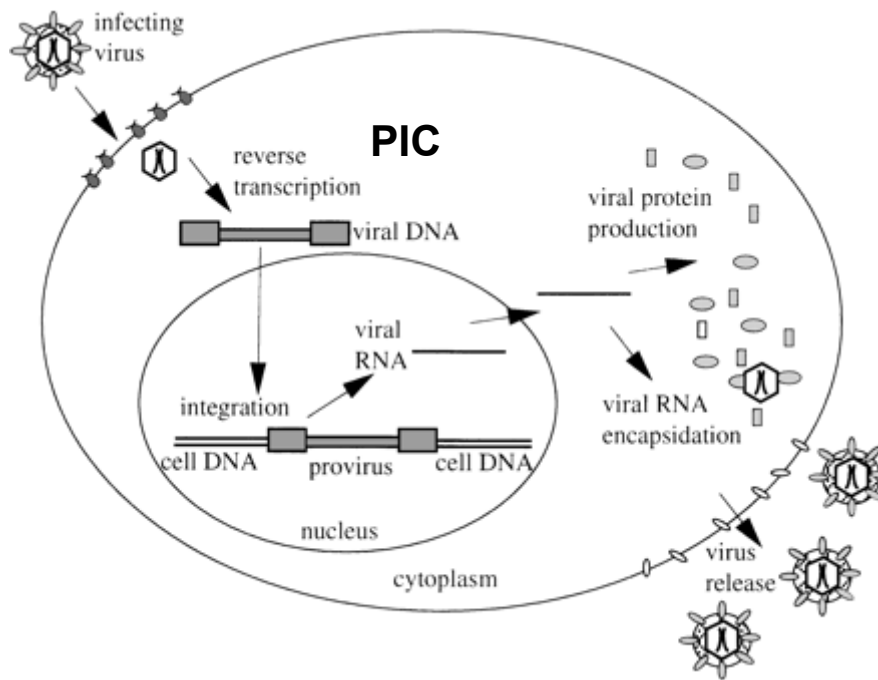


Abbildung 12: Replikations-Zyklus eines Retrovirus. Die Infektion beginnt mit einer Erkennung spezifischer Rezeptoren an der Zelloberfläche durch die Hüll-Proteine des Virus. Nach Fusion mit der Zellmembran wird die virale RNA freigesetzt und in DNA umgeschrieben. Über den Präintegrations-Komplex (PIC) erfolgt die stabile Integration in das Wirts-Genom (= Provirus). Unabhängig von der Replikation der Zelle werden die virale RNA und die viralen Proteine ständig produziert und zu neuen Virus-Partikeln kombiniert. Die Abbildung wurde der Publikation [159] entnommen.

Damit einerseits diese Eigenschaft der Lentiviren für den Gen-Transfer und ähnliche Anwendungen genutzt werden kann und andererseits bei der Anwendung auf keinen Fall humanpathogene Replikations-kompetente Viren entstehen, wurden in mehreren Stufen lentivirale Vektoren entwickelt, die diesen Ansprüchen genügten [160, 161]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein lentiviraler Vektor verwendet, der auf dem Genom des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) basiert. Vergleicht man den Aufbau dieses Vektors pFUGW mit dem normalen Aufbau des HIV-Genoms (Abbildung 13), so kann man erkennen, welche Veränderungen bei der Entwicklung lentiviraler Vektoren vorgenommen wurden.

Ausgehend vom viralen Genom wurden bis auf die *cis*-agierenden Sequenzen, die für den Replikations-Zyklus des Virus benötigt werden und innerhalb der LTR-Sequenzen oder in deren Nähe lokalisiert sind, alle viralen Gene entfernt. Damit sich der Virus aber zumindestens einmal in der Zelle produzieren kann, mussten Gene wie *gag* (virale Capsid-Proteine), *pol* (virale Enzyme) und *env* (virales Hüll-Protein) auf zusätzliche Plasmide verlagert und mit dem lentiviralen Vektor kotransfiziert werden (= *trans*-Komplementierung) [162, 163]. Weiterhin wurden die Konstrukte mit der Einführung interner, heterologer Promotoren (in unserem Fall CMV) unabhängig

vom eigentlichen lentiviralen Promotor gemacht [164]. Damit konnte der lentivirale Promotor durch die teilweise Deletion der U3-Region in der 3'-LTR (Δ U3) ohne Konsequenzen für die zu transkribierenden Gene inaktiviert werden [165]. Dies sollte verhindern, dass durch die zufällige Integration des Virus in das Wirtsgenom zelluläre Onkogene aktiviert werden. Damit es dem Virus nicht möglich ist, sich über die LTR-Sequenzen wieder aus dem Wirtsgenom heraus zu rekombinieren, wurde außerdem die U3-Region in der 5'-LTR komplett deletiert. All diese Maßnahmen sorgten für ein sicheres Vektorsystem.

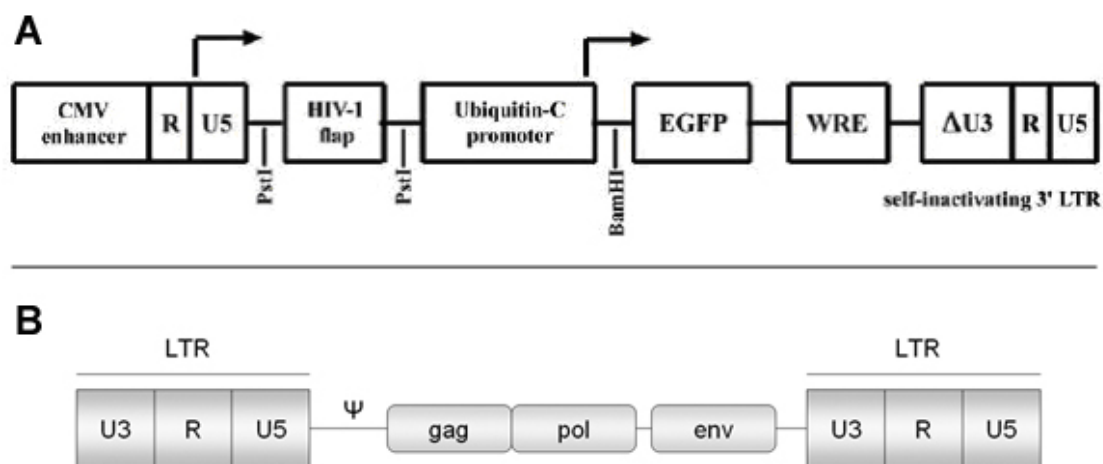


Abbildung 13: Vergleich zwischen dem Aufbau des lentiviralen Vektors pFUGW (A) und dem normalen Aufbau des HIV-Genoms (B). CMV enhancer = Cytomegalie-Virus-Promoter; EGFP = enhanced green fluorescence protein; WRE = woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; LTR = long terminal repeat; ψ = Verpackungs-Signal für die virale RNA; *gag* = Gen für die viralen Capsid-Proteine; *pol* = Gen für die viralen Enzyme; *env* = Gen für das virale Hüll-Protein. Bis auf das Verpackungs-Signal für die virale RNA sind beim retroviralen Genom die *cis*-agierenden Sequenzen nicht genauer dargestellt. Teile der Abbildung wurden der Publikation [166] entnommen.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Vektor enthält zusätzlich noch ein Element (HIV-1 flap), das entscheidend für den nukleären Import des viralen Genoms ist [167]. Des Weiteren ist in das Konstrukt EGFP (= enhanced green fluorescence protein) als Reportergen eingebaut, gesteuert von einem weiteren internen Promotor (Ubiquitin-C) und einem woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WRE), das die Transkription verstärkt [168, 169]. Das Transgen (in dieser Arbeit die Cyclin D1-shRNA) wird in eine Schnittstelle zwischen dem HIV-1 flap-Element und dem Ubiquitin-C-Promotor subkloniert.

Da das HIV-Hüll-Protein ausschließlich die Infektion CD4-positiver Zellen ermöglicht [170] und damit nur niedrige Viren-Titer erreicht werden, wird in dieser Arbeit das Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G) als Hüll-Protein verwendet, d.h. die Virus-Partikel werden pseudotypisiert. Abgesehen von der Erweiterung des

Tropismus erhält man durch diese Pseudotypisierung auch stabilere Virus-Partikel, die mittels Zentrifugation aufkonzentrierbar sind [171, 172]. Dadurch wird ein höherer Virus-Titer erreicht.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es aufzuklären, welche Rolle die Überexpression von Cyclin D1 bei der Weiterentwicklung des Mantelzell-Lymphoms spielt. Dazu sollte mit Hilfe der RNA-Interferenz die Proteinexpression von Cyclin D1 in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien verringert und die daraus resultierende Wirkung auf zelluläre Prozesse (Wachstum, Zellzyklus, Apoptose) untersucht werden.

Zusätzlich sollte ein vergleichendes Genexpressionsprofil vor und nach dieser Verminderung der Expression von Cyclin D1 erstellt werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, musste zunächst ein System etabliert werden, mit dem die Verringerung der Expressionsrate von Cyclin D1 in den nur schwer zu transfizierenden Mantelzell-Lymphom-Zelllinien möglich ist.

Dies erforderte die Auswahl einer möglichst effizienten Cyclin D1-siRNA-Sequenz und die Einschleusung dieser Sequenz in die Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mittels lentiviraler Infektion.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Herstellung des lentiviralen Vektors mit der Cyclin D1-shRNA

Um eine geeignete siRNA-Sequenz gegen Cyclin D1 zu finden, wurden verschiedene Internet-Tools zum Design von siRNAs benutzt [173-175]. Aus den dabei erstellten Sequenzen wurden sieben ausgewählt (Tabelle 1) und zur Überprüfung ihrer tatsächlichen Effizienz gegen Cyclin D1 in den Vektor pSUPER (Oligoengine, Seattle, WA, USA) kloniert. Dieser Vektor exprimiert siRNAs unter der Kontrolle eines Polymerase-III H1-RNA-Promotors als Hairpin-Struktur (shRNA), die dann über das Enzym Dicer in die RNAi-Maschinerie der Zelle eingeschleust wird und letztendlich gegen das entsprechende Gen wirkt [151].

Tabelle 1: Für die Testung hinsichtlich ihrer tatsächlichen Effizienz gegen Cyclin D1 ausgewählte siRNA-Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
CycD1-A	ATGTGTGCAGAAGGAGGTC
CycD1-B	ACAAACAGATCATCCGCAA
CycD1-C	CAAACAGATCATCCGCAAA
CycD1-D	AACAGATCATCCGCAAACA
CycD1-E	GCATGTTTCGTGGCCTCTAAGA
CycD1-F	GCATGTTTCGTGGCCTCTAA
CycD1-G	TTAGAGGCCACGAACATGC

Für die Klonierung wurde zunächst die entsprechende Sequenz sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung als Primer bestellt, hier die Sequenz CycD1-C als Beispiel:

5'-gatccccCAAACAGATCATCCGCAAAAttcaagagaTTTGCGGATGATCTGTTTGtttttgaaa-3'

3'-ctaggggGTTTGTCTAGTAGGCGTTTaaagttctctAAACGCCTACTAGACAAACaaaaaccttt-5'

Die kleinen Buchstaben an den 5'- und 3'-Enden markieren Sequenzen, die für das Klonieren in den pSUPER-Vektor notwendig sind (*Bgl*II/*Hind*III-Restriktionsschnittstellen), im mittleren Teil befindet sich die Hairpin-Struktur, die großen Buchstaben markieren die 19 Nukleotide lange Zielsequenz gegen Cyclin D1. Die beiden Primer wurden annealt und über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Hind*III in den pSUPER-Vektor kloniert (DNA-Methoden, siehe 3.2). Zur Überprüfung wurde das klonierte Konstrukt mit *Eco*RI und *Hind*III geschnitten (erwartetes Insert:

300 bp) und sequenziert. Parallel dazu wurde als Kontrolle für alle nachfolgenden Experimente eine kommerziell erhältliche Kontroll-shRNA (Dharmacon Research, Chicago, IL, USA / Sequenz: gatccccGCCGCUUUGUAGGAUAGAGTtcaagagaCACU AUCCUACAAAGCGGCtttttgaaa) kloniert, die keinerlei Komplementarität zum humanen Genom aufweist.

Die erhaltenen Konstrukte mit den sieben verschiedenen Cyclin D1-shRNAs wurden mit Hilfe des BLOCK-iT™ RNAi Target Screening System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hinsichtlich ihrer Effektivität gegen Cyclin D1 getestet (siehe 3.3).

Der zweite Schritt, die Umklonierung in den lentiviralen Vektor pFUGW [166], wurde dann nur mit den beiden effektivsten Cyclin D1-shRNA-Sequenzen durchgeführt. Dazu wurde die jeweilige Cyclin D1-shRNA-Sequenz mit dem dazugehörigen H1-Promotor aus pSUPER herausgeschnitten (Restriktionsschnittstellen *HincII* und *SmaI*) und in den mit *PacI* geschnittenen und anschließend mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllten Vektor pFUGW kloniert (siehe 3.2.7 und Abbildung 14). Die entstandenen pFUGW-Konstrukte wurden wiederum zur Kontrolle mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten und mittels Gel-Elektrophorese analysiert.

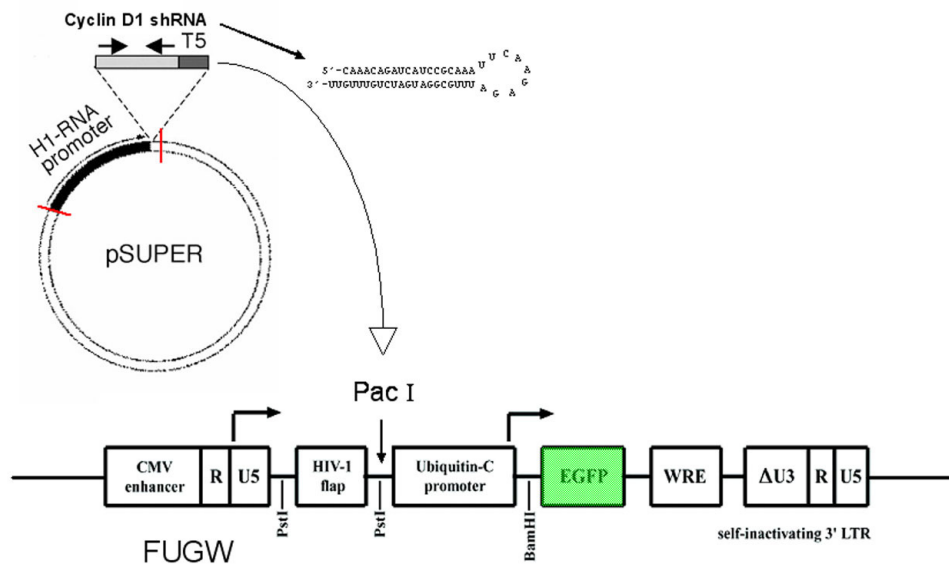


Abbildung 14: Schema der Klonierung in den lentiviralen Vektor pFUGW (Teile der Abbildung wurden aus den Publikationen [151] und [166] entnommen).

3.2 DNA-Methoden

3.2.1 Annealing der Primer

Von beiden Primern (100 μ M) wurden jeweils 3 μ l eingesetzt und 44 μ l Annealing-Puffer (30 mM HEPES-KOH, pH 7,4; 100 mM Kaliumacetat; 2 mM Magnesiumacetat) zugegeben. Nach 4 min Inkubation bei 95°C und 10 min Inkubation bei 70°C wurde langsam auf 4°C hinuntergekühlt.

3.2.2 Phosphorylierung der annealten Primer

Je 1 μ l T4-Polynukleotidkinase, T4-Polynukleotidkinase-Puffer (Fermentas, Ontario, Canada) und ATP (1mM) wurden zu 3 μ l der annealten Primer gegeben und mit H₂O bidest. auf 10 μ l Volumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C und 10 min bei 70°C inkubiert.

3.2.3 Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten mit Ausnahme von *PacI* (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) von der Firma Fermentas und wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.2.4 Ligation

Alle Ligationen wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche, Basel, Schweiz), nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde bei der Ligation der annealten Primer mit dem *BglII/HindIII*-geschnittenen pSUPER-Vektor dieser zuvor mit Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Fermentas) dephosphoryliert.

3.2.5 Transformation

Alle Transformationen wurden mit den chemisch kompetenten One Shot® TOP10-Zellen (*E.coli*) von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.6 Plasmid-Präparationen

Zur Überprüfung der Klonierungen wurden 5 ml LB-Lennox-Medium (Invitrogen) mit einer Kolonie aus der Transformation angeimpft und ü. N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert (200 rpm). Die Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mit dem GeneElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Bei erfolgreicher Klonierung wurden größere Mengen des Plasmids mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System von Fermentas aus 200 ml Bakterien-Übernacht-Kultur) gewonnen.

3.2.7 Vorbereitung pFUGW-Vektor / Cyclin D1-shRNAs für die Klonierung

Hierfür wurde zunächst der pFUGW-Vektor mit *PacI* (siehe 3.2.3) geschnitten, dann wurde das Restriktionsenzym durch Zugabe des jeweils vierfachen Volumens an Phenol/Chloroform (1:1, v/v) und H₂O bidest. gefällt und die organische Phase abzentrifugiert. Zum Überstand wurden 0,1 Volumeneinheiten wässrige Natriumacetatlösung (0,3 M; pH = 5,2) und 2 Volumeneinheiten Ethanol (100%) gegeben und ü.N. bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde bei 4°C / 13.000 x g 30 min abzentrifugiert und das Pellet mit Ethanol (70%, v/v) gewaschen. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in 10 µl H₂O bidest. aufgenommen. Abschließend wurde das geschnittene und gereinigte Plasmid mit T4-DNA-Polymerase (Fermentas) nach den Angaben des Herstellers zu glatten Enden aufgefüllt und für die Ligation eingesetzt.

Die Cyclin D1-shRNA-Sequenzen wurden zusammen mit dem H1-Promotor mittels der Restriktionsenzyme *HincII* und *SmaI* (glatte Enden) aus dem pSUPER-Vektor herausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden im Agarose-Gel (1%ig) aufgetrennt, danach wurde das H1-Cyclin D1-shRNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und für die Ligation eingesetzt.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der klonierten pSUPER-Konstrukte erfolgte mit dem BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach den Angaben des Herstellers mit dem M13 (-20) Universal-Primer. Dieser bindet bezüglich des H1-Promotors des pSUPER-Vektors in 5'-Richtung etwa 100 bp entfernt. Die Analyse erfolgte auf dem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.3 Effektivitätstest für die Cyclin D1-shRNA-Sequenzen

Um die vorhandenen Cyclin D1-shRNA-Sequenzen hinsichtlich ihrer Effizienz gegen Cyclin D1 zu testen, wurde das BLOCK-iT™ RNAi Target Screening System (Invitrogen) benutzt. Im ersten Schritt wurde Cyclin D1 mit dem Reporter-gen *LacZ* fusioniert. Dazu wurde ein Plasmid, das humanes Cyclin D1 im offenen Leseraster enthielt (= ORF-Klon; Klon-ID: IOH 1962), mit dem pSCREEN-iT™/lacZ-DEST-Vektor (Invitrogen) rekombiniert. Von diesem Reporter-Plasmid wurden 0,5 µg zusammen mit 5 µg des jeweiligen pSUPER-CyclinD1-shRNA-Konstrukts in HEK293T-Zellen (60 mm-Schalen) kotransfiziert. Dabei wurde Lipofectamin 2000™ (Invitrogen) als Transfektionsreagenz verwendet. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mittels eines β-Galaktosidase-Assays und durch Western Blot (3.9) analysiert.

Der β-Galaktosidase-Assay wurde mit dem FluoReporter® lacZ/Galactosidase Quantitation Kit (Invitrogen) durchgeführt. Durch die Kotransfektion der Cyclin D1-shRNA-Konstrukte mit dem *LacZ*-Cyclin D1 Reporter-Plasmid wurde je nach Aktivität der Cyclin D1-shRNA das *lacZ*-Fusionstranskript abgebaut. Dies wurde durch die Expressions- und damit die spezifische Aktivitätsabnahme des Reporter-Genprodukts β-Galaktosidase messbar gemacht.

Das jeweilige Zell-Lysat und fluorogenes β-Galaktosidase-Substrat wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die resultierende Fluoreszenz wurde mit einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen (Fluoroskan Ascent CF reader, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; Anregungsfilter: 355nm, Emissionsfilter: 460nm).

3.4 Verwendete Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden unter Standardbedingungen kultiviert (37°C / 95% Luftfeuchtigkeit / 5% CO₂). Standard-Nährmedium für alle Zelllinien war RPMI1640-GlutaMAX™-I (Invitrogen) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (PAA, Linz, Österreich) und Penicillin-Streptomycin (100 Units/ml Medium bzw. 100 µg/ml Medium, Invitrogen). Eine Ausnahme stellen die HEK293T-Zellen dar, die in DMEM-GlutaMAX™-I (Invitrogen) mit 10% fötalem Kälberserum und Penicillin-Streptomycin kultiviert wurden. Alle untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien exprimieren infolge der charakteristischen Translokation t(11;14)(q13;q32) mehr oder weniger stark Cyclin D1, weitere chromosomale Veränderungen führen oft zum Verlust von

Schlüsselgenen bei der Tumorsuppression (p53 / Rb / p16) bzw. der DNA-Reparatur (ATM) [176]:

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien.

Mantelzell - Lymphom -Zelllinie	t(11;14)	Cyclin D1	p53	Rb	p16	ATM	EBV	Publikation zur Erzeugung
Granta	ja	+	del/wt	wt/wt	del/del	del/mut	pos	[177]
Hbl-2	ja	++	del/	wt/wt	del/		neg	[178]
Jeko-1	ja	+	del/mut	wt/wt	del/	ampl	neg	[179]
JVM-2	ja	+	wt/wt		/wt	wt/wt	pos	[180]
Rec-1	ja	++	wt/wt	del/	del/del	wt/	neg	[181]
UPN-1	ja	++	/mut	del/del		polymorph	neg	[182]
Z-138	ja	++	wt/		del/		neg	[183]

wt/wt = keine Deletionen/Mutationen nachweisbar
 del = deletiert; del/del = homozygot deletiert; mut = mutiert
 ampl = amplifiziert; polymorph = Polymorphismus

EBV = Epstein-Barr-Virus

Bei fehlenden Angaben wurden noch keine Analysen zu Deletionen oder Mutationen durchgeführt.

3.5 Virenproduktion

Um Viren zu produzieren wurden HEK293T-Zellen in einer bestimmten Menge in 10cm-Schalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag zu 70-80% konfluent gewachsen waren (5-6 Mio. Zellen/ Schale). Dann wurden pro Schale 10 µg des lentiviralen Vektors pFUGW, in den zuvor die Cyclin D1-shRNA kloniert worden war, zusammen mit den beiden Verpackungsplasmiden ΔR 8.9 (7,5 µg) und VSVG (5 µg) mittels des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 2000™ (Invitrogen) kotransfiziert. Mindestens 6 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt, das frische DMEM enthielt zusätzlich Pyruvat. Da der lentivirale Vektor GFP als Reporter-Gen enthält, konnte 48 h nach der Transfektion im Fluoreszenz-Mikroskop leicht überprüft werden, ob die Transfektion gelungen war. War dies der Fall, so wurden die Überstände aus den Schalen vereinigt, zur Entfernung von Zell-Debris 10 min bei 850 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend über einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) filtriert. Zum Schluss

wurde der filtrierte Überstand mittels Ultrafiltration (Vivaspin 20, Sartorius, Aubagne, Frankreich) konzentriert (~ Faktor 70) und in kleinen Aliquots bei -80°C gelagert.

3.6 Bestimmung des Viren-Titers

Um den Gehalt an Viren, also den Titer einer Viruspräparation zu bestimmen, wurden HEK293T-Zellen relativ dünn in 6-well-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen/ well). Am nächsten Tag wurde ein Virus-Aliquot aufgetaut und mit DMEM, das 8 µg/ml Polybren[®] enthielt (Sigma-Aldrich), auf 1 ml Volumen gebracht und 100 µl davon viermal in 10er-Schritten verdünnt (100µl + 900 µl DMEM+Polybren[®]). Dann wurde das Medium von den ausgesäten Zellen abgenommen und durch das Medium mit dem unverdünnten Virus bzw. durch die vier Verdünnungen ersetzt. Als Kontrolle diente DMEM mit Polybren[®]. Das Virus-Medium wurde 24 h nach Infektion entfernt und durch frisches DMEM ersetzt. Da durch die Expression des Reporter-Gens alle infizierten Zellen GFP-positiv waren, wurde drei Tage nach Infektion der Anteil an GFP-positiven Zellen durch FACS-Analyse (FACS Calibur, BD, San Jose, CA, USA) und Auswertung der Daten mit der freien Software WinMDI (Version 2.9) bestimmt (Abbildung 15). Der Virus-Titer wurde mit Hilfe folgender Formel ermittelt, welche die Integration von einem Virus pro Zelle zugrunde legt:

$$\text{Titer} = (F \times Co / V) \times D$$

F = Prozent GFP-positive Zellen
 Co = absolute Zellzahl
 V = Volumen Virus-Aliquot in ml
 D = Verdünnungs-Faktor

Bei einer guten Präparation lag der Titer bei 10^8 bis 10^9 Viren/ ml, wobei diese Art der Bestimmung den Titer eher unterschätzt, da mehrere Integrationen pro Zelle stattfinden können und je nach Art und Zahl der Integrationen schwach leuchtende Zellen als „negativ“ analysiert werden.

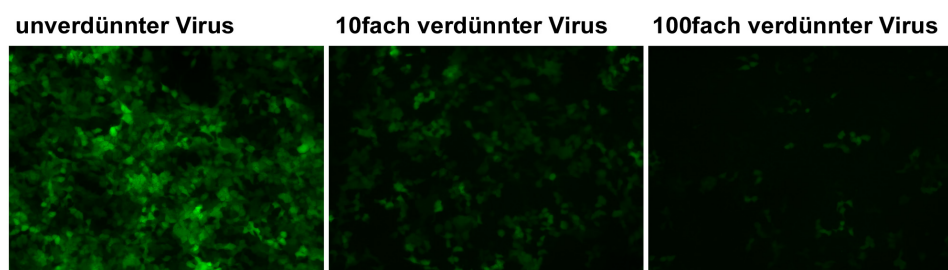


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskop-Bilder von infizierten HEK293T-Zellen. Über eine Verdünnungs-Reihe des Virus und dem jeweils resultierenden Gehalt an GFP-positiven Zellen wird der Virus-Titer bestimmt (Mikroskop: Axiomager1 mit FITC-Filter, Zeiss, Jena, Deutschland).

3.7 Infektion der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Um eine optimale Hinunterregulation von Cyclin D1 mit geringen unspezifischen Effekten zu erreichen, wurde mittels einer Titration (siehe 4.3.1) für jede Mantelzell-Lymphom-Zelllinie das Optimum an eingesetztem Virus ermittelt. Dieses lag bei Granta 519, UPN-1 und Z-138 bei einem MOI (= Multiplicity of Infection) von 45, bei JVM-2 bei 70 und bei Jeko-1 bei 90, d.h., dass z.B. bei der Infektion von Granta 519 auf eine Zelle etwa 45 Viren kamen. Setzt man voraus, dass die Infektion in einer 6-well-Platte mit 2×10^6 Zellen pro Well erfolgte, so wurde die entsprechende Menge an Virus mit RPMI-Medium, das $8 \mu\text{g/ml}$ Polybren[®] enthielt, auf 1ml Volumen pro Well gebracht. Dann wurde der Virus mit den zuvor pelletierten Zellen vermischt und auf die Wells verteilt. Es folgte eine 90 minütige Zentrifugation bei $1000 \times g$, anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von frischem Medium in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt, nochmals pelletiert und für die Rekultivierung in frischem Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Infektionsrate aufgrund der GFP-Positivität erfolgte 72 h nach Infektion durch FACS-Analyse (FACS Calibur, BD) und Auswertung der Daten mit der freien Software WinMDI (Version 2.9).

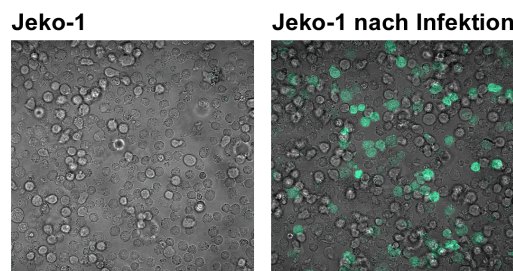


Abbildung 16: Lasermikroskopische Aufnahmen von Kontroll-Zellen und infizierten Zellen 72h nach Infektion (Übereinanderlagerung Hellbild - GFP). Der Anteil an GFP-positiven = infizierten Zellen wurde über FACS-Analyse bestimmt (Mikroskop: CLSM-510 NLO, Zeiss, Jena, Deutschland).

3.8 RNA-Methoden

3.8.1 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Dabei wurde während der Aufreinigung ein DNase-Verdau (Qiagen) zur Abtrennung von DNA durchgeführt. Bei Nutzung der RNA für die Microarray-Analyse wurde die Integrität der RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) überprüft.

3.8.2 Reverse Transkription / quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit einer M-MLV-Reversen Transkriptase von Invitrogen (SuperScript™ II) und einem 1:1-Gemisch aus Oligo(dT)-Primern (Fermentas) und Random-Hexamer-Primern (Roche) in einem Volumen von 20 µl nach den Angaben des Herstellers (Annealing-Bedingungen der Primer: 2 min bei 70°C und 10 min bei RT).

Die Analyse der Genexpression durch quantitative Real-Time PCR wurde mit dem ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (SDS Software Version 1.3.1, Applied Biosystems; Threshold: 0,1; automatische Baseline) durchgeführt. Zum Ansetzen der PCR wurde der Taqman® Universal Master Mix (Applied Biosystems) verwendet und es wurden 4 µl cDNA pro 20 µl-Ansatz eingesetzt. Dabei wurde die cDNA vorher so verdünnt, dass 4 µl einer RNA-Ausgangsmenge von 10 ng entsprachen (PCR-Programm: 10 min bei 95°C; 40 Zyklen mit 15 sec bei 95°C und 60 sec bei 60°C).

Für die Quantifizierung von *Cyclin D1*, *CDK4*, *CDK6*, *OAS-1* und *BIC* wurden Taqman® Gene Expression Assays (Primer/ Sonden) von Applied Biosystems verwendet (*Cyclin D1*: Hs00277039_m1; *CDK4*: Hs01565683_g1; *CDK6*: Hs00608037_m1; *OAS-1*: Hs00242943_m1). Die Primer- und Sonden-Sequenzen für Cyclin D2 lauten: 5'-CGCAAGCATGCTCAGACCTT-3', 5'-TGCGATCATCGACGGTGG-3', 5'-FAM-TGCCACCGACTTTAAGTTTGCCATGT-TAMRA-3', die Sequenzen für Cyclin D3 und das TATA-Box bindende Protein (*TBP*) als endogene Kontrolle wurden bereits publiziert [184, 185]. Bei Cyclin D3 betragen die verwendeten Konzentrationen für Sonde, Vorwärts- und Rückwärtsprimer 100nM, 300 nM und 900 nM, bei Cyclin D2 und TBP 200 nM, 900 nM und 900 nM. Die Assays von Applied Biosystems wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Vor Beginn der eigentlichen Experimente wurde der lineare Bereich der verwendeten Assays (Primer/ Sonden) ermittelt. Dazu wurde von den unbehandelten Zelllinien RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in Verdünnungs-Stufen in die qRT-PCR eingesetzt. Die Daten wurden mit Hilfe der ΔC_t -Methode analysiert. Dabei wurde die Expression der Zielgene auf die endogene Kontrolle *TBP* normalisiert, indem die Differenz zwischen den Mittelwerten der ermittelten PCR-Zyklen für Ziel- und Kontrollgen gebildet wurde (ΔC_t -Wert). Als nächstes wurde in jedem Experiment auf die unbehandelte Kontrolle kalibriert, d.h der ΔC_t -Wert dieser Probe wurde von allen

anderen ΔCt -Werten abgezogen ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert), wodurch die Kontrolle einen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert von 0 erhält. Die Genexpression im Verhältnis zur Kontrolle erhält man, in dem man die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ einsetzt.

3.8.3 Quantitative Real-Time PCR im Großmaßstab durch Taqman® Arrays

Um gleichzeitig die Expression von 48 Genen in einer Probe quantifizieren zu können, wurden bei der Firma Applied Biosystems eigens gestaltete 384-well-Platten bestellt, die es ermöglichten pro Platte 48 ausgewählte Gene (darunter die endogene Kontrolle *TBP*) in 8 verschiedenen Proben zu quantifizieren (7900 HT Gene Expression Micro Fluidic Card Configuration 4).

Um von jeder Probe zwei technische Replikate mit je 200 ng umgeschriebener RNA zu erhalten, wurden pro Probe 500 ng RNA in einem Volumen von 20 μl in cDNA umgeschrieben (siehe Punkt 3.8.2). Anschließend wurde die Umschreibung mit 80 μl H_2O verdünnt (5 ng RNA-Ausgangsmenge / μl) und schließlich wurden 88 μl des vorverdünnten Transkripts mit 110 μl Taqman® Universal Master Mix (Applied Biosystems) und 22 μl H_2O vermischt und davon schließlich je 100 μl in zwei Proben-Reservoirs der 384-well-Platte pipettiert. Den Angaben des Herstellers folgend wurde die Platte zentrifugiert, damit die Proben aus dem Reservoir in die einzelnen Wells der Platte gelangen konnten. Dann wurden die Probenreservoirs abgetrennt und die Platte für die quantitative Real-Time PCR in ein ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System geladen (SDS Software Version 2.1, Applied Biosystems). Die Daten wurden mit Hilfe der ΔCt -Methode, wie schon unter Punkt 3.8.2 beschrieben, analysiert.

3.8.4 Vorbereitung der RNA für die Genechip-Analyse

Unter Benutzung des One-Cycle Eukaryotic Target Labeling Assays (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) wurden 4 μg Gesamt-RNA umgeschrieben, dabei wurden für die Synthese des cDNA-Erststrangs T7-Oligo(dT)-Primer verwendet (der gesamte Ablauf ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt).

Nach der RNase H-vermittelten Synthese des cDNA-Zweitstrangs wurde die doppelsträngige cDNA gereinigt. Sie diente als Matrize in der nachfolgenden *in vitro* Transkriptions-Reaktion (IVT), d.h. dass unter Zugabe von T7-RNA-Polymerase und einem Ribonukleotid-Mix, der ein biotinyliertes Ribonukleotid-Analogon (UTP)

enthielt, Biotin-markierte, komplementäre RNA (cRNA) gebildet wurde. Die mit Biotin markierte cRNA wurde gereinigt, fragmentiert und auf GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix) hybridisiert. Nach der Hybridisierung über Nacht wurden die Arrays zweimal mit Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin (SAPE) und dazwischen mit einem biotinyliertem Antikörper gegen Streptavidin inkubiert. Dies führte zu einer doppelten Markierung der hybridisierten cDNA mit Phycoerythrin und damit zur Verstärkung der Fluoreszenz-Signale. Zur Aufnahme der Fluoreszenz-Signale, die dem jeweiligen Genexpressions-Level entsprachen, wurden die Arrays gescannt. Nach dem Scannen wurden die entstandenen Bilder mit der Affymetrix® MicroArray Suite (MAS) 5.0 Software verarbeitet, um die einzelnen Signale in Intensitäts-Werte zu übersetzen und damit Werte für die Genexpression zu erhalten.

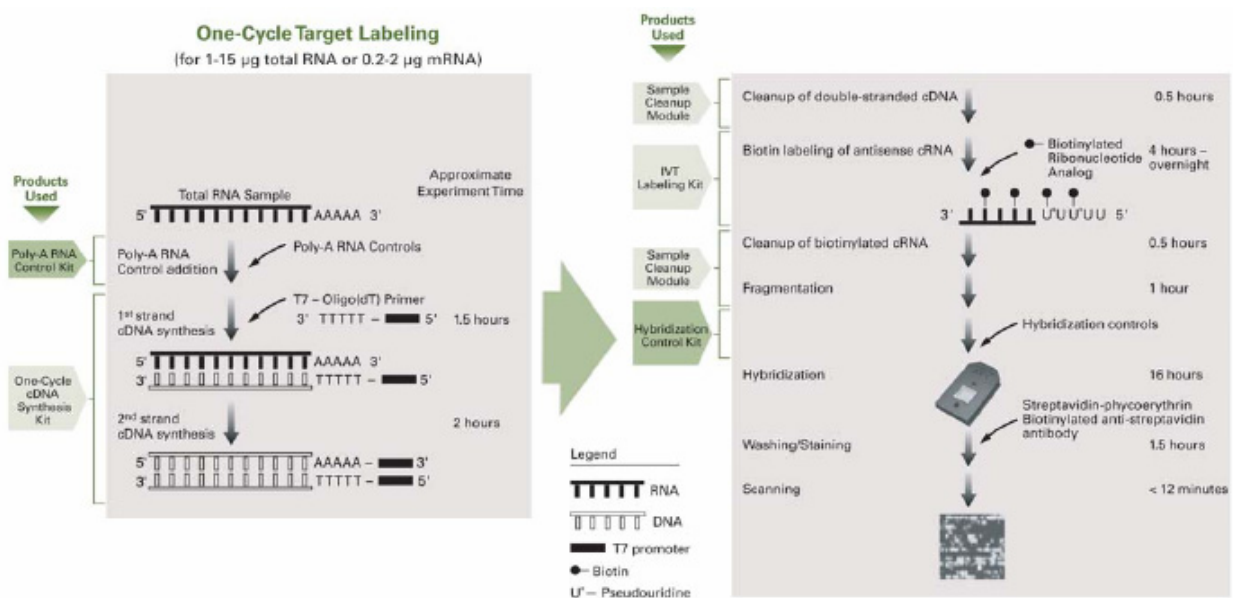


Abbildung 17: Schematischer Ablauf für die Genechip-Analyse (Teile der Abbildung wurden der Anleitung für GeneChip® Expression Analysis von Affymetrix entnommen).

Die Normalisierung, die Aufsummierung der einzelnen Werte für ein Probeset/ Gen, der Vergleich zwischen unbehandelter Kontrolle und der mit Cyclin D1-shRNA infizierten Probe, sowie die statistische Überprüfung wurde mit dem Service von CARMAweb (<https://carmaweb.genome.tugraz.at/carma/>) der technischen Universität Graz oder der ChipInspector-Software (Genomatix, München, Germany) durchgeführt. Bei der statistischen Überprüfung der als signifikant verändert ermittelten Gene wird angegeben, wie viel Prozent der erhaltenen Gene sich möglicherweise als „falsch positiv“ erweisen (False discovery rate = FDR). Diese lag bei den durchgeführten Experimenten zwischen 0,1 und 10%.

3.9 Western Blot

Die Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit eiskaltem PBS, pH 7,45 (Invitrogen) gewaschen, wiederum abzentrifugiert und das Pellet in T-PER-Puffer (Lyse-Puffer von Pierce, Rockford, IL, USA), der zusätzlich Protease-Inhibitoren (Complete Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und Phosphatase-Inhibitoren (Cocktail 1 und 2, Sigma-Aldrich) enthielt, resuspendiert. Nach 30 min Lyse auf Eis wurde der Zell-Debris 10 min bei 4°C /13.000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce).

Gleiche Mengen an Protein (30 bis 60 µg / Probe) aus den Zell-Lysaten wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, dabei wurden fertige Gradienten-Gele (NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Mini, Invitrogen) in Kombination mit MES-Laufpuffer (Invitrogen) und der dazugehörigen Elektrophorese-Kammer (XCell SureLock™ Mini) von Invitrogen verwendet. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond™-ECL™, Amersham, UK). Um eine unspezifische Bindung des ersten Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran zunächst in T-TBS-Puffer (10 mM Tris, pH = 7,6; 100 mM NaCl; 0,1% Tween 20) mit 5% Magermilchpulver (m/v, Saliter, Obergünzburg, Deutschland) eine Stunde bei 37°C blockiert, dann mehrmals mit T-TBS-Puffer gewaschen und mit dem ersten Antikörper (Verdünnung in T-TBS mit 3% BSA) ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in T-TBS-Puffer wurde die Membran mit einem zweiten Antikörper, der sich gegen den ersten Antikörper richtete und an den zur Detektion Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war (Ziege-anti-Kaninchen-HRP oder Ziege-anti-Maus-HRP; Amersham; Verdünnung 1:2000 in T-TBS-Puffer mit 5% Milchpulver, m/v), für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Detektion der HRP-markierten Immunkomplexe wurde mit einem Chemilumineszenz-System (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent System) von Pierce durchgeführt. Die entstandenen Signale wurden mit Hilfe von Röntgenfilmen (Hyperfilm™ ECL, Amersham) und einem automatischen Entwickler (AGFA Curix 60, AGFA, Ridgefield Park, NJ, USA) aufgenommen.

Bei mehrmaliger Verwendung einer Membran wurde diese nach der Detektion kurz in H₂O bidest. gewaschen, dann wurden die vorhandenen Signale durch 10-minütige Inkubation mit Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce) bei 37°C entfernt, und

schließlich wurde nach mehrmaligem Waschen mit T-TBS-Puffer erneut mit der Blockierung begonnen.

Die folgenden Antikörper wurden verwendet:

Antigen	Bezeichnung / Klon	Firma	Eingesetzte Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Grösse in kDa
Cyclin D1	H-295	Santa Cruz *	1:200	Kaninchen	36
Cyclin D2		Cell Signaling **	1:320	Kaninchen	30
Cyclin D3	1	BD Transduction Laboratories™	1:1000	Maus	34
Cyclin E	C-19	Santa Cruz	1:200	Kaninchen	50
CDK2	55	BD Transduction Laboratories™	1:2500	Maus	33
CDK4	DCS 3.1	Santa Cruz	1:200	Kaninchen	34
p27 ^{Kip1}	57	BD Transduction Laboratories™	1:500	Maus	27
phospho-Rb	Ser807/811	Cell Signaling	1:1000	Maus	110
α-Tubulin	B-5-1-2	Sigma-Aldrich	1:5000	Maus	48

* Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

** Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

3.10 Wachstumskurve

Zur Bestimmung der Zahl an lebenden Zellen mit Hilfe einer Wachstumskurve wurde der CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Bei diesem Assay wird von den lebenden Zellen eine Tetrazolium-Verbindung (MTS) zu einem farbigen Formazan-Produkt bioreduziert (siehe Abbildung 18). Die Menge an entstandenem Formazan wird dann bei 490nm photometrisch bestimmt und ist direkt proportional der Menge an lebenden Zellen in Kultur.

Für die Bestimmung wurden die Zellen direkt nach der Infektion gezählt und 1×10^5 Zellen/ ml in 6-well-Platten ausgesät (2 ml pro Well). Dann wurden an allen folgenden Tagen bis 6 Tage nach der Infektion 100 µl von den ausgesäten Zellen mit 10 µl des MTS-Reagenz in einer 96-well-Platte vermischt und je nach Zelllinie 2 bis 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Schließlich wurde die Absorption bei 490nm gemessen (Microplate Reader 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

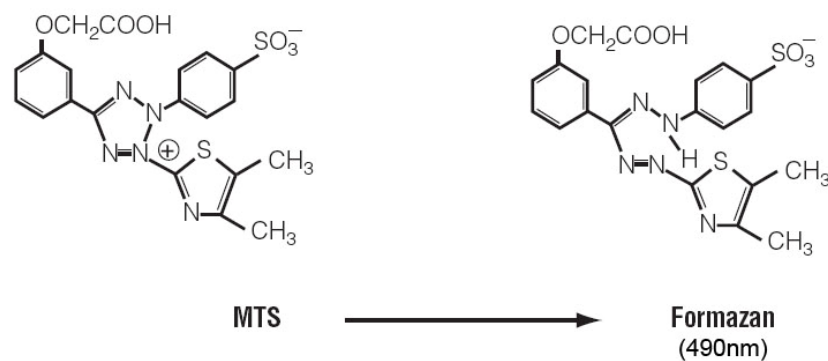


Abbildung 18: Struktur der Tetrazolium-Verbindung (MTS) und des gebildeten Formazans (Teile der Abbildung wurden aus der Anleitung für den CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega entnommen).

3.11 Durchflusszytometrische Analyse von Zellzyklus und Apoptose

Für die Analyse des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie wurde für die Messung der Zellkerne (Verteilung auf die Zellzyklusphasen) ein Protokoll von Nuesse et al. benutzt [186]. Nach diesem Protokoll werden die Zellen mit zwei Lösungen behandelt. Dabei zerstört die erste Lösung die Zellmembran und setzt die Zellkerne frei, während die zweite Lösung die Kerne stabilisiert. Beide Lösungen enthalten Ethidiumbromid als DNA-spezifisches Fluorophor. Sub-diploide Zellen ($<2n$) sind apoptotisch und können auch mit Hilfe dieser Methode quantifiziert werden. Alternativ wurden apoptotische Zellen mit dem Annexin-V-Fluos staining kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) angefärbt. Alle Messungen wurden am Durchflusszytometer LSR II (BD, San Jose, CA, USA) durchgeführt und die Daten mit der ModFit LT™ Software Version 3.0 (Verity Software, Topsham, ME, USA) analysiert.

3.12 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) und wurden mit dem höchstmöglichen Reinheitsgrad (pro analysi) verwendet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

4.1.1 Expression von Cyclin D1, D2 und D3 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Die verwendeten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurden hinsichtlich der Expression von Cyclin D1, D2 und D3 charakterisiert. Eine starke Cyclin D1-Expression infolge der für das Mantelzell-Lymphom charakteristischen Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, die alle verwendeten Zelllinien aufweisen (Tabelle 2), findet man mittels Western Blot vor allem in den Zelllinien Jeko-1, Rec-1, Z-138 und UPN-1 (Abbildung 19). Die Zelllinien Hbl-2 und Granta 519 weisen ebenfalls eine hohe Cyclin D1-Expressionsrate auf, auch wenn diese im Vergleich mit den anderen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien etwas schwächer ist. JVM-2-Zellen weisen dagegen ein für Mantelzell-Lymphom-Zelllinien untypisches, schwaches Cyclin D1-Expressionssignal auf.

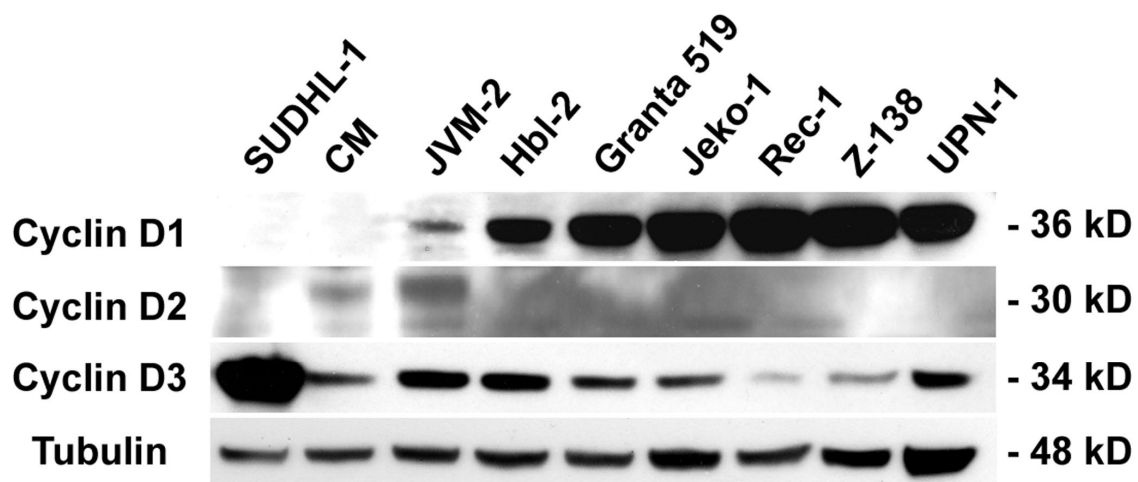


Abbildung 19: Protein-Expression von Cyclin D1, D2 und D3 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien (Western Blot). Tubulin dient zur internen Kontrolle der Probenauftragung. Die Zell-Linie SUDHL-1 gehört nicht zu den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien, sondern dient nur als Positiv-Kontrolle für die Expression von Cyclin D3. Die B-Lymphoblastoide Zelllinie CM soll den Expressionszustand der D-Typ-Cycline in normalen B-Lymphozyten widerspiegeln.

Auf RNA-Ebene betrachtet (Abbildung 20A), entspricht das in etwa einem um den Faktor 2 höheren Wert für die stark Cyclin D1-exprimierenden Zelllinien Jeko-1, Rec-1, Z-138 und UPN-1 gegenüber den Zelllinien Hbl-2 und Granta 519 mit einer mittleren Expression von Cyclin D1. Im Bezug auf die nur schwach Cyclin D1-

exprimierende Zelllinie JVM-2 ist die mRNA-Menge in den stark Cyclin D1 exprimierenden Zelllinien etwa um den Faktor 14 und in den Zelllinien mit einer mittleren Cyclin D1-Expression etwa um den Faktor 7 höher. Die Cyclin D1-Expression der B-Lymphoblastoiden Zelllinie CM, die in etwa den Zustand in normalen B-Lymphozyten widerspiegelt, ist mittels Western Blot nicht nachweisbar und auf RNA-Ebene selbst im Vergleich mit der Zelllinie JVM-2 nur sehr gering (Faktor 230).

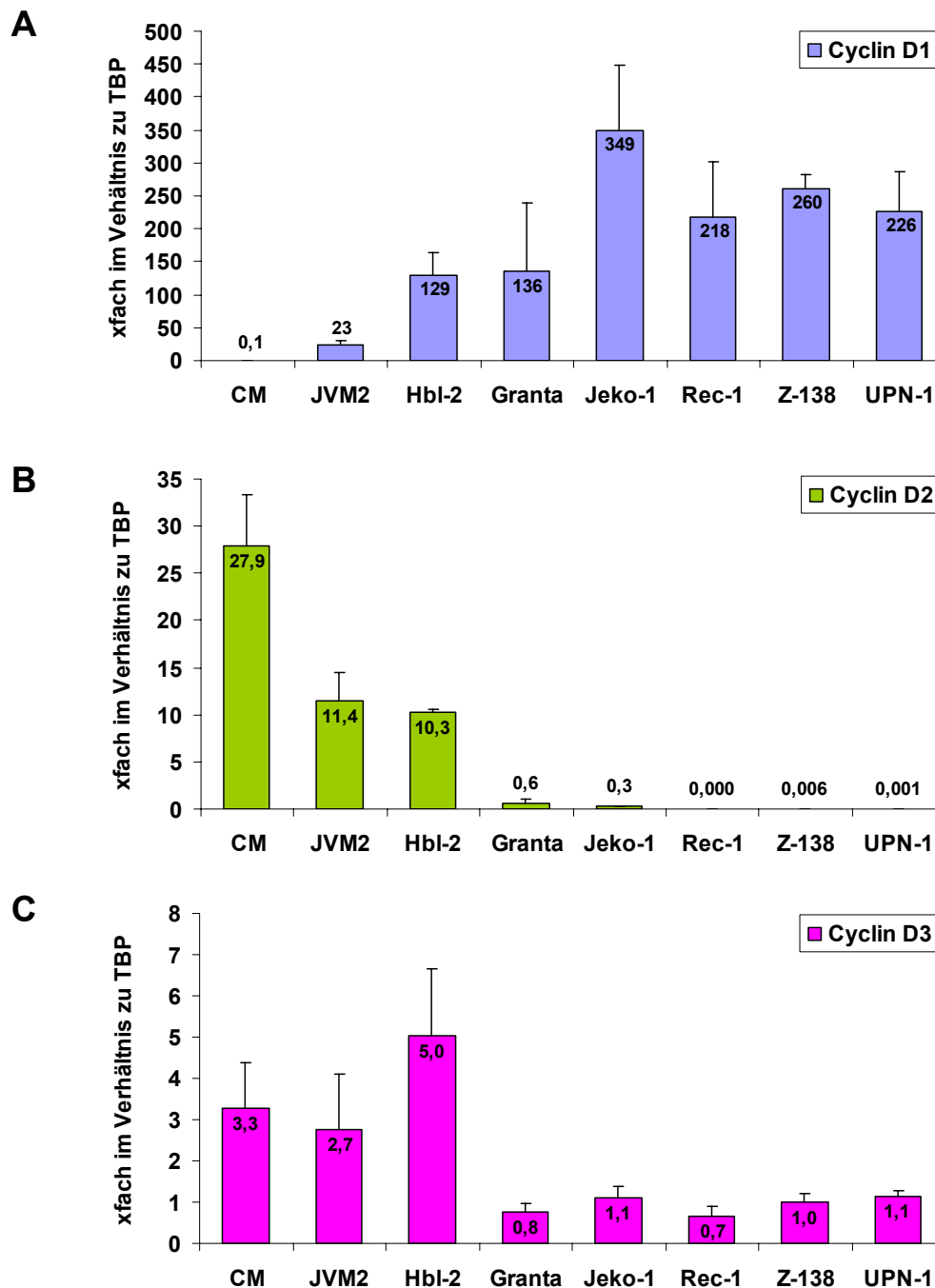


Abbildung 20: mRNA-Expression von Cyclin D1(A), D2(B) und D3(C) in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien (qRT-PCR). Alle mRNA-Werte sind im Verhältnis zum mRNA-Wert der endogenen Kontrolle TBP (=TATA-Box bindendes Protein) dargestellt. Die B-Lymphoblastoide Zelllinie CM soll den Zustand in normalen B-Lymphozyten widerspiegeln.

Bei Cyclin D2 verhält es sich genau umgekehrt. Nur in der schwach Cyclin D1-exprimierenden Zelllinie JVM-2 und in der B-Lymphoblastoiden Zelllinie CM ist Cyclin D2 mittels Western Blot klar nachweisbar (Abbildung 19). Auch auf RNA-Ebene (Abbildung 20B) wird deutlich, dass, je mehr Cyclin D1 exprimiert wird, desto weniger Cyclin D2 vorhanden ist (Vergleich zwischen Abbildung 20A und B). Die höchste Konzentration an Cyclin D2 weist auf RNA-Ebene die B-Lymphoblastoide Zelllinie CM auf, gefolgt von den Zelllinien JVM-2 und Hbl-2 mit einer um den Faktor 2,6 geringeren Menge an Cyclin D2 und den Zelllinien Granta 519 und Jeko-1 mit einer um den Faktor 62 geringeren Cyclin D2-Menge. Bei drei Zelllinien mit starker Cyclin D1-Expression (Rec-1, Z-138, UPN-1) ist die Konzentration an Cyclin D2-mRNA so gering, dass sie kaum noch nachweisbar ist.

Betrachtet man die Expression von Cyclin D3 mittels Western Blot (Abbildung 19), so fällt auf, dass nur die Zelllinie SUDHL-1, die nicht zu den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien gehört und lediglich als Positiv-Kontrolle für die Cyclin D3-Expression dient, ein stärkeres Signal aufweist, während das Cyclin D3-Signal in allen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien annähernd gleich ist. Dies bestätigt sich auch auf RNA-Ebene (Abbildung 20C). Hier lässt sich ein geringer Faktor von 7 zwischen der niedrigsten und höchsten Cyclin D3-mRNA-Konzentration ermitteln. Ausserdem liegen im Vergleich zu der teilweise starken Expression von Cyclin D1 insgesamt nur niedrige Mengen an Cyclin D3 vor.

Während sich die Cyclin D1- und D2-Expression in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien also komplementär verhält, ist die Expression von Cyclin D3 in allen Zelllinien annähernd gleich gering.

4.1.2 Expression wichtiger Zellzyklus-Proteine in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Abgesehen von der Expression von Cyclin D1, D2 und D3 wurde auch die Expression wichtiger Zellzyklus-Proteine, die mit Cyclin D1 in Zusammenhang stehen, untersucht (siehe Abbildung 6 in der Einleitung und Abbildung 21). Hier fällt auf, dass die Expression von CDK4 (neben CDK6 einer der beiden katalytischen Partner der D-Cycline) genau in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien am stärksten ist, die auch die stärkste Cyclin D1-Expression aufweisen. Dieser Abhängigkeit folgend ist die Expression von CDK4 in der B-Lymphoblastoiden Zelllinie CM am

schwächsten. Im Gegensatz zu CDK4 ist CDK6 in allen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien nur sehr schwach exprimiert und mittels Western Blot nicht nachweisbar.

Ebenfalls im Kontrast zur CDK4-Expression folgt die Expression von Cyclin E und seinem katalytischen Partner CDK2 nicht der Cyclin D1-Expression und auch die Expression von p27^{Kip1}, dem Inhibitor des Cyclin D-CDK4-Komplexes, zeigt keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien.

Die Aminosäuren Serin 807 und Serin 811 des Retinoblastoma-Proteins Rb sind zwei von mehreren Aminosäure-Resten, die ausschließlich durch den Cyclin D-CDK4-Komplex phosphoryliert werden. Das Phosphorylierungs-Signal von Rb fehlt bei UPN-1 völlig, da in dieser Zelllinie eine homozygote Deletion von Rb vorliegt. Ansonsten ist Rb außer in den Zelllinien Hbl-2 und Jeko-1 in allen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien und auch in der B-Lymphoblastoiden Zelllinie CM hyperphosphoryliert und damit inaktiviert.

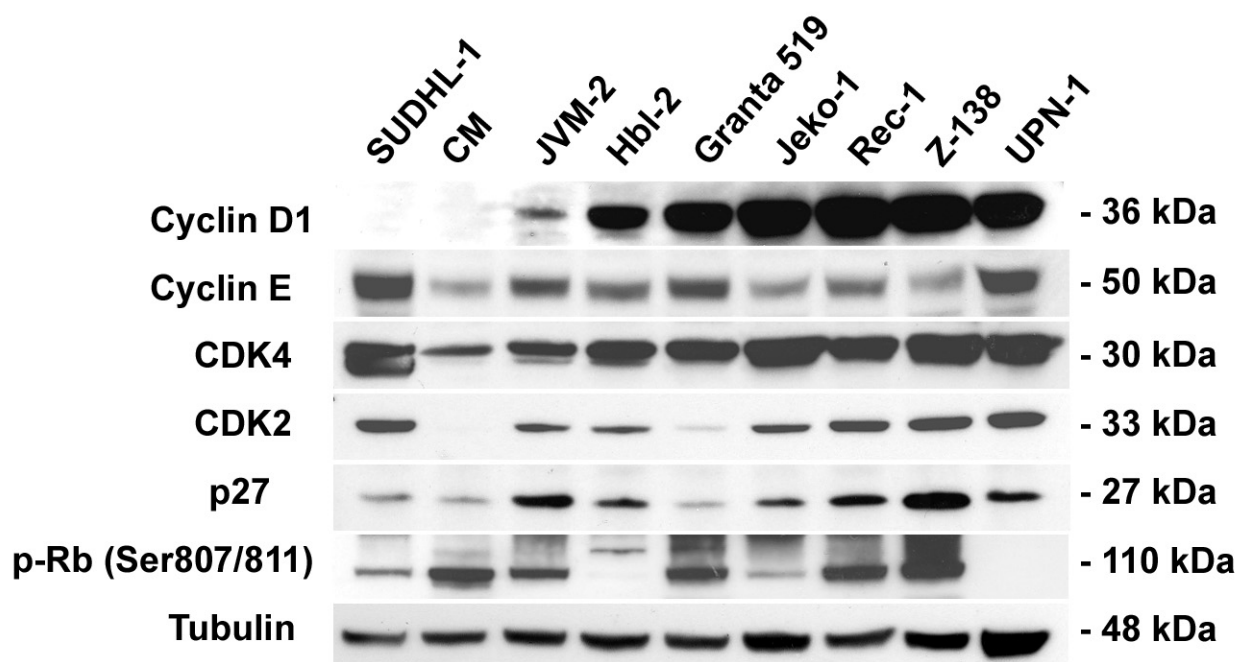


Abbildung 21: Protein-Expression wichtiger Zellzyklus-Proteine in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien (Western Blot). Tubulin dient als interne Kontrolle der Proben. Die B-Lymphoblastoide Zelllinie CM soll den Zustand in normalen B-Lymphozyten widerspiegeln.

4.2 Identifizierung einer shRNA mit hoher Effizienz gegen Cyclin D1

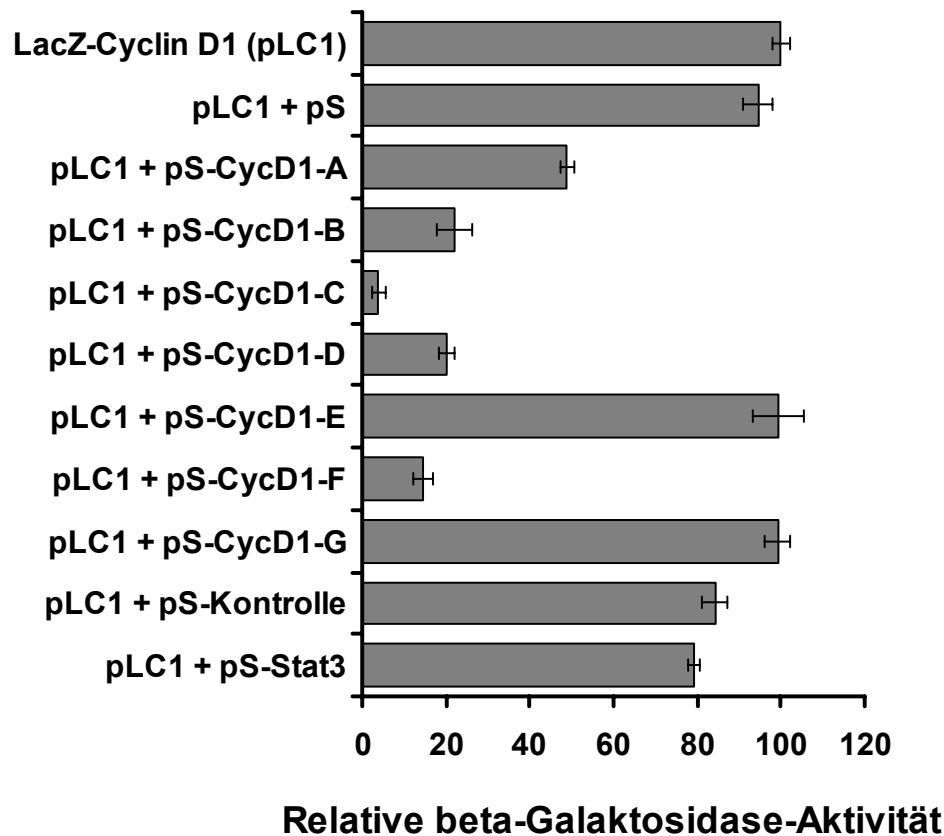
4.2.1 Überprüfung der Cyclin D1-shRNA-Sequenzen

mittels β -Galaktosidase-Assay

Zu Beginn des Projekts waren in der Literatur keine shRNA-Sequenzen gegen Cyclin D1 zu finden. Daher mussten mit Hilfe verschiedener Internet-Tools Sequenzen erstellt (Tabelle 1) und anschließend hinsichtlich ihrer tatsächlichen Effizienz gegen Cyclin D1 getestet werden. Wie im Abschnitt 3.3 beschrieben, wurde dieser Test mit dem BLOCK-iT™ RNAi Target Screening System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Die zentrale Rolle spielt hier ein Plasmid, das Cyclin D1 in Fusion mit *LacZ* exprimiert (Genprodukt von *LacZ* = β -Galaktosidase). Wird dieses Plasmid mit den Cyclin D1-shRNA-Sequenzen in HEK293T-Zellen kotransfiziert, so ist die Menge des gebildeten Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsproteins direkt von der Effizienz der Cyclin D1-shRNA abhängig. Denn je effizienter die Cyclin D1-shRNA ist, desto besser führt sie zum Abbau der Cyclin D1-*LacZ*-Fusions-mRNA und desto weniger Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsprotein wird translatiert. Eine Möglichkeit, die Menge des gebildeten Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsproteins zu bestimmen, ist der β -Galaktosidase-Assay. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse dieses Assays zusammengefasst.

Dabei wurde die β -Galaktosidase-Aktivität des Fusionsproteins ohne kotransfizierte Cyclin D1-shRNA als 100%-Wert festgesetzt (pLC1). Um sicherzugehen, dass das Testsystem spezifisch ist, wurden zusätzlich drei Kontrollen durchgeführt: zum einen wurde der shRNA-Expressionsvektor pSUPER (pS) als Leervektor (pLC1 + pS), zum anderen eine Kontroll-shRNA, die keinerlei Komplementarität zu irgendeinem humanen Gen aufwies (pLC1 + pS-Kontrolle) sowie eine shRNA gegen *STAT3* (pLC1 + pS-Stat3) kotransfiziert. Alle drei Kontrollen wiesen eine im Verhältnis zu pLC1 kaum veränderte β -Galaktosidase-Aktivität auf.

Betrachtet man die sieben Cyclin D1-shRNA-Sequenzen (pLC1 + pS-CycD1-A bis G), so haben die Sequenzen A, E und G keinerlei oder nur einen geringen Effekt auf die Expression des Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsproteins (A: 48,9%; E: 99,5% G: 99,1%). Dagegen zeigen die Sequenzen B, D und F eine deutlich bessere Effizienz gegen das Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsprotein und vermindern seine Aktivität um 78 bis 85,6%. Die Sequenz mit der höchsten Effizienz war die Sequenz C, welche die Aktivität des β -Galaktosidase-Fusionsproteins um 96,1% reduzierte.



Umklonieren der shRNA-Sequenzen
aus dem shRNA-Vektor pSuper
in den lentiviralen Vektor pFUGW

pSUPER (pS) → pFUGW (pF)

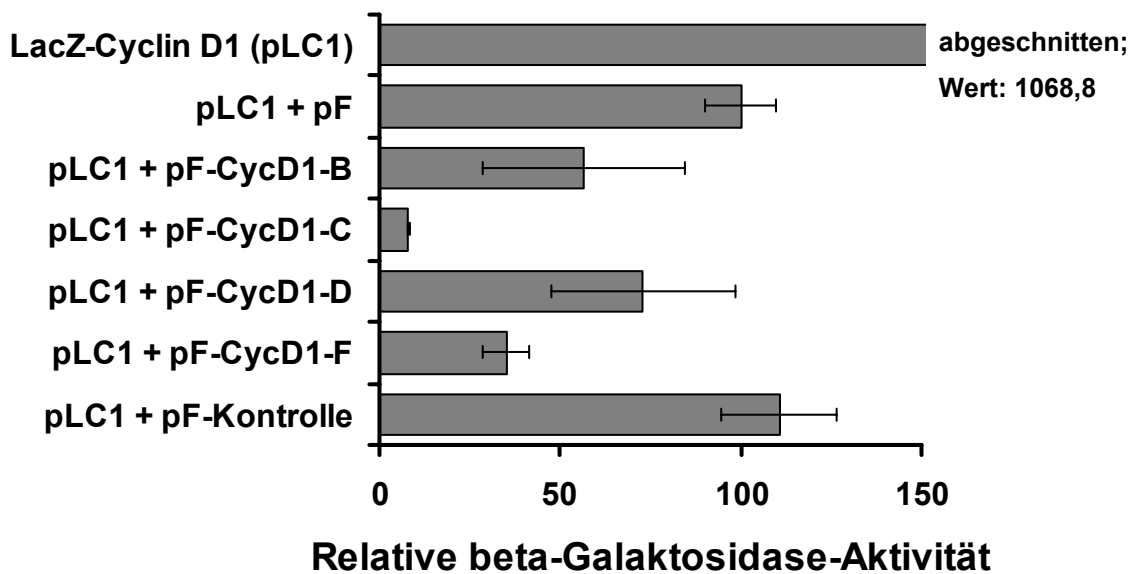


Abbildung 22: β -Galaktosidase-Assay als Effizienz-Test für die erstellten Cyclin D1-shRNA-Sequenzen. β -Galaktosidase-Aktivität LacZ-Cyclin D1 (pLC1) = 100%; kontranzifizierte Kontrollen: pLC1 + pS, pLC1 + pS-Kontrolle und pLC1 + pS-Stat3; kotransfizierte Cyclin D1-shRNA-Sequenzen: pLC1 + pS-CycD1-A bis G. Das Umklonieren aus dem shRNA-Vektor pSUPER in den lentiviralen Vektor pFUGW wird durch die Bezeichnungen pS und pF verdeutlicht.

Die Wiederholung des β -Galaktosidase-Assays nach Umklonieren der vier besten Sequenzen in den lentiviralen Vektor pFUGW zeigte, dass die Kotransfektion des leeren lentiviralen Vektors (pLC1 + pF) schon zu einer Verminderung der β -Galaktosidase-Aktivität auf etwa 10% des Ausgangs-Niveaus führte. Daher wurde nun dieser Wert als 100%-Wert festgelegt. Obwohl die Sequenzen B, D und F hier eine weitaus schwächere Verminderung der Expression ergaben (27 bis 65%), war die Effizienz der besten Sequenz C mit 92% Verminderung annähernd gleich gut.

4.2.2 Überprüfung der Cyclin D1-shRNA-Sequenzen mittels Western Blot

Der Western Blot ist bei Anwendung des BLOCK-iT™ RNAi Target Screening Systems (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eine weitere Möglichkeit, die Menge des gebildeten Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsproteins zu bestimmen. Dabei wurden die Protein-Lysate der mit *LacZ*-Cyclin D1 und den Cyclin D1-shRNA-Sequenzen kotransfizierten HEK293T-Zellen für den Western Blot aufgetragen. Mit einem Cyclin D1-Primär-Antikörper ließen sich dann sowohl die Expression des Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsproteins (126 kDa) als auch des endogenen Cyclin D1 (36 kDa) und deren Verminderung durch die Cyclin D1-shRNA-Sequenzen nachweisen (Abbildung 23).

Als Positiv-Kontrolle für endogenes Cyclin D1 wurde die Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Granta 519 verwendet, da die HEK293T-Zellen wenig endogenes Cyclin D1 exprimieren. Die Transfektion mit *LacZ*-Cyclin D1 (pLC1) allein bzw. in Kombination mit dem leeren shRNA-Vektor pSUPER (pLC1 + pS) führte zu einer starken Expression des Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsproteins. Durch die Kotransfektion der effizientesten Cyclin D1-shRNA-Sequenz (pLC1 + pS-CycD1-C) wurde die Expression sowohl des Cyclin D1- β -Galaktosidase-Fusionsproteins als auch des endogenen Cyclin D1 komplett hinunterreguliert. Bei den weniger effizienten Cyclin D1-shRNA-Sequenzen (pLC1 + pS-CycD1-F und pLC1 + pS-CycD1-B) verschwand die Cyclin D1-Bande im Western Blot nur auf endogener Ebene vollständig und blieb beim Fusionsprotein teilweise erhalten.

Nach Umklonieren der Sequenzen in den lentiviralen Vektor und dessen Verwendung bestätigten sich im Western Blot die Ergebnisse, die mit den pSUPER-Konstrukten gefunden wurden. Allerdings wurde hier wie im β -Galaktosidase-Assay deutlich, dass die Kotransfektion des leeren lentiviralen Vektors schon zu einer verminderten Expression des Fusionsproteins führt (Vergleich pLC1 und pLC1 + pF).

Leider war das Signal beim endogenen Cyclin D1 hier insgesamt schwächer, so dass die von vornherein niedrigen Konzentrationen in den HEK293T-Zellen nicht mehr nachzuweisen waren.

Für alle weiteren Experimente wurde die effizienteste Cyclin D1-shRNA Sequenz (Sequenz C) verwendet, die Ergebnisse wurden dann mit der zweitbesten Sequenz (Sequenz F) validiert.

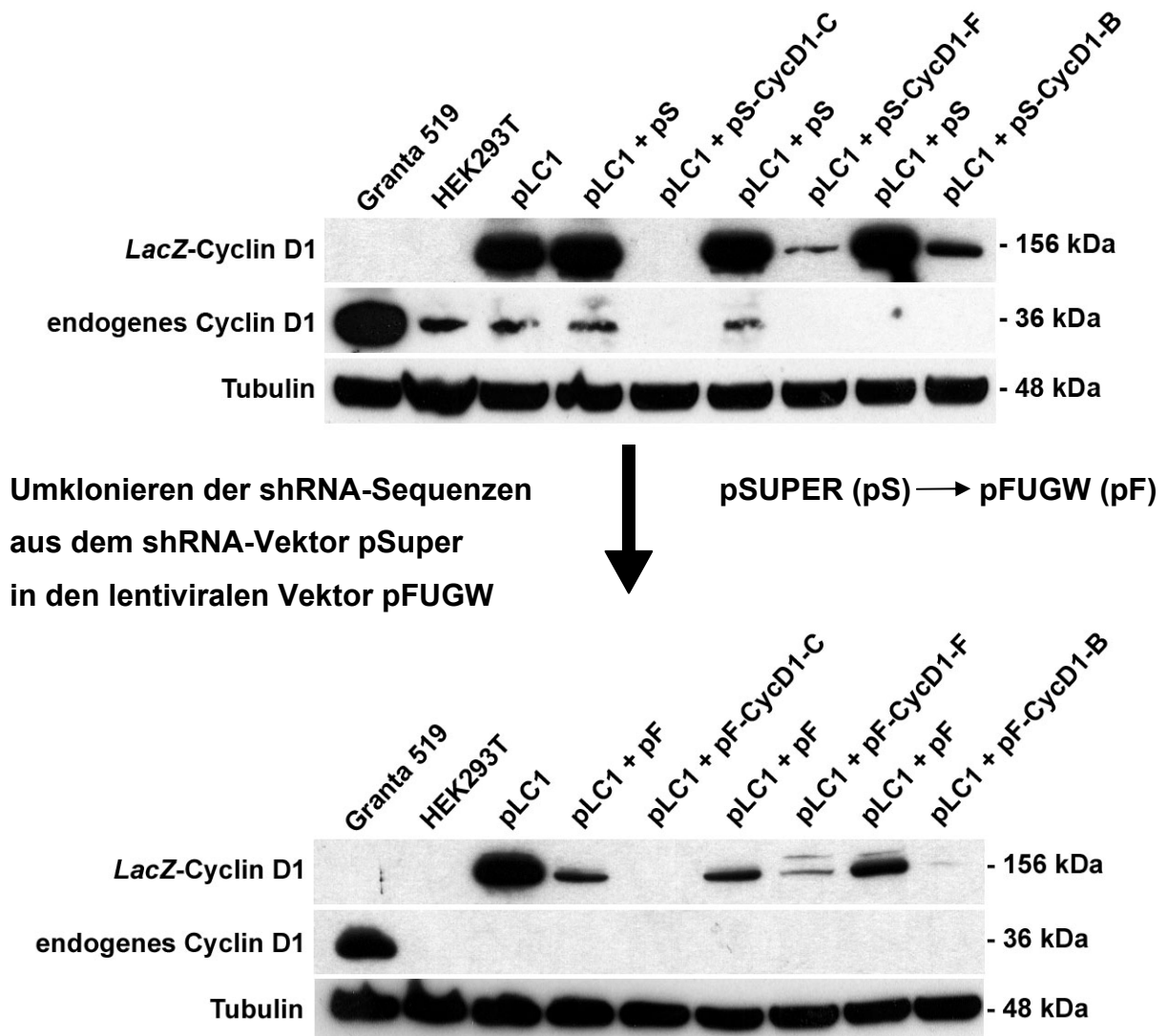


Abbildung 23: Western Blot als Effizienz-Test für die erstellten Cyclin D1-shRNA-Sequenzen. Zell-Lysate von: Granta 519 = Positiv-Kontrolle für endogenes Cyclin D1; HEK293T = unbehandelte Zellen; pLC1 (+ pS) = mit *LacZ*-Cyclin D1 (und dem leeren pSUPER-Vektor) transfizierte Zellen; pLC1 + pS-CycD1-C/F/B = mit *LacZ*-Cyclin D1 und der jeweiligen Cyclin D1-shRNA transfizierte Zellen. Tubulin dient zur internen Kontrolle der Probenauftragung. Das Umklonieren aus dem shRNA-Vektor pSUPER in den lentiviralen Vektor pFUGW wird durch die Bezeichnungen pS und pF verdeutlicht.

4.3 Effizienter Transfer der Cyclin D1-shRNA in die Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mittels lentiviraler Infektion

4.3.1 Titration des Optimums an Virenmenge am Beispiel der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Granta 519

Von den beiden effizientesten Sequenzen gegen Cyclin D1 (pS-CycD1-C / pS-CycD1-F; Abschnitt 4.2) wurden nach der Umklonierung in den lentiviralen Vektor pFUGW Viren produziert. Wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, wurde dabei der entsprechend modifizierte lentivirale Vektor pFUGW zusammen mit den beiden Verpackungsplasmiden ΔR 8.9 und VSVG in HEK293T-Zellen transfiziert und der Virus durch die Sammlung und Konzentrierung des Zellüberstandes 48 h nach der Transfektion gewonnen. Die Infektion der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit dem konzentrierten Virus erfolgte nach folgendem Schema: zum ersten wurden die unbehandelten Zelllinien als Kontrolle mitgeführt (C), des Weiteren wurden die Zelllinien mit leerem Virus (pF) und mit einem Virus, der die Kontroll-shRNA enthielt (pF-C; Abschnitt 4.2.1), infiziert, um unspezifische Effekte (Viren/ shRNA) auszuschließen. Parallel dazu erfolgte die Infektion mit dem Cyclin D1-shRNA-Virus (pF-CycD1).

Um eine maximale Verminderung der Expression von Cyclin D1 zu erreichen und dabei zur Vermeidung unspezifischer Effekte mit möglichst wenig Virus auszukommen, wurde für jede Mantelzell-Lymphom-Zelllinie das Optimum an Virenmenge durch Titration ermittelt. Als Beispiel dienen die Ergebnisse mit der Zelllinie Granta 519 (Abbildung 24).

Granta 519-Zellen wurden mit steigenden Mengen an Virus infiziert (Multiplicity of Infection (MOI) = 15, 45, 90) d.h., dass im Verhältnis zu einer Zelle 15, 45 oder 90 Viren eingesetzt wurden. Obwohl durch FACS-Analyse festgestellt wurde, dass die Infektionsrate bei allen drei Virenmengen bei annähernd 100% lag (Abbildung 24A), war der Effekt auf Cyclin D1 unterschiedlich.

Die Analyse von Cyclin D1 auf RNA- (Abbildung 24B; rote Balken) und Proteinebene (Abbildung 24C) machte deutlich, dass die Verminderung der Expression von Cyclin D1 bei einem MOI von 45 effizienter war als bei einem MOI von 15 (Cyclin D1/TBP-Ratio: 0,33 vs. 0,52). Eine weitere Steigerung der Virenmenge verbesserte die Knockdown-Effizienz gegen Cyclin D1 nicht. Deshalb wurde für die Zelllinie Granta 519 in allen weiteren Experimenten ein MOI von 45 eingesetzt.

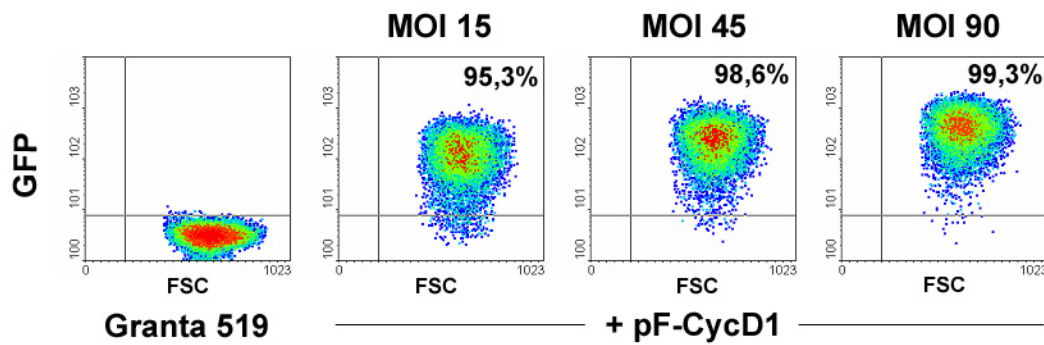
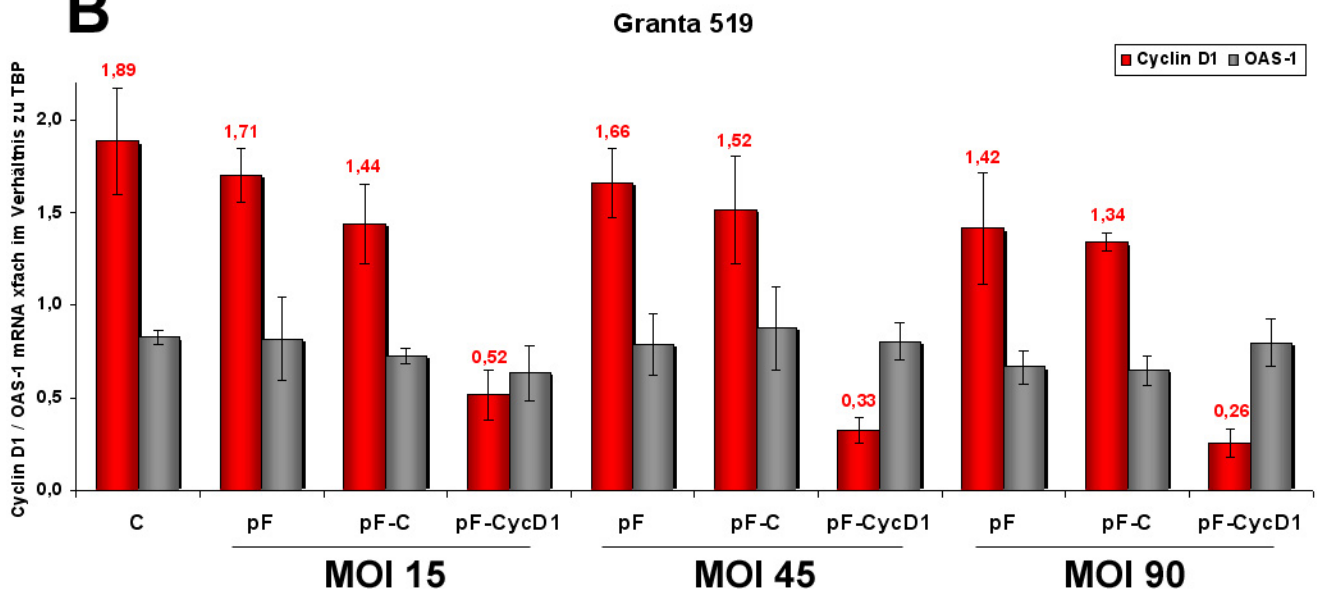
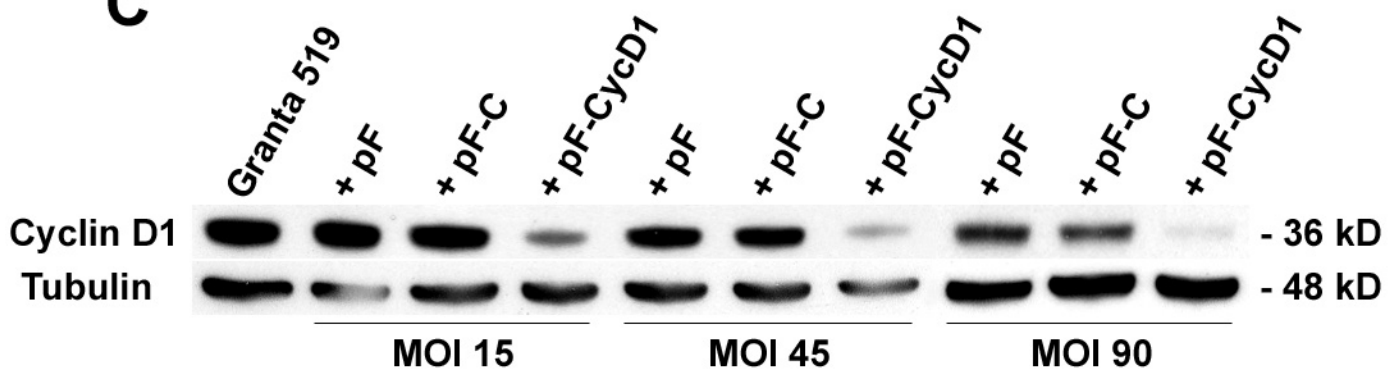
A**B****C**

Abbildung 24: Titration des Optimums an Virenmenge am Beispiel der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Granta 519. (A) FACS-Analyse infizierter Granta 519-Zellen drei Tage nach Infektion. Die Infektion erfolgte mit steigenden Mengen an Virus (MOI = 15, 45, 90), infizierte Zellen sind GFP-positiv. **(B)** Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Cyclin D1 und OAS1 in den infizierten Granta 519-Zellen drei Tage nach Infektion durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). Die Mengen an RNA wurden durch lineare Regression ausgehend von einer externen Standardkurve ermittelt und auf die TBP-Werte bezogen. Die Ergebnisse sind als Cyclin D1/TBP- oder OAS-1/TBP-Ratio dargestellt. **(C)** Bestimmung der Cyclin D1-Proteinexpression in den infizierten Granta 519-Zellen drei Tage nach Infektion durch Western Blot. Tubulin dient als interne Kontrolle der Proben. C = unbehandelte Zellen; pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-C = mit Kontroll-shRNA-Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).

Wichtig war auch, dass durch die lentivirale Infektion selbst bei einem MOI von 90 keine Interferon-Antwort ausgelöst wurde. Dies wurde durch die mRNA-Quantifizierung des Interferon-stimulierten Gens *OAS-1*, das bei allen Infektionen unveränderte Konzentrationen im Verhältnis zur Kontrolle aufwies, nachgewiesen (Abbildung 24B; graue Balken).

4.3.2 Infektionsraten in den verschiedenen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Die im vorhergehenden Abschnitt anhand der Zelllinie Granta 519 beschriebene Titration des Optimums an Virenmenge wurde in allen weiteren Mantelzell-Lymphom-Zelllinien durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zelllinien für die lentivirale Infektion unterschiedlich empfänglich waren.

Bei den Zelllinien Rec-1 und Hbl-2 wurden trotz Einsatz steigender Virusmengen nur geringe Infektionsraten erreicht (Abbildung 25; Hbl-2: nur 41,7% infizierte Zellen bei einem MOI von 90). Dagegen lag die Grenze der Infektionsrate bei den Zelllinien JVM-2 und UPN-1 etwas höher (JVM-2: etwa 75% infizierte Zellen bei einem optimalen MOI von 70; UPN-1: etwa 85% infizierte Zellen bei einem optimalen MOI von 45). Eine hohe Infektionsrate von annähernd 100% hatten neben Granta 519-Zellen die Zelllinien Jeko-1 und Z-138, wobei das Optimum an Virenmenge bei Jeko-1 im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien etwas höher lag (MOI = 90). Bei den Zelllinien mit niedriger Infektionsrate wurde der Versuch unternommen, die infizierten Zellen durch Zell-Sortierung anzureichern. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Prozedere einen großen Stress auf die Zellen ausübte, der eine Rekultivierung der Zellen nach der Zell-Sortierung verhinderte.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die weiteren Experimente nur die Zelllinien mit mittlerer bis hoher Infektionsrate (Granta 519, Jeko-1, JVM-2, UPN-1, Z-138) verwendet.

4.3.3 Verminderung der Expression von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit mittlerer bis hoher Infektionsrate

In den Zelllinien mit mittlerer bis hoher Infektionsrate wurde nach der Optimierung der Virenmenge der Effekt des Cyclin D1-shRNA-Virus (pF-CycD1) auf die RNA- und Proteinmenge von Cyclin D1 untersucht. Dabei wurde zum Vergleich immer die unbehandelte Zelllinie als Kontrolle mitgeführt, ebenso wie die Virus- und die shRNA-Kontrolle (pF/ pF-C).

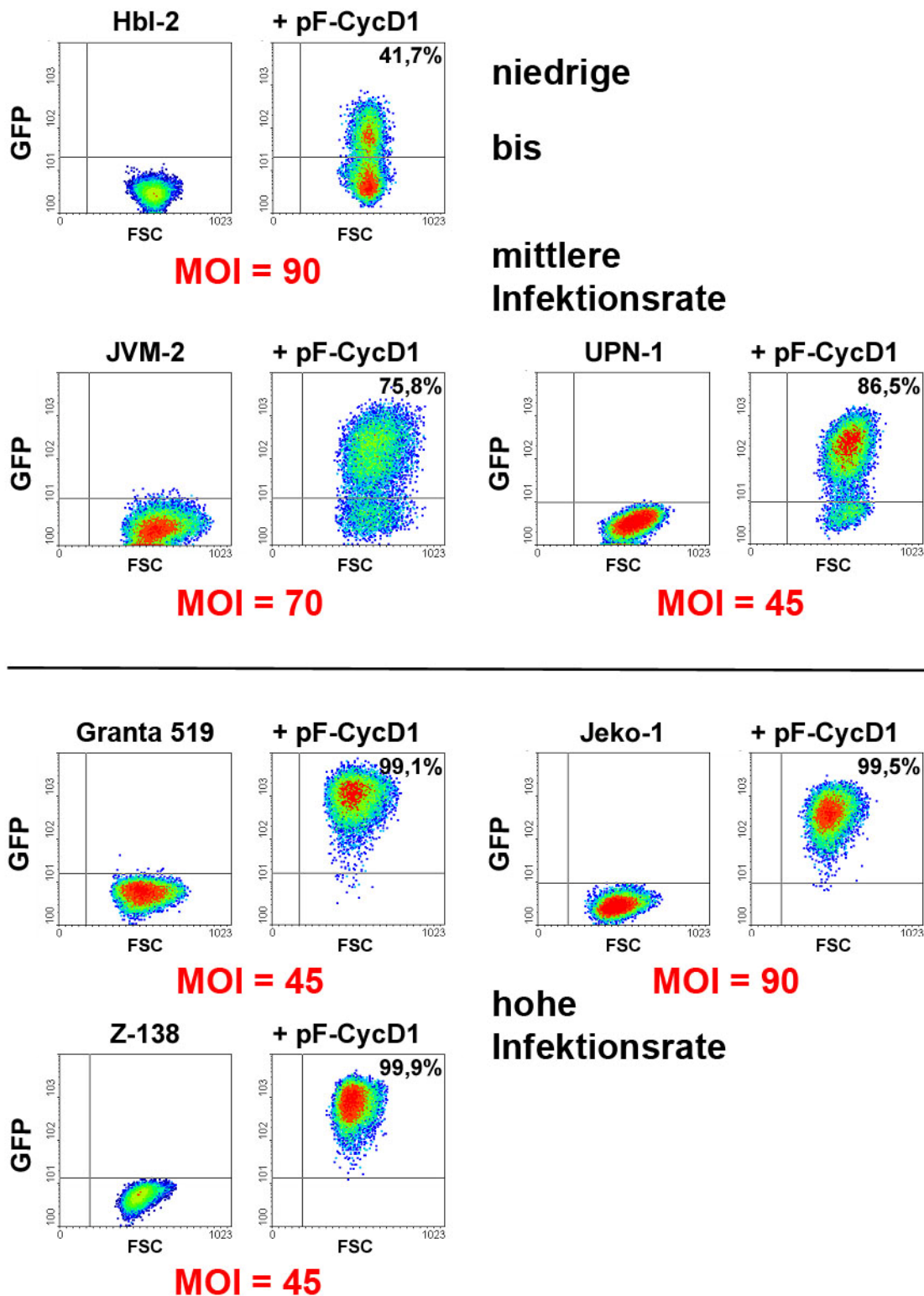


Abbildung 25: Infektionsraten in den verschiedenen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. FACS-Analyse der mit Cyclin D1-shRNA-Virus (pF-CycD1) infizierten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien drei Tage nach Infektion, infizierte Zellen sind GFP-positiv. Die MOI-Werte stellen das Viren-Optimum zur Infektion jeder Zelllinie dar.

Wie in Abbildung 26 im Western Blot unter den Balkendiagrammen zu erkennen ist, führte die Infektion mit dem Cyclin D1-shRNA-Virus in den Zelllinien Jeko-1, UPN-1, Z-138 und Granta 519 zu einer deutlichen Reduktion der Cyclin D1-Proteinmenge.

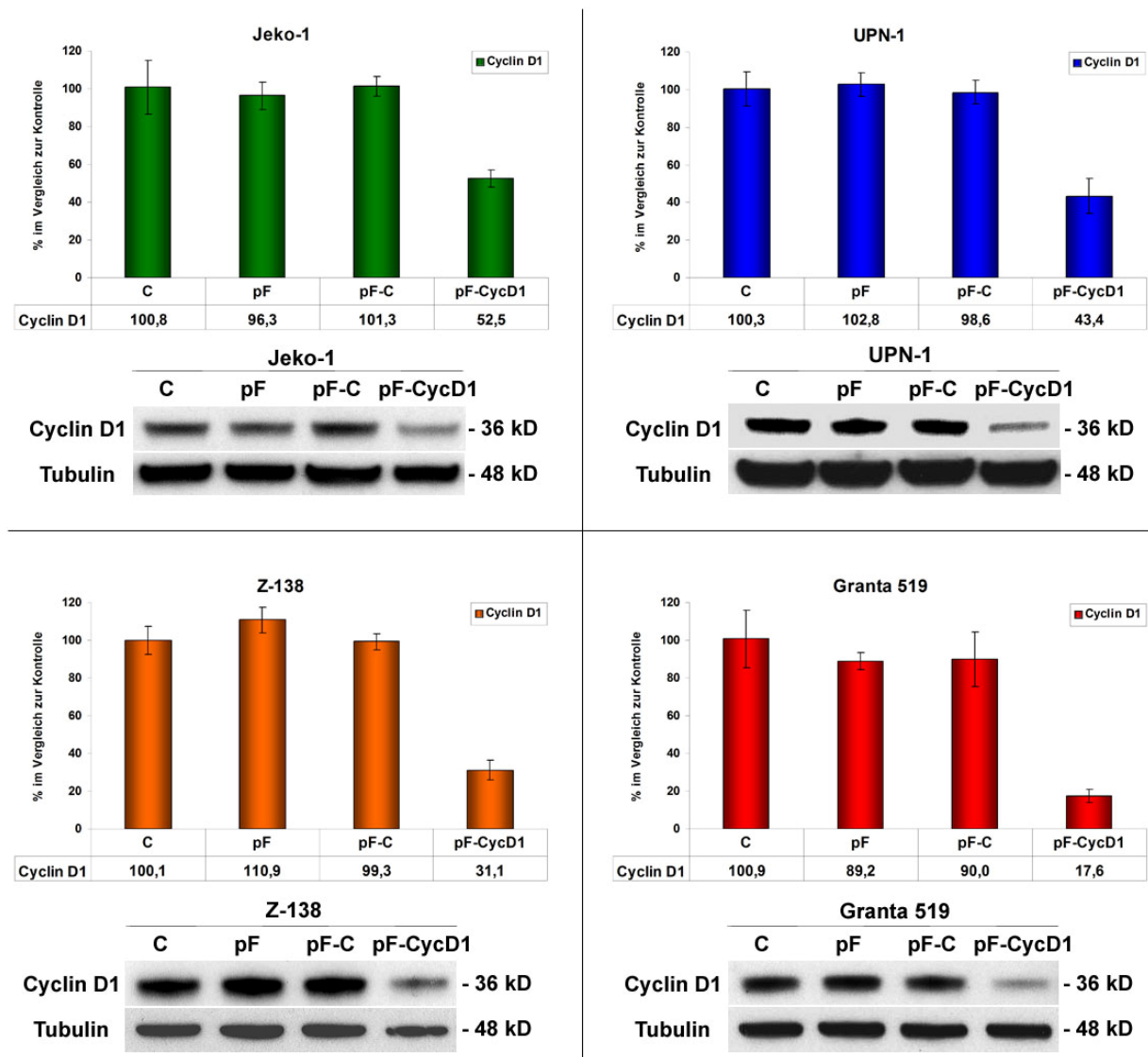


Abbildung 26: Verminderung der Expression von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit mittlerer bis hoher Infektionsrate. Bestimmung der mRNA-Mengen (Balkendiagramme) und Protein-Mengen (Western Blots unter den Balkendiagrammen) von Cyclin D1 in den Zelllinien Jeko-1 (grün), UPN-1 (blau), Z-138 (orange) und Granta 519 (rot) sieben Tage nach Infektion. Cyclin D1-mRNA: quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die unbehandelte Kontrolle und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). Cyclin D1-Protein: Western Blot mit Tubulin als interner Kontrolle der Proben. C = unbehandelte Zellen; pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-C = mit Kontroll-shRNA-Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).

Die mRNA-Quantifizierung, die in Form von Balkendiagrammen dargestellt ist, zeigt, dass in den Zelllinien mit mittlerer Infektionsrate (UPN-1) oder sehr hohen Cyclin D1-Ausgangskonzentrationen (Jeko-1, Z-138) im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle eine Verminderung der Expression um 47,5% (Jeko-1) bis 68,9% (Z-138) erreicht

wurde. Selbst bei der Zelllinie Granta 519, die im Verhältnis zu den anderen Zelllinien weniger stark Cyclin D1 exprimiert (Abschnitt 4.1.1) und eine hohe Infektionsrate aufweist (Abschnitt 4.3.2), wurde zwar die beste Reprimierung von Cyclin D1 erreicht, dennoch blieb eine Cyclin D1-mRNA-Menge von 17,8% im Vergleich zur Kontrolle erhalten.

Dies zeigt die Wichtigkeit der vorhergegangenen Optimierungs-Prozesse (Cyclin D1-shRNA-Sequenz/ lentivirale Infektion), da infolge der hohen Cyclin D1-Konzentrationen in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien ohne diese Optimierung kaum ein entscheidender Effekt auf die Cyclin D1-Expression erreicht worden wäre.

Wichtig ist noch zu erwähnen, dass die verminderte Expression von Cyclin D1 über 14 Tage nach der Infektion stabil beobachtet werden konnte und auch nach Einfrieren und Auftauen der infizierten Zellen persistierte.

4.4 Einfluss der verminderten Expression von Cyclin D1 auf die Wachstums-Rate der Zellen

Nach ausreichender Hinunterregulation von Cyclin D1 in den Zelllinien mit mittlerer bis hoher Infektionsrate wurde untersucht, inwieweit diese Hemmung eine Auswirkung auf die durch Cyclin D1 beeinflussten Prozesse in der Zelle hatte. Dabei wurde zuerst die Wachstumsrate der mit dem Cyclin D1-shRNA-Virus infizierten Zelllinien untersucht.

Die Bestimmung des relativen Zellwachstums bis sechs Tage nach der Infektion zeigte, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle das Wachstum in den mit Cyclin D1-shRNA infizierten Zellen bei Granta 519 zu 32%, bei Jeko-1 zu 38% und bei Z-138 zu 52% retardiert war (Abbildung 27).

Somit zeigten die mit dem Cyclin D1-shRNA-Virus infizierten Zelllinien unter Berücksichtigung der Untersuchungsdauer eine geringe, aber im Vergleich zu den drei Kontrollen doch deutliche Verminderung des Zellwachstums.

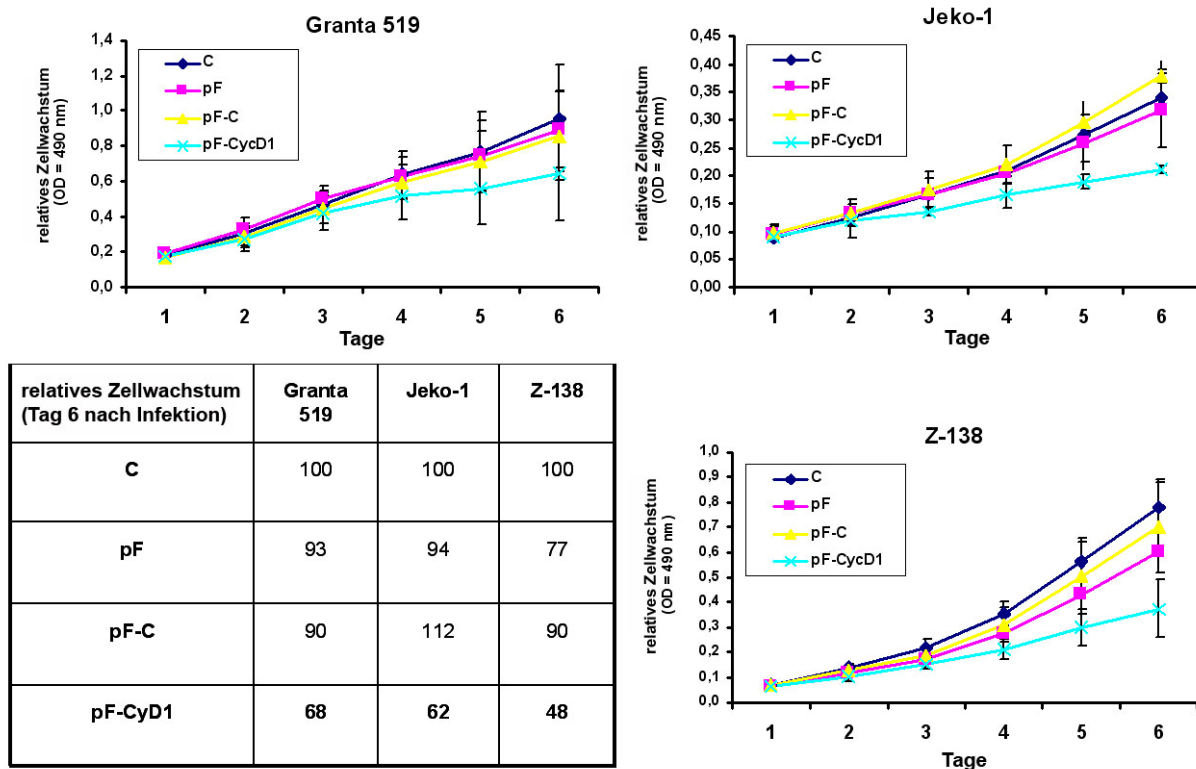


Abbildung 27: Einfluss der verminderten Cyclin D1-Expression auf die Wachstumsrate der Zellen. Gezeigt sind die Wachstumskurven der drei Kontrollen sowie der mit Cyclin D1-shRNA infizierten Zellen bei Granta 519, Jeko-1 und Z-138. Das relative Zellwachstum wurde mit dem MTS-Assay (Abschnitt 3.10) bis sechs Tage nach der Infektion bestimmt. Die Ergebnisse der drei unabhängigen Experimente am Tag sechs nach Infektion sind auch als Tabelle dargestellt (relatives Zellwachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle = 100%). C = unbehandelte Zellen; pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-C = mit Kontroll-shRNA-Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).

4.5 Einfluss der verminderten Expression von Cyclin D1 auf den Zellzyklus der Zellen

Cyclin D1 spielt beim Übergang von der G₁- zur S-Phase im Zellzyklus eine Schlüsselrolle. Daher wurde als nächstes untersucht, welche Konsequenzen die Verminderung der Cyclin D1-Expression auf den Zellzyklus hat.

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte sieben Tage nach der Cyclin D1-shRNA-Infektion in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 unter Mitführung der entsprechenden Kontrollen. Dabei ergab sich im Durchschnitt bei Granta 519 eine Zunahme der G₁-Phase um 14,6% bei gleichzeitiger Abnahme der S-Phase um 15,9% (Abbildung 28A oben), bei Jeko-1 eine Zunahme der G₁-Phase um 12,7% bei gleichzeitiger Abnahme der S- und G₂-Phase um 9,3% und 3,4% (Abbildung 28A Mitte) und bei Z-138 eine Zunahme der G₁-Phase um 17,6% bei gleichzeitiger Abnahme der S-Phase um

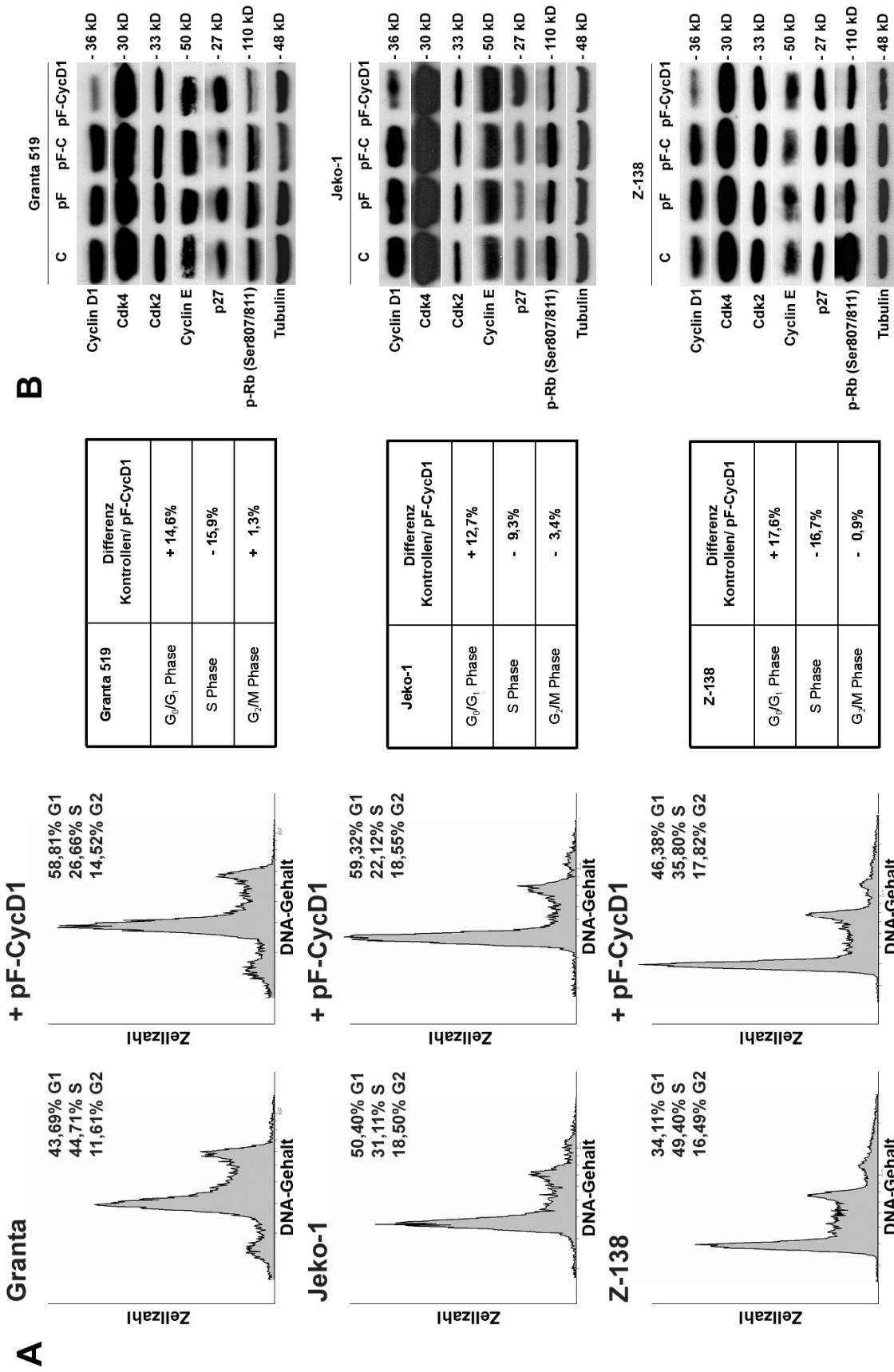


Abbildung 28: Einfluss der verminderten Cyclin D1-Expression auf den Zellzyklus der Zellen. (A) Verteilung der Zellzyklusphasen in der unbehandelten Kontrolle und den Cyclin D1-shRNA infizierten Zellen von Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach der Infektion (repräsentatives Experiment). Die Differenz zwischen den drei Kontrollen (Durchschnitt) und den Cyclin D1-shRNA-infizierten Zellen bezüglich der G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase ist in den jeweiligen Diagrammen daneben aufgelistet (Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten). (B) Analyse der Protein-Mengen von Cdk4, Cdk2, Cyclin E, p27Kip1 und phospho-Rb (Ser807/811) in den mit Cyclin D1-shRNA infizierten Zelllinien sieben Tage nach Infektion durch Western Blot unter Mitführung der entsprechenden Kontrollen. Tubulin dient als interne Kontrolle der Proben. C = unbehandelte Zellen; pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-C = mit Kontroll-shRNA-Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).

16,7% (Abbildung 28A unten). Alle drei Zelllinien zeigten also eine Verschiebung von durchschnittlich 15% von der S- und G₂- hin zur G₁-Phase.

Zusätzlich wurde der Effekt der verminderten Expression von Cyclin D1 auf die Expression wichtiger Zellzyklus-Proteine, die mit Cyclin D1 in Zusammenhang stehen, untersucht (siehe Abbildung 6 zum Zellzyklus in der Einleitung und Abschnitt 4.1.2).

Sieben Tage nach der Cyclin D1-shRNA-Infektion zeigte sich in der Protein-Expression von CDK4 und CDK2 keine Veränderung, während die Expression von Cyclin E bei der Zelllinie Jeko-1 induziert war (Abbildung 28B). Ebenfalls leicht induziert war die Expression von p27^{Kip1} in den Zelllinien Granta 519 und Jeko-1 (Abbildung 28B). Die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) am Serin-Rest 807/811, die direkt von der Aktivität des Cyclin D1-CDK4-Komplexes abhängig ist, war in allen drei Zelllinien deutlich reduziert (Abbildung 28B). Dies ist insofern erstaunlich, da durch das hypophosphorylierte Rb, das eine wachstumshemmende Wirkung hat, eine viel stärkere Reduktion im Wachstum der Zellen als die beobachtete (Abbildung 27) zu sehen sein müsste.

4.6 Einfluss der verminderten Expression von Cyclin D1 auf die Apoptose-Rate der Zellen

Bei den Untersuchungen zum Einfluss der Cyclin D1-Inhibierung auf die Wachstums-Rate und den Zellzyklus wurde in den mit der Cyclin D1-shRNA infizierten Zellen durchgehend eine Wachstumsretardierung sowie eine Verschiebung in den Zellzyklusphasen von der S- und G₂- hin zur G₁-Phase gefunden. Daraus stellte sich die Frage, ob die Veränderung dieser beiden Prozesse möglicherweise zu einer Erhöhung der Apoptose-Rate in den mit Cyclin D1-shRNA-infizierten Zellen führen würde.

Eine Bestimmung der Apoptose-Rate über die Quantifizierung sub-diploider Zellen in der Zellzyklus-Analyse sowie über die Annexin-V-Färbung (siehe Abschnitt 3.11) ergab aber keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und den mit der Cyclin D1-shRNA infizierten Zellen bei Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion (Abbildung 29). Demzufolge konnte keine Apoptose-Induktion nach Verminderung der Cyclin D1-Expression festgestellt werden.

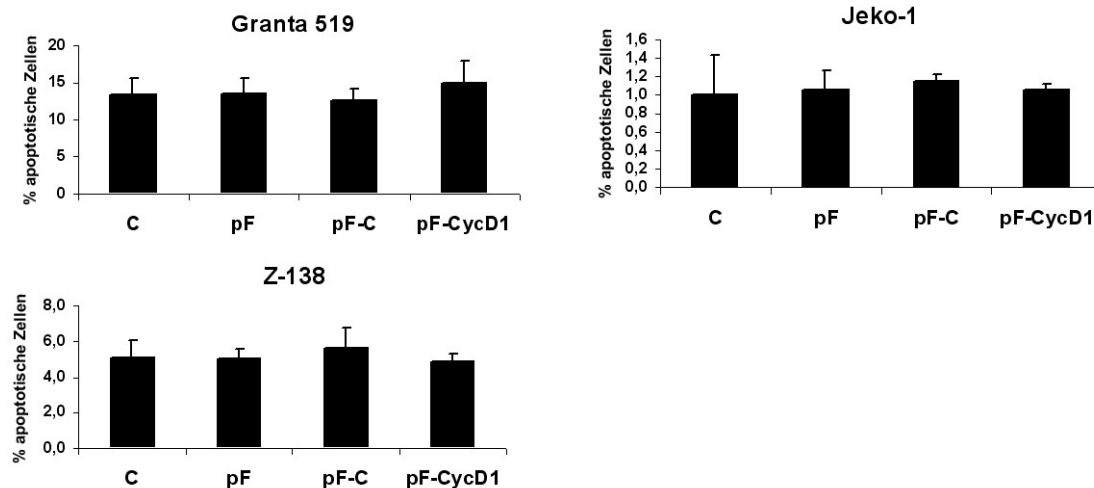


Abbildung 29: Einfluss der verminderten Cyclin D1-Expression auf die Apoptose-Rate der Zellen. Anteil apoptotischer Zellen in den Kontrollen und mit Cyclin D1-shRNA-infizierten Zellen von Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. C = unbehandelte Zellen; pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-C = mit Kontroll-shRNA-Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).

4.7 Untersuchung der Expression von Cyclin D2 und D3 nach Cyclin D1-Hinunterregulation

Bei der Charakterisierung der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien bezüglich der Expression der D-Typ-Cycline (Abschnitt 4.1.1) wurde festgestellt, dass die Zelllinien neben der starken Überexpression von Cyclin D1 meist nur eine sehr schwache Expression von Cyclin D2 aufweisen. Dies steht im starken Kontrast zur Situation in den B-Lymphozyten als Ursprungszellen des Lymphoms, die kein Cyclin D1, sondern nur Cyclin D2 exprimieren (siehe Einleitung, Abschnitt 2.1.2.3). Daher wurde als nächstes untersucht, inwieweit sich die Hinunterregulation von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien auf die Expression der anderen beiden D-Typ-Cycline auswirkt.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression von Cyclin D3 sieben Tage nach der Infektion mit dem Cyclin D1-shRNA-Virus auf RNA-Ebene (Abbildung 30A und C, helle Balken) und auch auf Proteinebene (Abbildung 30B mit Granta 519 als repräsentativem Beispiel) in allen Zelllinien keine wirkliche Veränderung aufwies.

Dagegen wurde die Expression von Cyclin D2 in der Zelllinie Granta 519 deutlich induziert. Dies konnte sowohl auf RNA-Ebene (Abbildung 30A, schwarze Balken) als auch auf Proteinebene (Abbildung 30B) gezeigt werden. Im Verhältnis zu den Kontrollen wurde die mRNA-Transkription etwa 3,7-fach induziert. Diese Induktion

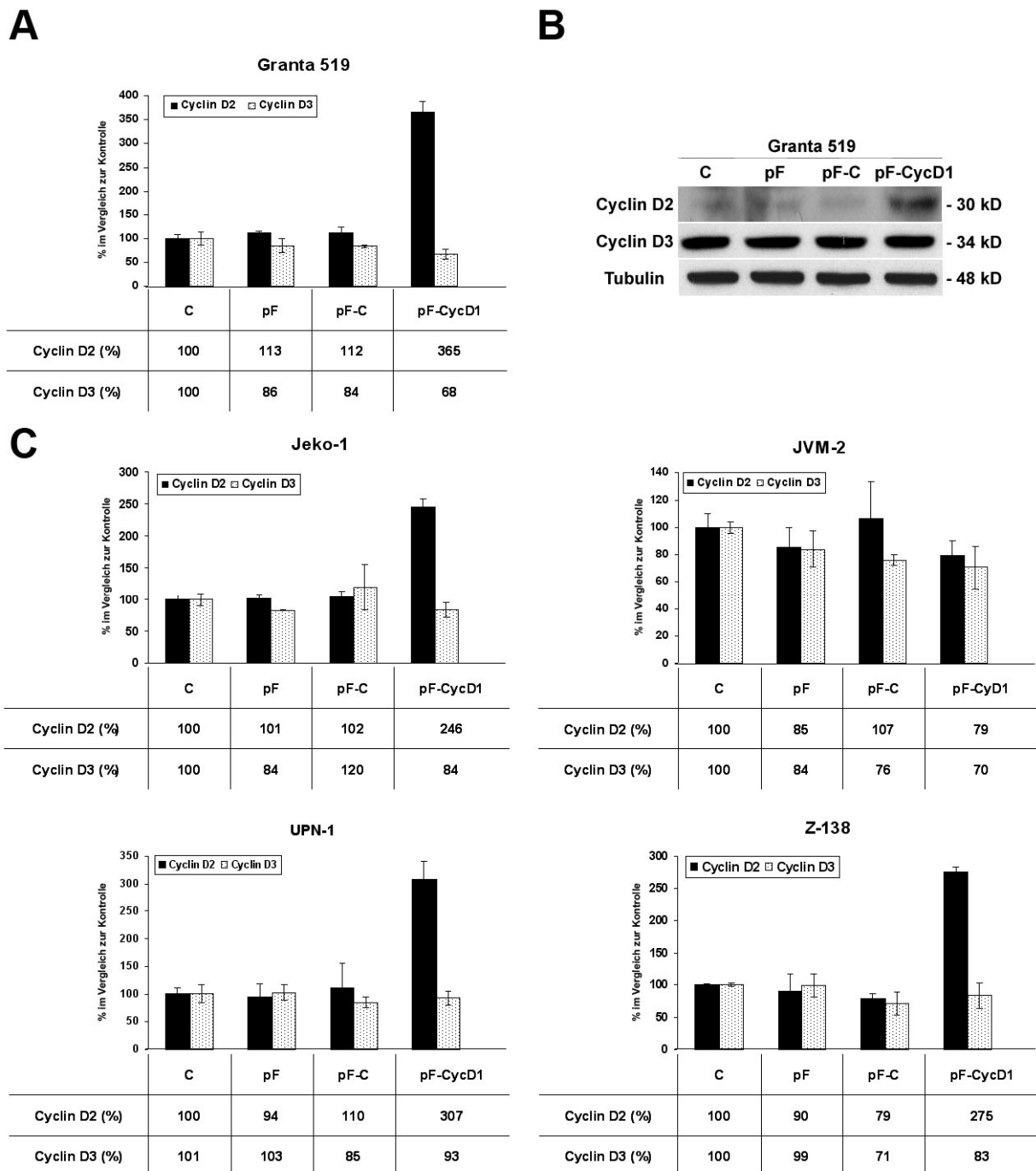


Abbildung 30: Untersuchung der Expression von Cyclin D2 und D3 nach Cyclin D1-Hinunterregulation. (A) Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Cyclin D2 (schwarze Balken) und Cyclin D3 (helle Balken) in den infizierten Granta 519-Zellen sieben Tage nach Infektion durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die unbehandelte Kontrolle und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). (B) Bestimmung der Proteinexpression von Cyclin D2 und D3 in den infizierten Granta 519-Zellen sieben Tage nach Infektion durch Western Blot. Tubulin dient als interne Kontrolle der Proben. (C) Bestimmung der mRNA-Konzentration von Cyclin D2 (schwarze Balken) und Cyclin D3 (helle Balken) in den infizierten Zelllinien Jeko-1, JVM-2, UPN-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die unbehandelte Kontrolle und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). C = unbehandelte Zellen; pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-C = mit Kontroll-shRNA-Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).

zeigten auch die Zelllinien Jeko-1 (2,5 fach), UPN-1 (3,1 fach) und Z-138 (2,8 fach) (Abbildung 30C, schwarze Balken). Einzig die Zelllinie JVM-2, deren Cyclin D1-Expression für eine Mantelzell-Lymphom-Zelllinie ungewöhnlich niedrig liegt, während ihre Cyclin D2-Expression gleichzeitig ungewöhnlich hoch liegt (Abschnitt 4.1.1) zeigte bezüglich ihrer Cyclin D2- und D3-Expression keine Reaktion auf die Cyclin D1-Hinunterregulation.

4.8 Gleichzeitige Hinunterregulation von Cyclin D1 und Cyclin D2 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Um aufzuklären, ob die parallele Verminderung der Expression von Cyclin D1 und Cyclin D2 die Effekte auf Zellwachstum und Zellzyklus intensivieren würde, wurden Granta 519-Zellen mit einer Kombination aus einem Cyclin D1-shRNA- und einem Cyclin D2-shRNA-Virus infiziert (Abbildung 31A-C). Die Zugabe beider shRNA-Viren verhinderte zwar die Induktion von Cyclin D2-mRNA und -Protein nach Hinunterregulation von Cyclin D1 (Abbildung 30A-B), konnte aber die Menge an Cyclin D2-mRNA nicht weiter als bis zu den Ausgangskonzentrationen vermindern (Cyclin D1-shRNA: Induktion von Cyclin D2 auf 365%; Cyclin D1- und D2-shRNA: leichte Erhöhung von Cyclin D2 auf 129%).

Nichtsdestotrotz sind die Ausgangskonzentrationen für die Cyclin D2-mRNA wie schon erwähnt aufgrund der Überexpression von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien sehr gering (Abbildung 20B: Cyclin D2/TBP-mRNA bei Granta 519 = 0,6). Weiterhin konnte nach Blockierung von Cyclin D1 und D2 keine Induktion des dritten D-Typ-Cyclins, Cyclin D3, auf RNA- und Proteinebene beobachtet werden (Abbildung 30A-B). Die Effekte auf das Wachstum, den Zellzyklus und die Apoptose waren vergleichbar mit den Effekten, die mit der alleinigen Verminderung der Cyclin D1-Expression festgestellt worden waren (in Abbildung 31C sind die Effekte auf den Zellzyklus als repräsentatives Beispiel dargestellt).

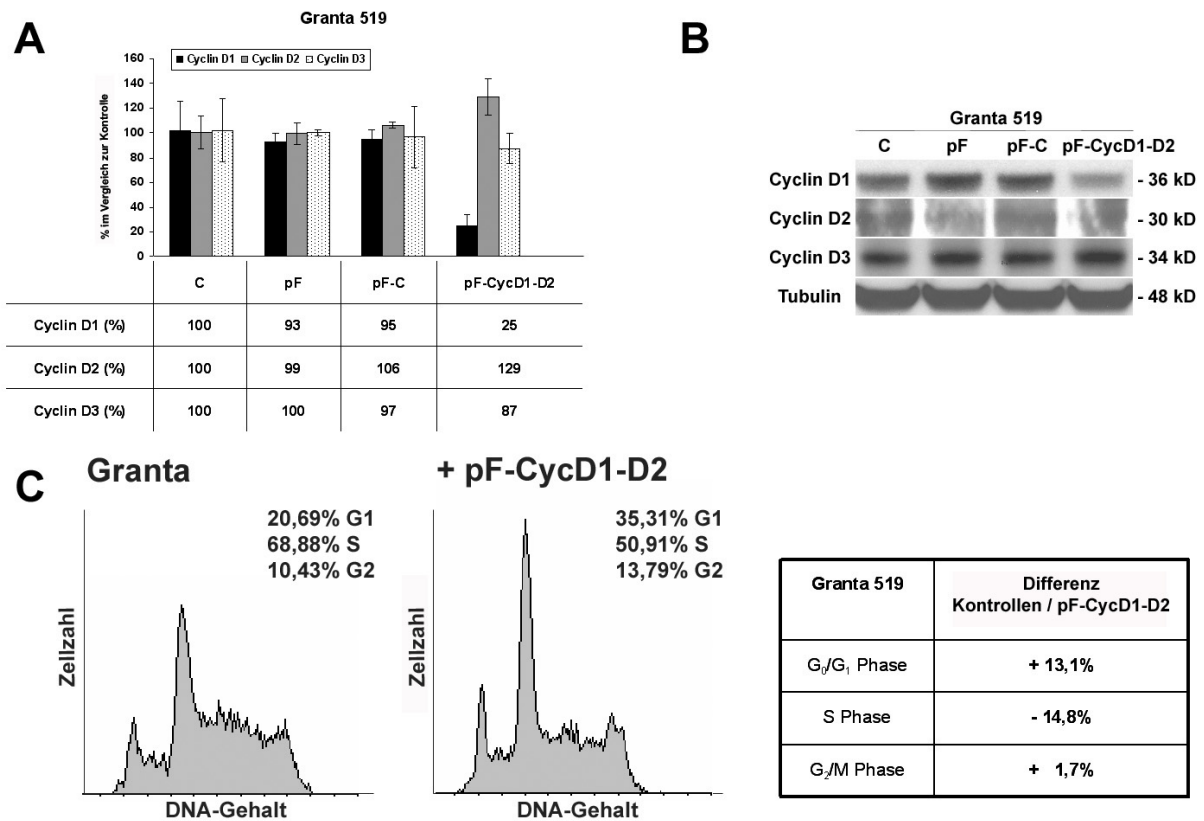


Abbildung 31: Parallele Hinunterregulation von Cyclin D1 und D2 in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Granta 519. **(A)** Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Cyclin D1 (schwarze Balken), Cyclin D2 (graue Balken) und Cyclin D3 (helle Balken) in den infizierten Granta 519-Zellen sieben Tage nach Infektion durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die unbehandelte Kontrolle und Auswertung nach der ΔC_t -Methode (Abschnitt 3.8.2). **(B)** Bestimmung der Proteinexpression von Cyclin D1, D2 und D3 in den infizierten Granta 519-Zellen sieben Tage nach Infektion durch Western Blot. Tubulin dient als interne Kontrolle der Proben. **(C)** Verteilung der Zellzyklusphasen in der unbehandelten Kontrolle und den mit der Cyclin D1-/ Cyclin D2-shRNA infizierten Granta 519-Zellen sieben Tage nach der Infektion (repräsentatives Experiment). Die Differenz zwischen den drei Kontrollen (Durchschnitt) und den mit der Cyclin D1-/ Cyclin D2-shRNA infizierten Zellen bezüglich der G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase ist in den jeweiligen Diagrammen daneben aufgelistet (Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten). C = unbehandelte Zellen; pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-C = mit Kontroll-shRNA-Virus infizierte Zellen; pF-CycD1-D2 = mit der Kombination aus einem Cyclin D1-shRNA- und einem Cyclin D2-shRNA-Virus infizierte Zellen.

4.9 Vergleichendes Genexpressionsprofil vor und nach Hinunterregulation von Cyclin D1

Im vorherigen Abschnitt wurde die Expressionsveränderung zweier einzelner Gene (Cyclin D2/ Cyclin D3) nach Cyclin D1-Hinunterregulation untersucht. Gerade im Hinblick auf den Einfluss von Cyclin D1 auf andere Transkriptionsfaktoren (siehe Einleitung/ Abschnitt 2.1.3) war es aber wichtig, ein umfassenderes Bild von den durch die Cyclin D1-Blockierung bewirkten Expressionsunterschieden bei anderen Genen zu bekommen. Zu diesem Zweck wurde ein vergleichendes Genexpressionsprofil (GEP) vor und nach der Expressionsverminderung von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Granta 519 (drei und sieben Tage nach Infektion) und Z-138 (sieben Tage nach Infektion) mittels Genechip-Analyse erstellt.

4.9.1 RNA-Analyse

Zunächst wurde die Integrität der RNA-Proben, die für die Genechip-Analyse verwendet werden sollten, mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) überprüft. Dabei erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben im Mikromaßstab bei gleichzeitiger Quantifizierung der aufgetrennten Banden (28S- und 18S-RNA), deren Verhältnis zueinander ein Maß für die Qualität der RNA war. Die RNA sollte bei guter Qualität fast doppelt soviel 28S-RNA wie 18S-RNA enthalten (Ratio $\{28S/18S\} \leq 2,0$).

Abbildung 32 zeigt diese Überprüfung am Beispiel der Granta 519-Proben (drei Tage nach Infektion). Die ausreichende Qualität der RNA zeigte sich schon bei direkter Betrachtung der aufgetrennten Banden (Gelbild oben links), da die 28S-Bande in allen Proben deutlich stärker war als die 18S-Bande. Dies wurde durch die Quantifizierung der Banden (Beispiel-Diagramm einer Cyclin D1-shRNA-Probe oben rechts) bestätigt. Mit Hilfe dieser Technik konnte auch die korrekte Vorbereitung der RNA-Proben für die Genechip-Analyse (Abschnitt 3.8.4) verfolgt werden. Bei ordnungsgemäßer Durchführung der cDNA-Erst- und Zweitstrangsynthese sowie der *in vitro* Transkription für die Biotin-markierte, komplementäre RNA (cRNA) ergab sich aufgrund der unterschiedlichen Längen der cRNA ein charakteristisches Profil im Bioanalyzer (Abbildung 32, unten links). Gleiches galt für die Fragmentierung der markierten cRNA (Abbildung 32, unten rechts) kurz vor der Hybridisierung mit dem Mikroarray.

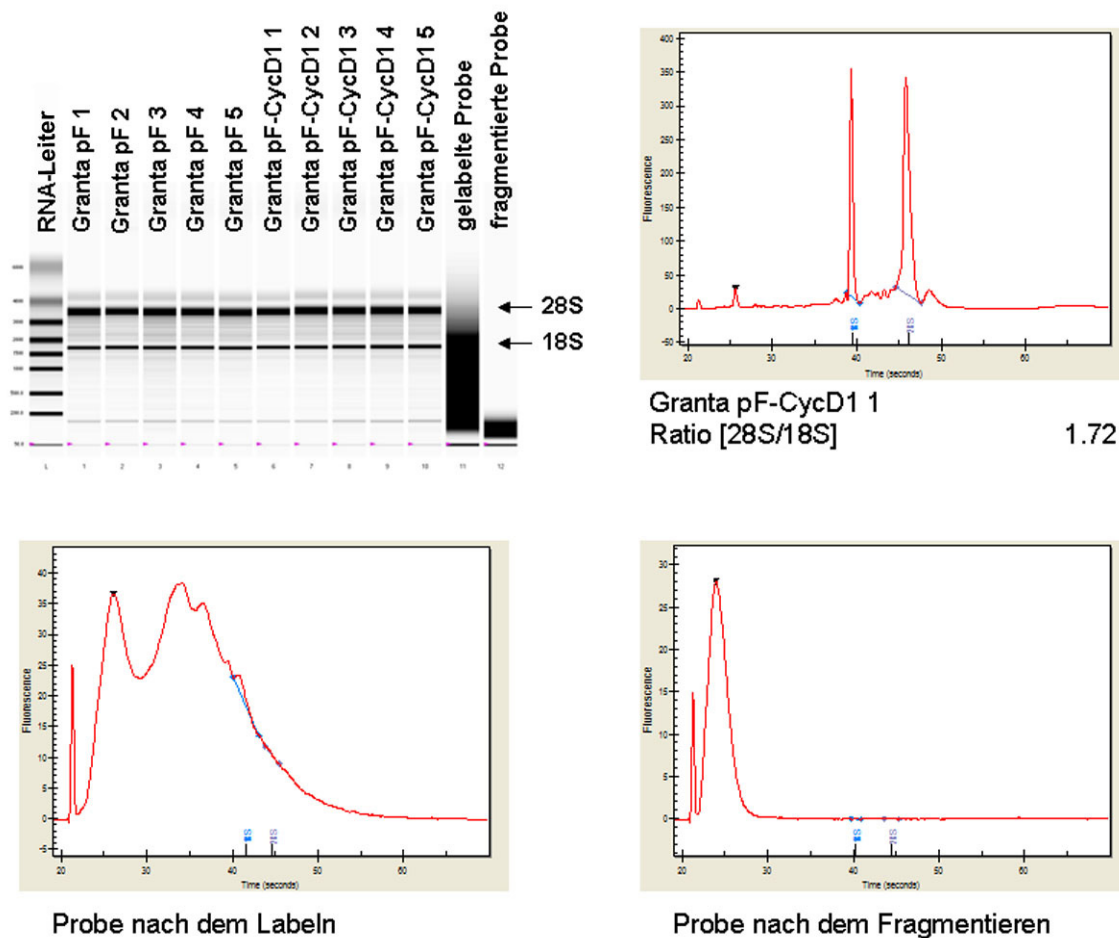


Abbildung 32: RNA-Analyse am Beispiel der Granta 519-Proben (drei Tage nach Infektion). Links oben: Bild von im Gel aufgetrennten Granta 519-RNA-Proben, die 28S- und 18S-Banden sind gekennzeichnet. Rechts oben: beispielhafte Quantifizierung der 28S- und 18S-Banden bei einer Cyclin D1-shRNA-Probe, die einen Ratio von 1,72 ergibt. Links unten: bei korrekter Durchführung der Vorbereitung der RNA-Proben für den Genechip (Abschnitt 3.8.4) ergibt die nach der Biotinylierung der Proben durch die *in vitro* Transkription entstandene cRNA ein charakteristisches Profil im Bioanalyzer (siehe auch gelabelte Probe im Gelbild). Links unten: charakteristisches Profil der fragmentierten cRNA im Bioanalyzer (siehe auch fragmentierte Probe im Gelbild). pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).

4.9.2 Cluster-Analyse

Die Verarbeitung der analysierten RNA-Proben bis zum Erhalt der endgültigen Daten nach der Genechip-Analyse mit Hilfe zwei verschiedener Typen von Software (CARMAweb /ChipInspector) ist in Abschnitt 3.8.4 ausführlich beschrieben.

Die erhaltenen Daten wurden zunächst einer Cluster-Analyse unterzogen, mit Hilfe derer man ermitteln konnte, wie ähnlich oder unähnlich sich die einzelnen, untersuchten Proben sind, d.h. inwieweit sie sich zu Clustern (= Gruppen) zusammenfassen lassen. Da bei der Genechip-Analyse von allen untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien jeweils drei experimentelle Replikate von Zellen verwendet worden waren, die einmal mit leerem Virus und einmal mit dem Cyclin D1-

shRNA-Virus infiziert wurden, wurde erwartet, diese experimentellen Replikate jeweils als Gruppe wiederzufinden.

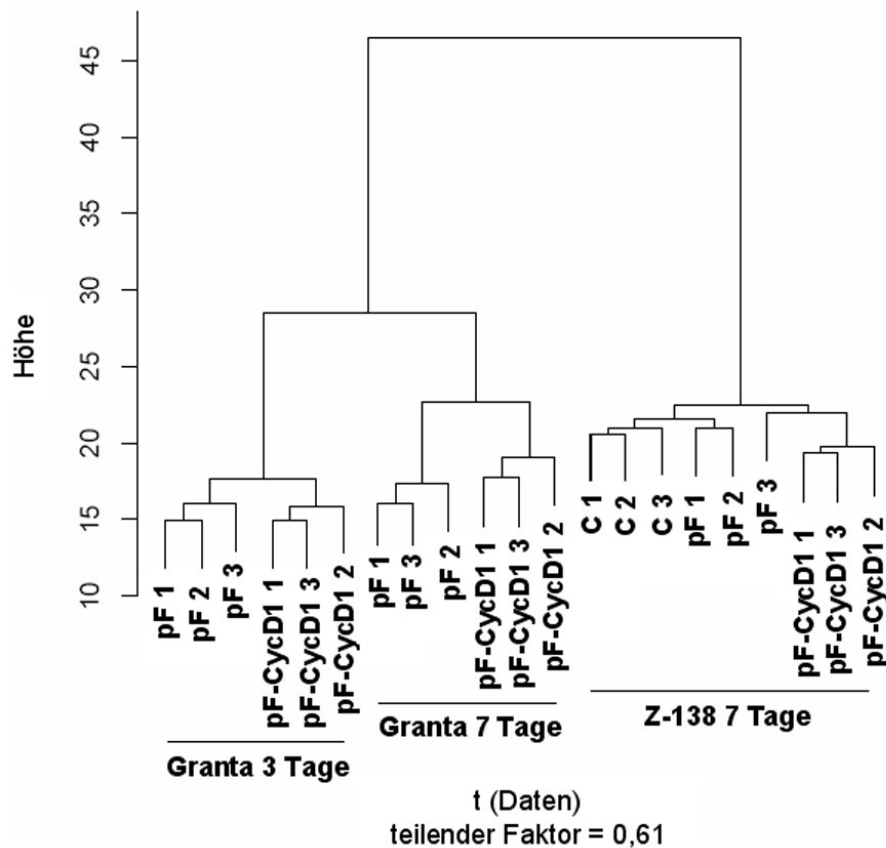


Abbildung 33: Hierarchische Cluster-Analyse im teilenden Verfahren für die normalisierten Daten aller drei Mikroarray-Experimente. Granta 3 Tage / Granta 7 Tage = Mikroarray-Experimente mit RNA-Proben vom dritten / siebten Tag nach Infektion der Zelllinie Granta 519. Z-138 7 Tage = Mikroarray-Experiment mit RNA-Proben vom siebten Tag nach Infektion der Zelllinie Z-138. C = unbehandelte Zellen; pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C). Von jeder verwendeten Probenart wurden jeweils drei experimentelle Replikate produziert (Bezifferung mit 1, 2 und 3). Je näher sich zwei Proben im Baumdiagramm sind, desto ähnlicher sind sie sich.

Es wurde für alle drei Mikroarray-Experimente eine hierarchische Cluster-Analyse im anhäufenden und teilenden Verfahren durchgeführt. Beim anhäufenden Verfahren wurden schrittweise einzelne Proben zu immer größeren Gruppen zusammengefasst, während beim teilenden Verfahren größere Gruppen immer feiner unterteilt wurden. Das Ergebnis, das in Abbildung 33 für das teilende Verfahren in Form einer Baumstruktur (Dendrogramm) dargestellt ist, war bei beiden Verfahren dasselbe. Bei der Zelllinie Granta 519 bildeten sowohl bei den drei Tage infizierten Zellen als auch bei den sieben Tage infizierten Zellen die drei experimentellen Replikate der mit leerem Virus (pF-C) oder mit Cyclin D1-shRNA-Virus (pF-CycD1) infizierten Zellen eine Gruppe. Weiterhin waren die drei und sieben Tage infizierten Granta 519-Proben wie erwartet untereinander ähnlicher als zu den Proben der

Zelllinie Z-138. Dagegen fiel bei der Zelllinie Z-138 ein experimentelles Replikat der mit leerem Virus infizierten Zellen (pF-C) insofern aus dem Rahmen, dass es den experimentellen Replikaten der mit Cyclin D1-shRNA- infizierten Zellen (pF-CycD1) ähnlicher war als seinen anderen beiden experimentellen Replikaten. Die beim Z-138-Experiment mitgeführten experimentellen Replikate von unbehandelten Zellen (C) clusterten dagegen erwartungsgemäß.

4.9.3 Genexpressionsprofil der drei Tage infizierten Granta 519-Zellen

Das erste Mikroarray-Experiment erfolgte mit der Zelllinie Granta 519 drei Tage nach Infektion. Dabei wurden, wie bereits bei der Cluster-Analyse beschrieben, jeweils drei experimentelle Replikate von mit leerem Virus infizierten Zellen (pF) und von mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierten Zellen (pF-CycD1) verwendet, um so die durch die Cyclin D1-Hinunterregulation veränderten Gene zu identifizieren. Alle Mikroarray-Experimente wurden mit zwei verschiedenen Methoden (CarmaWeb / ChipInspector) ausgewertet. Im Gegensatz zu den „klassischen“ Auswertemethoden werden bei der ChipInspector-Software nicht nur die Kontrollen mit den veränderten Proben verglichen (im vorliegenden Fall drei gegen drei), sondern jede Probe mit jeder anderen verglichen (im vorliegenden Fall neun Vergleiche). Außerdem werden Probesets von Genen ganz oder teilweise weggelassen, die nach den neuesten Gen-Annotationen nicht mehr aktuell sind. Bildlich dargestellt sind im Folgenden für alle Mikroarray-Experimente nur die Ergebnisse der CarmaWeb-Software. Es werden aber die Ergebnisse beider Methoden beschrieben und miteinander verglichen.

Die Auswertung nach CarmaWeb ergab bei den drei Tage infizierten Zellen insgesamt 139 veränderte Gene (Abbildung 34), davon war die Expressionsrate von 89 Genen erhöht und von 50 Genen verringert. Unter den induzierten Genen befand sich Cyclin D2 (CCND2; siehe Abschnitt 4.7) und das in seiner Expression am meisten verminderte Gen war Cyclin D1 (CCND1; beide Gene sind rot hinterlegt), was eine Kontrolle für das Gelingen des Experiments war.

Die Auswertung nach ChipInspector ergab insgesamt 219 veränderte Gene, davon war die Expression von 81 Genen erhöht und die von 138 Genen erniedrigt.

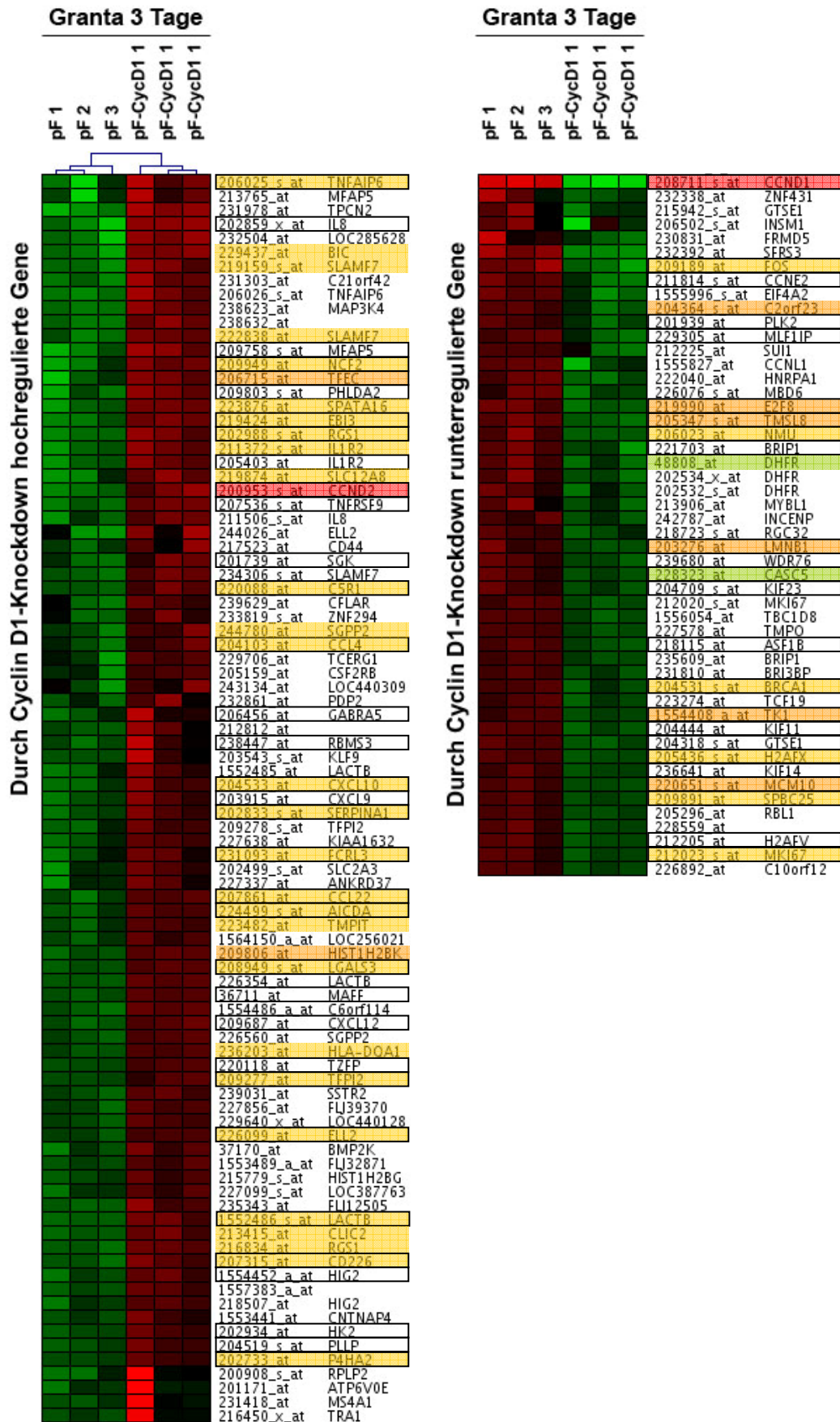


Abbildung 34: Genexpressionprofil der drei Tage infizierten Granta 519-Zellen. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C). Von jeder Probenart wurden jeweils drei experimentelle Replikate verwendet (Bezifferung mit 1, 2 und 3). Links sind die hochregulierten Gene aufgelistet (grün zu rot im Vergleich pF / pF-CycD1), rechts die hinunterregulierten Gene (rot zu grün im Vergleich pF / pF-CycD1).

Unter den 139 veränderten Genen, die von CarmaWeb detektiert wurden, befanden sich 57 Gene (41%), die auch durch ChipInspector gefunden wurden (schwarz umrahmt in Abbildung 34). Diese Überschneidung schloss auch induziertes Cyclin D2 und in der Expressionsrate vermindertes Cyclin D1 ein und Cyclin D1 war auch bei der ChipInspector-Software das am stärksten veränderte Gen.

Dagegen fallen bei der Auswertung mit ChipInspector wie bereits beschrieben viele Probesets heraus, die nicht näher bestimmt sind (z.B. LOC285628, C21orf42; Abbildung 34) oder die nach neueren Erkenntnissen nicht eindeutig einem Gen zugeordnet werden (z.B. BIC, DHFR; Abbildung 34).

Unter den 139 Genen, die mit der CarmaWeb-Software identifiziert wurden, befanden sich 44 Gene (gelb/orange hinterlegt in Abbildung 34), die beim GEP von sieben Tagen infizierten Granta 519-Zellen wiedergefunden wurden (siehe auch Abschnitt 4.9.4). Dabei ist zu erwähnen, dass die Überschneidung noch größer wäre, wenn man mit einbeziehen würde, dass zwar im GEP der drei und sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen häufig das gleiche Gen differentiell exprimiert wird, aber die zugehörigen Probesets (Genabschnitte) verschieden sind (Abbildung 34: ATP6VOE; CASC5; CD44; GTSE1; IL1R2; KIF14; KIF23; **MKI67**; **MLF1IP**; SLAMF7; **TFPI2**; TNFAIP6; die rot markierten Gene wurden validiert – Abschnitt 4.9.7). Gleichzeitig fiel auf, dass das Gen FOS im GEP der drei Tage infizierten Granta 519-Zellen in der Gruppe der Gene auftauchte, deren Expression vermindert war. Im GEP der sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen dagegen war es in der Gruppe der Gene, deren Expression erhöht war. Dies blieb aber der einzige solche Fall. In Abbildung 34 ist auch deutlich zu erkennen, dass viele der Gene, die bei drei und sieben Tagen Infektion auftauchen, auch gleichzeitig solche Gene sind, die von beiden Auswertemethoden detektiert wurden (31 Gene von insgesamt 44 Genen = 70%). Die Verwendung von zwei Auswertemethoden sollte die Auswahl relevanter Gene für die Validierung in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien und im Patientenmaterial erleichtern.

Eine sehr geringe Überschneidung ergab sich mit dem GEP der sieben Tage infizierten Z-138-Zellen (11 Gene; in Abbildung 34 grün/orange hinterlegt). Dies ist allerdings nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass diese Ergebnisse bei der Cluster-Analyse (4.9.2) am weitesten auseinander lagen.

4.9.4 Genexpressionsprofil der sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen

Das GEP der sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen ähnelte wie erwartet insgesamt stark dem GEP nach drei Tagen Infektion. Auch hier war mit der CarmaWeb-Software bei einer etwas höheren Gesamtzahl von 217 veränderten Genen die Mehrheit von 145 Genen induziert, während nur 72 Gene durch den Cyclin D1-Knockdown reprimiert wurden (Abbildung 35).

Bei beiden Auswertemethoden befand sich unter den Genen mit erhöhter Expression als Bestätigung des Experiments wiederum Cyclin D2. Auch Cyclin D1 stand an erster Stelle bei den Genen mit verminderter Expression. Beide Gene sind in Abbildung 35 rot hinterlegt. Die Auswertung nach ChipInspector ergab insgesamt 260 veränderte Gene, davon waren 139 Gene in ihrer Expressionsrate erhöht und 121 Gene darin erniedrigt.

Die Überschneidung zwischen den beiden Auswertemethoden war nach sieben Tagen Infektion etwas höher: unter den 217 veränderten Genen, die von CarmaWeb detektiert wurden, befanden sich 109 Gene (50%), die auch durch ChipInspector gefunden wurden (schwarz umrahmt in Abbildung 35). Die 44 gelb hinterlegten Gene in Abbildung 35 sind diejenigen, die sowohl im GEP der drei Tage infizierten Granta 519-Zellen als auch im GEP der sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen gefunden wurden. Auch hier sind viele der Gene (32 von 44 = 73%) gleichzeitig von beiden Auswertemethoden detektiert worden.

Die Überschneidung mit dem Z-138-Experiment (siehe auch Abschnitt 4.9.5) wird wiederum durch die grüne Hinterlegung der Gene (Abbildung 35) dargestellt. Diese war insgesamt relativ gering mit nur 33 Genen bei der CarmaWeb-Software und 17 Genen bei der ChipInspector-Software. Die Zahl der Gene, die bei allen drei Experimenten detektiert wurde (orange hinterlegt in Abbildung 35) fiel mit insgesamt 19 Genen (9 bei der CarmaWeb-Software und 10 bei der ChipInspector-Software) noch geringer aus (**ASPM**; C2orf23; CCND1;**CDT1**; CLEC7A; E2F8; ESPL1; **FOXM1**; HIST1H2BK; KIF2C; LMNB1; MCM10; MCM4; MCM7; SMC4L1; **TFEC**; TK1; **TMSL8**; WHSC1; die rot markierten Gene wurden validiert – Abschnitt 4.9.7).

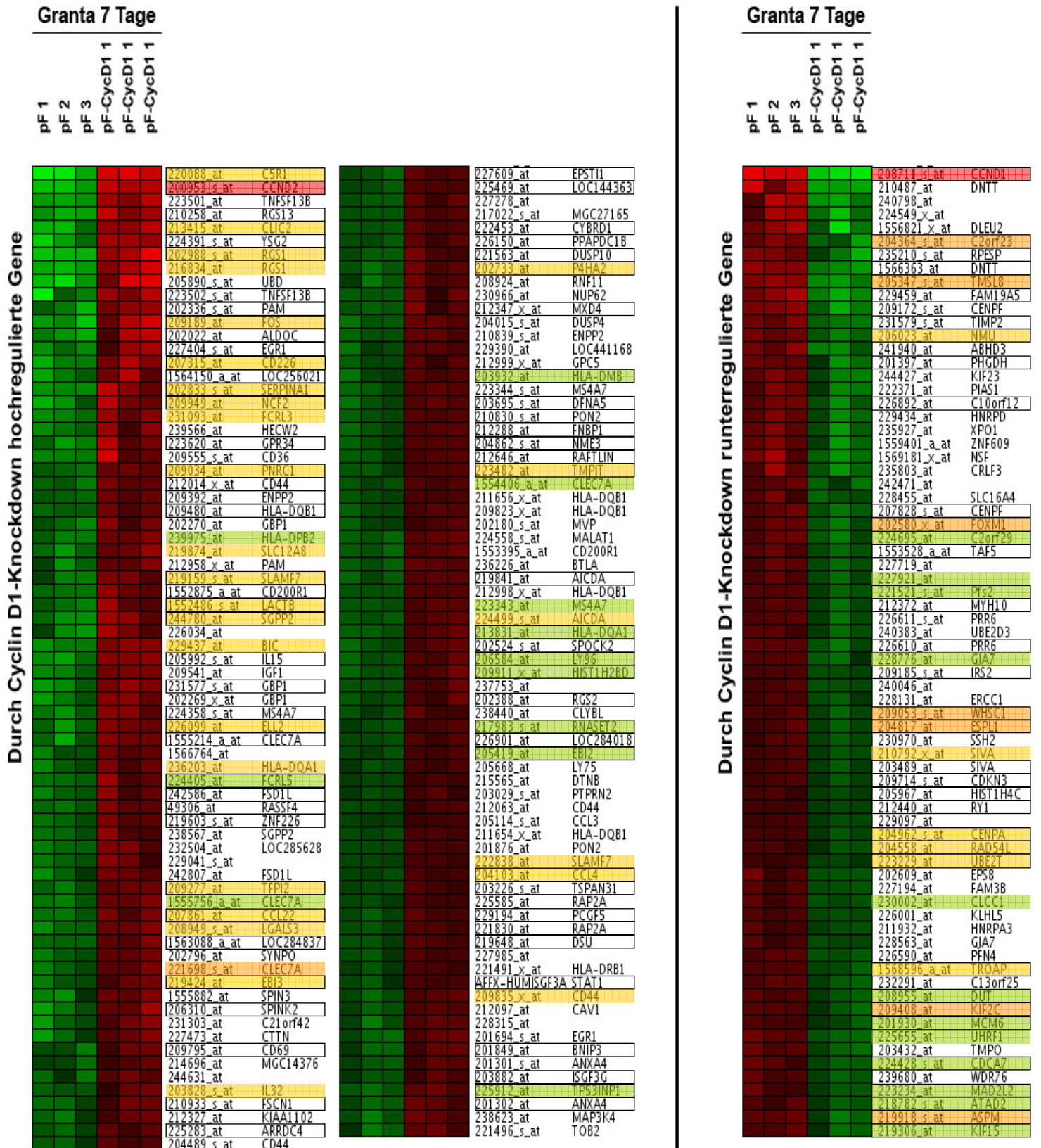


Abbildung 35: Genexpressionprofil der sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C). Von jeder Probenart wurden jeweils drei experimentelle Replikate verwendet (Bezifferung mit 1, 2 und 3). Links sind die hochregulierten Gene aufgelistet (grün zu rot im Vergleich pF / pF-CycD1), rechts die hinunterregulierten Gene (rot zu grün im Vergleich pF / pF-CycD1).

4.9.5 Genexpressionsprofil der sieben Tage infizierten Z-138-Zellen

Das GEP der sieben Tage infizierten Z-138-Zellen unterschied sich stark von dem der drei und sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen. Zum ersten lag bei den 236 veränderten Genen (CarmaWeb-Software; Abbildung 36) im Gegensatz zu den ersten beiden Experimenten mit 153 Genen die Mehrzahl in ihrer Expressionsrate erniedrigt vor, während nur 83 Gene darin erhöht waren. Auch bei der Auswertung mit der ChipInspector-Software (147 veränderte Gene) waren die Gene mehrheitlich in ihrer Expression vermindert (87 im Verhältnis zu 60). Des Weiteren waren die Ergebnisse beider Auswertemethoden nur wenig überlappend: nur 78 der 236 veränderten Gene (33%) wurden gemeinsam detektiert (schwarz umrahmt in Abbildung 36). Außerdem zeigte sich auch zwischen den drei GEP nur eine geringe Überlappung: mit drei Tage infizierten Granta 519-Zellen gab es insgesamt nur 23 übereinstimmende Gene (gelb/orange hinterlegt in Abbildung 36) und mit sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen gab es insgesamt nur 38 übereinstimmende Gene (grün/orange hinterlegt in Abbildung 36), wie bereits in den beiden vorherigen Abschnitten beschrieben. Auch hier wäre die Übereinstimmung höher, wenn man miteinbeziehen würde, dass die differentielle Expression oft von verschiedenen Probesets ausgehend das gleiche Gen betrifft (Abbildung 36: **CHAF1A**; FCRL5; FEN1; GM2A; HLA-DQA1; LIMK2; MCM5; MCM7; MCM10; **MXD4**; RNASET2; RRM1; SOX11; **TOP2A**; TXNIP; TYMS; TK1; WHSC1; die rot markierten Gene wurden validiert – Abschnitt 4.9.7).

Auffällig ist, dass viele veränderte Gene für Histone als Bausteine der Nukleosomen (z.B. HIST1H4K) kodieren, während bei den GEP der beiden anderen Zelllinien der Schwerpunkt eher auf Zellzyklus- und Signaltransduktionsgenen lag. Darauf soll aber im nächsten Abschnitt bei der Verteilung der Gene auf verschiedene biologische Prozesse noch näher eingegangen werden. Abschließend ist zu erwähnen, dass im GEP der Z-138-Zellen auch Cyclin D1 wie erwartet unter den in ihrer Expression verminderten Genen war (rot hinterlegt in Abbildung 36). Cyclin D2 konnte aber aufgrund seiner geringen Expression in Z-138-Zellen (Abschnitt 4.1.1) nicht als signifikant induziert nachgewiesen werden.

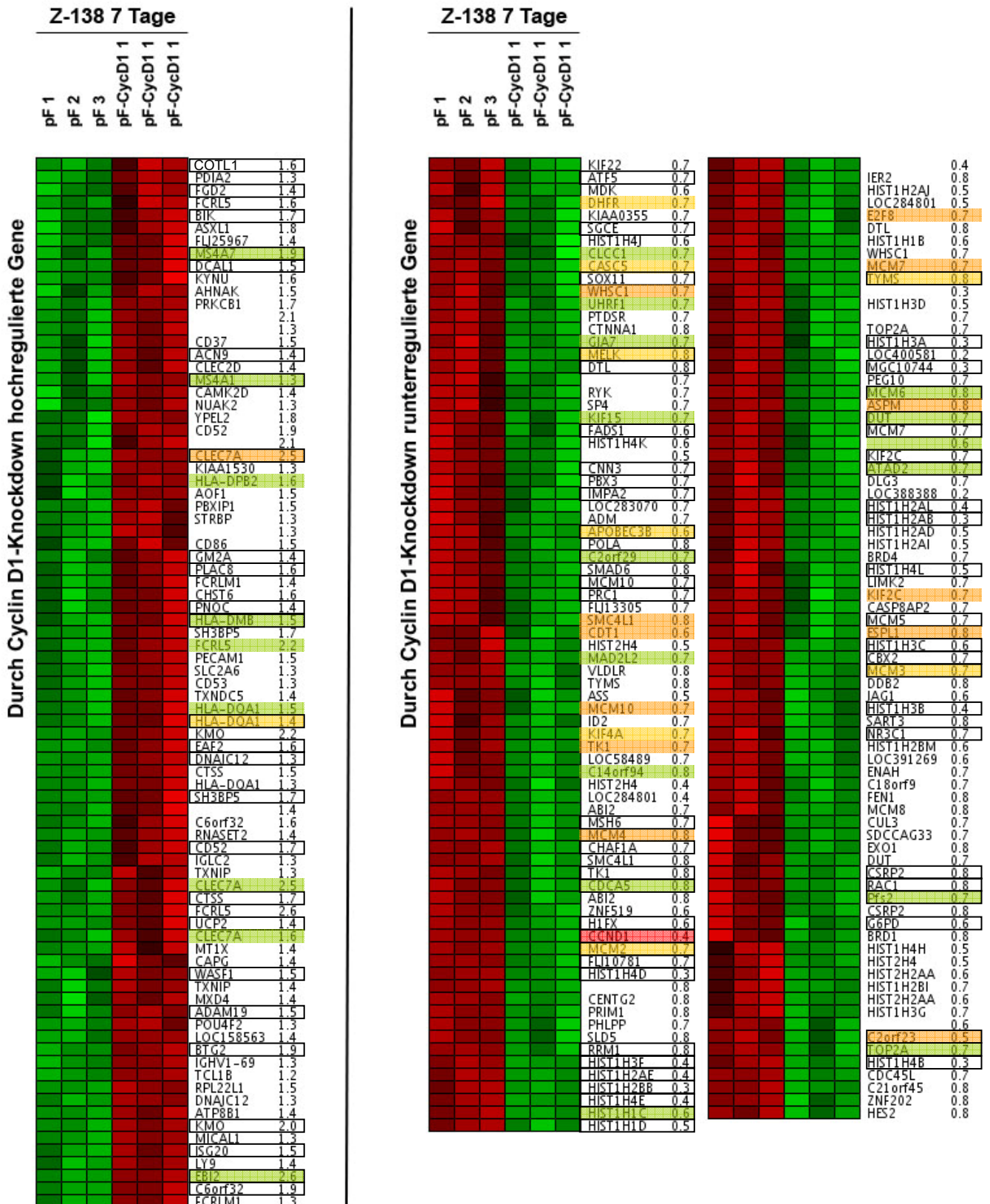


Abbildung 36: Genexpressionprofil der sieben Tage infizierten Z-138-Zellen. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C). Von jeder Probenart wurden jeweils drei experimentelle Replikate verwendet (Bezifferung mit 1, 2 und 3). Links sind die hochregulierten Gene aufgelistet (grün zu rot im Vergleich pF / pF-CycD1), rechts die hinunterregulierten Gene (rot zu grün im Vergleich pF / pF-CycD1).

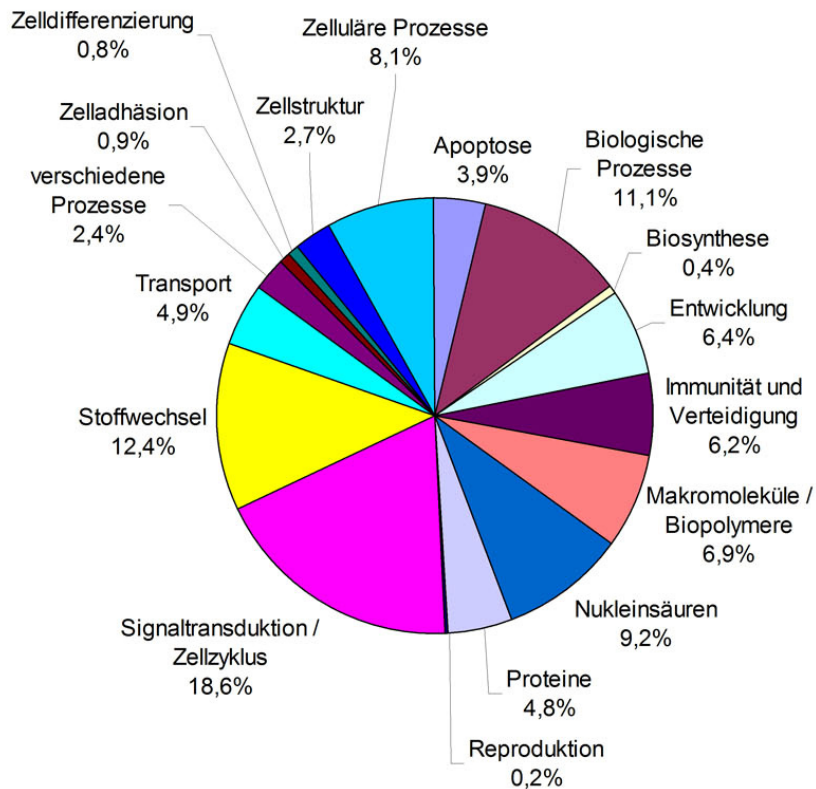
4.9.6 Verteilung der Gene auf verschiedene biologische Prozesse

Die mit der CarmaWeb- und ChipInspector-Software bei den drei Experimenten erhaltenen Gene wurden verschiedenen biologischen Prozessen im Organismus zugeordnet. Alle drei Experimente ergaben dabei bezüglich der zwei Auswertemethoden eine sehr ähnliche Verteilung. Bildlich dargestellt werden wiederum nur die CarmaWeb-Ergebnisse (Abbildung 37). Außerdem ähnelte sich die Verteilung bei den drei und sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen stark, weshalb nur das 7 Tage-Experiment gezeigt wird.

Der größte Anteil an identifizierten Genen bei der Granta 519-Analyse fiel in den Bereich Zellzyklus/ Signaltransduktion (18,6%), gefolgt von den Genen des Stoffwechsels (12,4%). Dagegen hatten die Gene, die in den Bereich Nukleinsäure-Stoffwechsel fallen (z.B. DNA-Verpackungs- oder DNA-Reparatur-Gene), nur einen Anteil von 9,2%, während dieser bei der Z-138-Analyse bei 19,2% lag. Umgekehrt stand der Anteil der Zellzyklus- bzw. Signaltransduktions-Gene bei den infizierten Z-138-Zellen mit 11,7% nur an dritter Stelle. Weitere anteilmäßige Unterschiede zwischen beiden Experimenten gab es bei den Genen der Zellstruktur (Granta 519: 2,7%; Z-138: 5,8%) und den Genen der Immunität und Verteidigung (Granta 519: 6,2%; Z-138: 1,9%). Da die Mantelzell-Lymphom-Zellen entartete B-Lymphozyten sind, ist der Anteil der Immunitäts- und Verteidigungs-Gene gerade bei der Zelllinie Granta 519 verhältnismäßig hoch, wobei unter diesen Bereich wahrscheinlich auch einige unspezifische Gene fallen (z.B. EB12/ EB13: Epstein-Barr virus induced gene 2/3). Etwas geringere Unterschiede zeigten sich im Bereich Protein-Stoffwechsel (4,8% zu 2,9%), Transport (4,9% zu 2,8%) und Stoffwechsel (12,4% zu 15,8%).

Auch durch die Verteilung der Gene der GEP auf biologische Prozesse zeigte sich also, dass die Ergebnisse bei den beiden untersuchten Zelllinien Granta 519 und Z-138 relativ stark voneinander abwichen und daher schwieriger gemeinsame Gene zu finden waren, die durch die Cyclin D1-Hinunterregulation beeinflusst wurden.

Granta 519 (7 Tage Infektion)



Z-138 (7 Tage Infektion)

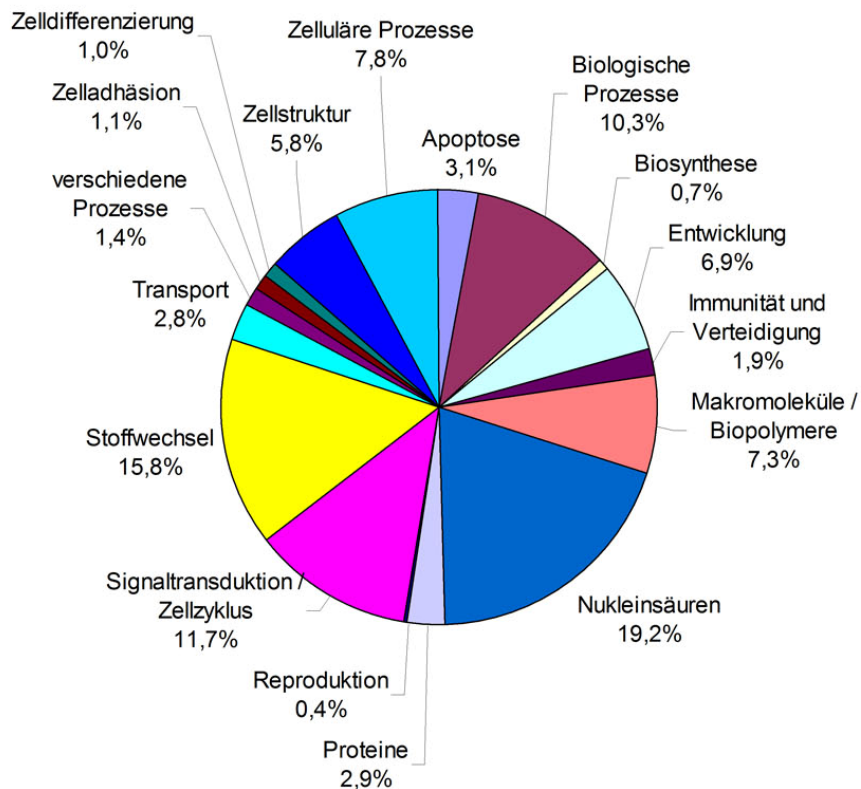


Abbildung 37: Verteilung der Gene auf verschiedene biologische Prozesse. Die detektierten Gene bei den sieben Tage mit Cyclin D1-shRNA infizierten Granta 519-Zellen (Abbildung 35) und Z-138-Zellen (Abbildung 36) wurden verschiedenen biologischen Prozessen im Organismus zugeordnet (Angaben in %).

4.9.7 Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen

Für die Validierung ausgewählter Gene aus den GEP wurden eigens gestaltete 384-well-Platten der Firma Applied Biosystems verwendet, die eine parallele Quantifizierung von 48 Genen (2 endogene Kontrollen und 46 Ziel-Gene) ermöglichte. Die Auswahl der Gene erfolgte unter verschiedenen Aspekten: zum einen sollten möglichst Gene validiert werden, die bei beiden verwendeten Zelllinien eine Veränderung in der Genexpression ergeben hatten. Des Weiteren wurden einerseits Gene ausgewählt, für die eine Verbindung zu Cyclin D1 und/oder dem Mantelzell-Lymphom gesichert war. Andererseits wurden aber auch gerade im Bereich der Transkriptionsfaktoren Gene ausgewählt, bei denen sich kein direkter Zusammenhang mit Cyclin D1 finden ließ, um so vielleicht über die transkriptionelle Aktivität von Cyclin D1 (siehe Einleitung) auf neue Targets für das Mantelzell-Lymphom zu stoßen.

Tabelle 3 enthält von allen 46 ausgewählten Genen ihre Veränderung im Genexpressionsprofil der mit dem Cyclin D1-shRNA-Virus infizierten Granta 519- bzw. Z-138-Zellen. Außerdem wird jedes Gen seinem biologischen Prozess im Organismus zugeordnet und eine genauere Beschreibung mit eventueller Literatur-Stelle angegeben. Dabei ist die Zuordnung der einzelnen Gen-Gruppen zu den biologischen Prozessen im Vergleich zum Abschnitt 4.9.6 zur besseren Darstellung etwas verändert. Da die Überschneidung zwischen den Ergebnissen der beiden Mantelzell-Lymphom-Zelllinien so gering war, und die Signale bei den Z-138-Mikroarrays insgesamt sehr schwach waren, ist von den 46 ausgewählten Genen ein Großteil (29) nur bei den Granta-Zellen signifikant verändert. Von den restlichen 17 Genen ist bei zweien nur eine Veränderung im Z-138-Genexpressionsprofil detektiert worden, während die restlichen 15 in beiden Zelllinien durch Cyclin D1 reguliert sind.

Tabelle 3: Für die Validierung mittels qRT-PCR ausgewählte Gene aus den GEP. In der Spalte Granta 519 sind die Veränderungen für die 3 und 7 Tage infizierten Zellen zusammengefasst.

Gen-Symbol	Gen-Name	Granta	Z-138	Biologischer Prozess	Genauere Beschreibung
Gruppe: Zellzyklus / Replikation					
ASPM	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>)	0,7/ 0,6/ 0,5	0,8	Cell cycle	codiert für ein Protein der mitotischen Spindel, Gen aus "Proliferation signature" [26]
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	0,6		Cell cycle	Gen aus "Proliferation signature" [26], prognostischer Marker bei MCL [187]
CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1	0,7/ 0,6	0,6	DNA replication checkpoint	MCL: unbalancierte Licensing-Signatur ⇒ höhere Cyclin D1-Konzentrationen [188]
CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A	0,8/ 0,6	0,7	DNA replication	= p150
E2F2	E2F transcription factor 2	0,7		Cell cycle	Redundanz mit E2F1 / E2F2B
MAD2L2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	0,6	0,7	Cell cycle	mitotischer Spindel-Checkpoint
MCM2	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)	0,7	0,7	DNA replication	Gen aus "Proliferation signature" [26]
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	0,7/ 0,6		Cell cycle	Proliferations-Marker (Ki-67)
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	0,6	0,7	DNA replication	Gen aus "Proliferation signature" [26]
Gruppe: DNA-Reparatur					
BRCA1	breast cancer 1, early onset	0,7/ 0,6		Cell cycle checkpoint	BRCA1-Hinunterregulation regelt gleichzeitig mitotische Gene herunter [189]
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	0,7/ 0,6	0,7	DNA damage checkpoint	DNA-Reparatur hängt von seiner Assoziation mit BRCA1 ab
BTG2	B cell translocation gene 2		1,6/ 1,9	DNA repair	Target von p53
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>)	0,8/ 0,7		DNA damage checkpoint	Aktivierung durch ATM
RAD54L	RAD54-like (<i>S. cerevisiae</i>)	0,8/ 0,6		DNA repair	
Gruppe: Transkription					
CUTL1	Cut-like 1, CCAAT displacement protein (<i>Drosophila</i>)	0,4		negative regulation of transcription	Co-Repressor/ Interaktion mit Rb [190]
EGR1	Early growth response 1	2,4/ 1,9/ 1,8		regulation of transcription	oft koreguliert mit c-fos, mögliche Rolle als Tumorsuppressor (p53-

					Signalweg)
ELL2	elongation factor, RNA polymerase II, 2	2,2/ 1,8/ 1,5/ 1,4		regulation of transcription	negative Regulation Zellwachstum/ Survival [191]
EZH2	enhancer of zeste homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	0,8/ 0,6		chromatin architecture	Polycomb-Protein, überexprimiert in Tumoren, prognostischer Marker bei MCL [192]
FOXM1	forkhead box M1	0,7/ 0,6/ 0,5	0,7	regulation of transcription	reguliert den mitotischen Ablauf (Cdc25B/ CENPA)
MLF1IP	myelodysplasia/ myeloid leukemia factor 1-interacting protein	0,7/ 0,6/ 0,5		regulation of transcription	möglicher transkriptioneller Repressor (Differenzierungs-Prozesse)
MXD4	MAX dimerization protein 4 (Mad4)	1,8/ 1,9	1,4	negative regulation of transcription	MAD-Familie, Heterodimere mit MAX, transkriptioneller Repressor (c-myc), E2F1 reguliert (MXD3)
MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	0,7		regulation of transcription	
TFEC	transcription factor EC	1,9/ 1,5/ 1,4	3,0/ 1,4	regulation of transcription	MiT-Familie, myeloische Differenzierung (Makrophagen)
Gruppe: Signalling					
AURKB	aurora kinase B	0,7/ 0,6		protein amino acid phosphorylation	wichtig für den mitotischen Ablauf (Chromosomen-Alignment und -Segregation, Histon H3-Kinase, Phosphorylierung STMN1)
ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	0,6		intracellular Signalling cascade	durch den Rb/E2F-Signalweg reguliertes Proto-Onkogen [193]
MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase	0,7	0,8/ 0,7	protein amino acid phosphorylation	erhöhte Expression in Tumoren [194]
NFKBIE	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	1,4/ 1,5		cytoplasmic sequestering transcription factor	inhibitorische Rolle in der B-Lymphozyten-Differenzierung
PBK	PDZ binding kinase	0,6		protein amino acid phosphorylation	MAPKK-like Proteinkinase, erhöhte Expression von PBK in hämatologischen Tumoren [195]
PNRC1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	1,4/ 2,0		regulation of transcription	Interaktion mit Grb2 (Suppression Ras/MAP-Kinase-Aktivierung) [196]
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1		0,8/ 0,7	cell motility	Rho-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine, anti-apoptotische Funktion in Lymphom-Zellen [197]
RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 4	1,7/ 1,8/ 2,0		signal transduction	RASSF-Familie der Ras-Effektoren übermittelt die Wachstums-inhibierenden Effekte von Ras
RGS13	regulator of G-protein signalling 13	1,8/ 2,9		negative regulation of signal transduction	mögliche Steuerung der Chemokin-Sensitivität der reifen B-Zellen, verminderte/ keine Expression in MCL [98]

Gruppe: Immun-Signalling					
CD20 (MS4A1)	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	1,5	1,3/ 1,4	immune response	
CD40 (TNFRSF5)	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	1,3/ 1,4		protein complex assembly	übermittelt Immun- und Entzündungs-Reaktionen, wirkt antiapoptotisch über NFKB
LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	1,5/ 1,6/ 2,1			multifunktionelles Lectin, Chemoattractant, antiapoptotisch (DLBCL) [198])
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	1,8/ 2,7		immune response	Stimulation B- und T-Zell-Funktion, Eintritt in den Zellzyklus, Induktion von Cyclin D2 [199]
Gruppe: Apoptose					
ANXA4	annexin A4	1,6/ 1,7/ 1,8		anti-apoptosis	Calcium-/Phospholipid-bindendes Protein ⇒ Membran-Fusion/ Exocytose / anti-Koagulation
BCL2A1	BCL2-related protein A1	1,4		anti-apoptosis	BCL2-Proteinfamilie, induziert durch NFKB und CD40
CTNNAL1	catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	0,6		apoptosis	= alpha-catenin, Einfluss auf Cyclin D1 über den Wnt-Signalweg [200]
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	1,6/ 1,9	1,6/ 1,9	apoptosis	Verbindung zwischen p53 und E2F/Rb, induziert Zellzyklusarrest
Gruppe: verschiedene Prozesse					
AICDA	activation-induced cytidine deaminase	1,4/ 1,6/ 1,8		mRNA processing	geringe Expression bei MCL [201], wichtig bei B-Zell-Differenzierung (somatische Hypermutation)
ASF1B	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	0,7/ 0,6			spielt als Histon-Chaperon eine Rolle beim Aufbau der Nukleosomen, E2F1-Target [202]
DHFR	dihydrofolate reductase	0,7/ 0,6	0,7	glycine biosynthesis	Nukleotid-Biosynthese ⇒ Ziel von Krebstherapien (Methotrexat)
TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	1,3/ 1,5/ 1,8/ 1,9		blood coagulation	Anti-Onkogen, wichtige Rolle bei Zellmigration und Tumordinvasion [203]
TMSL8	thymosin-like 8	0,6/ 0,4	0,7	cytoskeleton organization	hochreguliert bei MCL-GEPs und bei Metastasierung
UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	0,7/ 0,5	0,7	DNA repair	Ubiquitin-Ligase, Gen aus "Proliferation signature" [26]

Wie bereits in Tabelle 3 beschrieben, wurden unter anderem 5 Gene validiert, die in einer Publikation zum Mantelzell-Lymphom [26] in einer Gruppe von 20 Genen enthalten waren ("Proliferation signature"), deren Expression ein starker Marker für die Proliferations- und Überlebensrate der MCL-Tumoren ist. Abgesehen von den Genen *ASPM*, *CDC2*, *MCM2*, *TOP2A* und *UHRF1*, die in den Mantelzell-Lymphom-

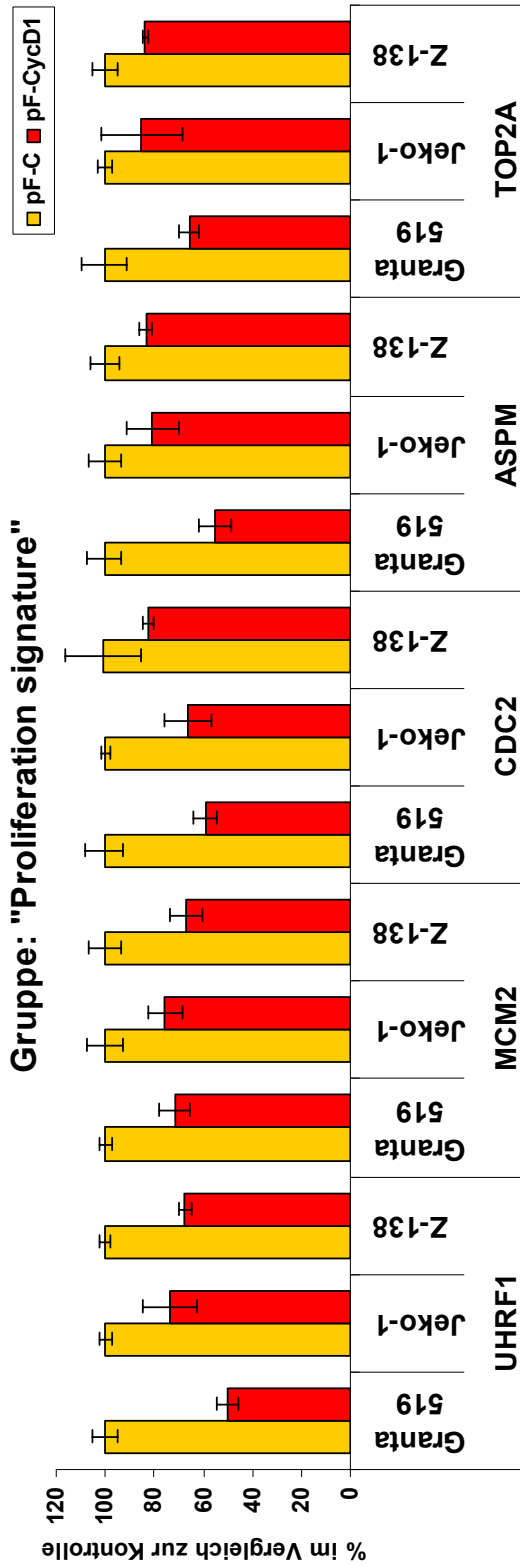
Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 validiert werden konnten (Abbildung 38), konnten aus dieser „Proliferation signature“ auch noch die Gene CENPF (centromere protein F, mitosin) und POLE2 (polymerase epsilon 2) im Genexpressionsprofil der drei und sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte also bei 7 Genen aus dieser „Proliferation signature“ eine Verbindung mit der Cyclin D1-Expression hergestellt werden.

Die Gene, die aus dem Bereich Zellzyklus und Replikation ausgewählt wurden (*CDT1/ CHAF1A/ E2F2/ MAD2L2/ MKI67*), und deren Expression durch Cyclin D1-Hinunterregulation im Genexpressionsprofil durchgehend vermindert wurde, konnten in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 validiert werden (Tabelle 3/ Abbildung 39).

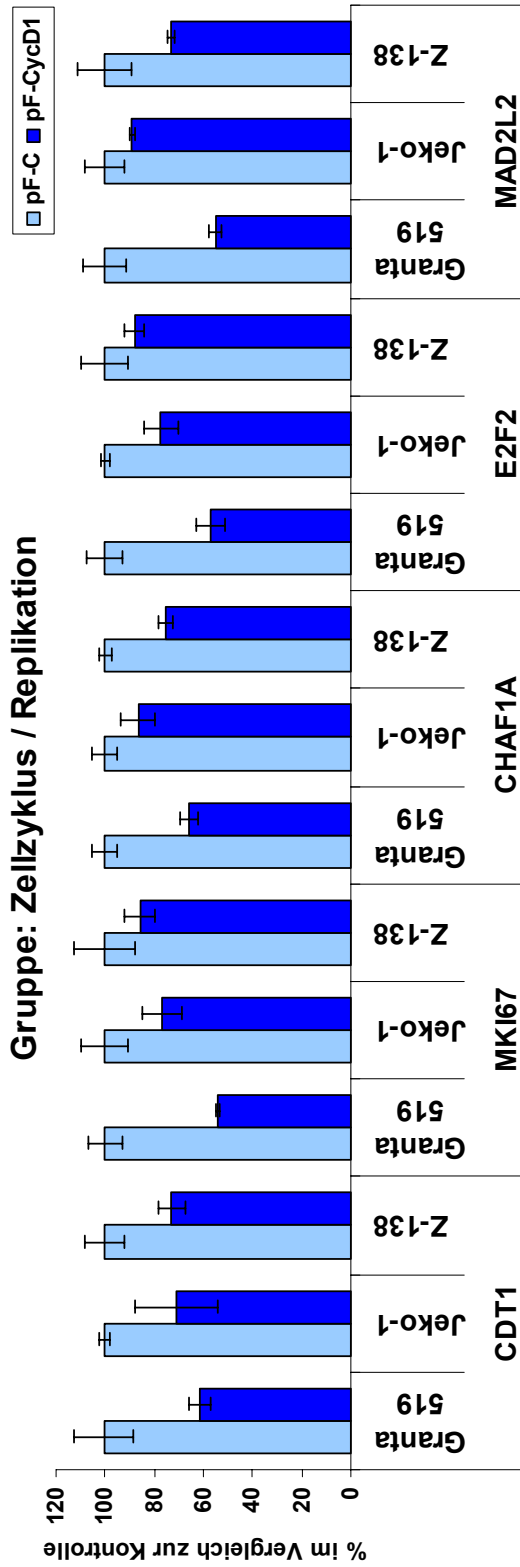
Bei den ausgewählten Genen aus dem Bereich DNA-Reparatur wurde zuvor im Genexpressionsprofil festgestellt, dass die Gene *BRCA1*, *BRIP1*, *CHEK1* und *RAD54L* durch die verminderte Cyclin D1-Expression reprimiert wurden, während das Gen *BTG2* im Gegensatz dazu in der Zelllinie Z-138 induziert wurde, was ebenfalls bei allen überprüften Zelllinien (Granta 519, Jeko-1, Z-138) validiert werden konnte (Tabelle 3/ Abbildung 40).

Die neun ausgewählten Transkriptionsfaktoren (Tabelle 3: Gruppe Transkription) konnten nicht alle durchgehend validiert werden. Zum einen konnte ebenso wie im GEP in allen drei Zelllinien, die für die Validierung verwendet wurden, bestätigt werden, dass die Gene *FOXM1*, *MLF1IP* und *MXD4* durch Cyclin D1-Hinunterregulation reprimiert (*FOXM1/ MLF1IP*) bzw. induziert (*MXD4*) werden (Abbildung 41). Des Weiteren wurde bestätigt, dass auch die Gene *ELL2*, *EZH2*, *MYBL1* und *TFEC* zumindest in den Zelllinien Granta 519 und Z-138 in Abhängigkeit von der verminderten Cyclin D1-Expression reprimiert (*EZH2/ MYBL1*) bzw. induziert (*ELL2/ TFEC*) werden. Dagegen konnten die Transkriptionsfaktoren *CUTL1* (reprimiert) und *EGR1* (induziert) nur in der Zelllinie Granta 519 validiert werden, das Gen *EGR1* zeigte sogar in der Zelllinie Jeko-1 eine gegensätzliche Tendenz im Vergleich zur Zelllinie Granta 519.



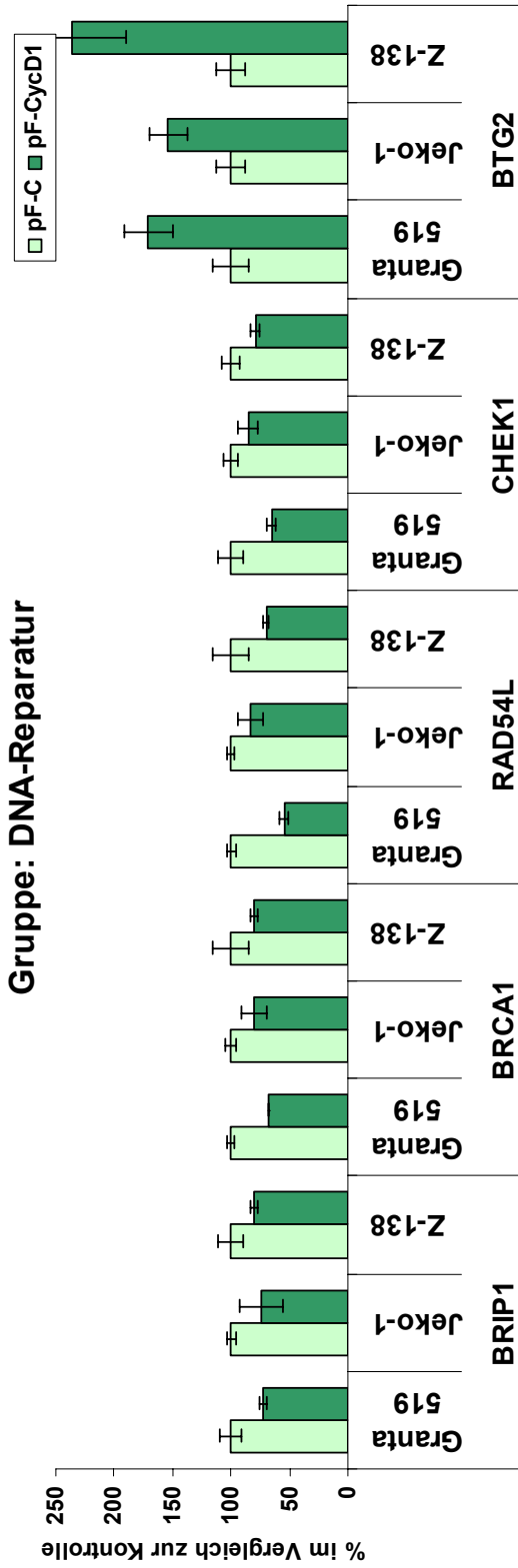
Wert von pF-CycD1 im Verhältnis zur Kontrolle (%)			
Gen	Granta 519	Jeko-1	Z-138
UHRF1	50	74	67
MCM2	72	76	67
CDC2	59	66	83
ASPM	55	81	84
TOP2A	66	85	84

Abbildung 38: Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen. Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Genen der Gruppe „Proliferation signature“ (Tabelle 3) in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die mit leerem Virus infizierten Zellen und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). In der Tabelle unter dem Diagramm ist für jedes Gen und jede Zelllinie der im Vergleich zur Kontrolle erhaltene Wert in % angegeben. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D 1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).



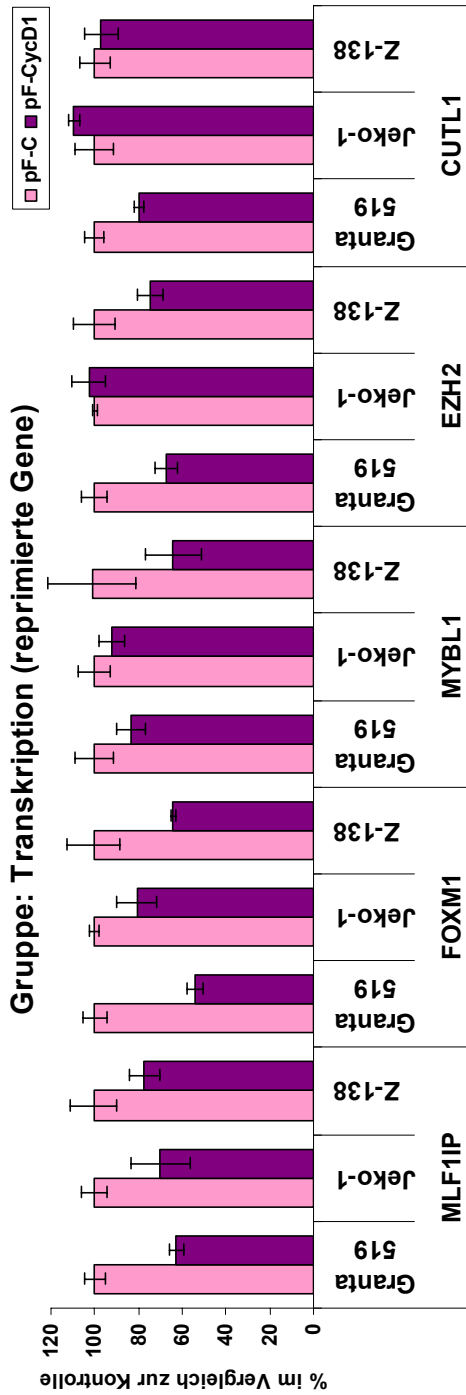
Wert von pF-CycD1 im Verhältnis zur Kontrolle (%)			
Gen	Granta 519	Jeko-1	Z-138
CDT1	61	71	73
MKI67	54	77	86
CHAF1A	66	87	75
E2F2	57	77	88
MAD2L2	55	89	73

Abbildung 39: Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen. Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Genen der Gruppe Zellzyklus/ Replikation (Tabelle 3) in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die mit leerem Virus infizierten Zellen und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). In der Tabelle unter dem Diagramm ist für jedes Gen und jede Zelllinie der im Vergleich zur Kontrolle erhaltene Wert in % angegeben. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D 1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).



Wert von pF-CycD1 im Verhältnis zur Kontrolle (%)		
Gen	Granta 519	Jeko-1
BRIP1	72	80
BRCA1	68	80
RAD54L	55	70
CHEK1	66	80
BTG2	171	236

Abbildung 40: Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen. Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Genen der Gruppe DNA-Reparatur (Tabelle 3) in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die mit leerem Virus infizierten Zellen und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). In der Tabelle unter dem Diagramm ist für jedes Gen und jede Zelllinie der im Vergleich zur Kontrolle erhaltene Wert in % angegeben. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).



Gen	Wert von pF-CycD1 im Verhältnis zur Kontrolle (%)		
	Granta 519	Jeko-1	Z-138
MLF1IP	63	70	77
FOXM1	54	81	64
MYBL1	84	92	64
EZH2	67	103	74
CUTL1	80	109	97
MXD4	353	191	234
ELL2	204	111	143
TFEC	202	92	166
EGR1	250	75	110

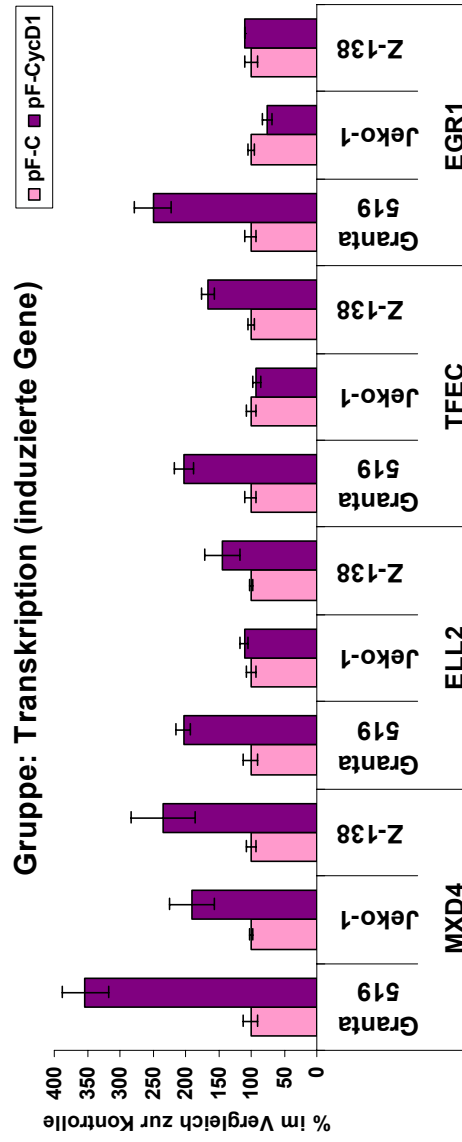


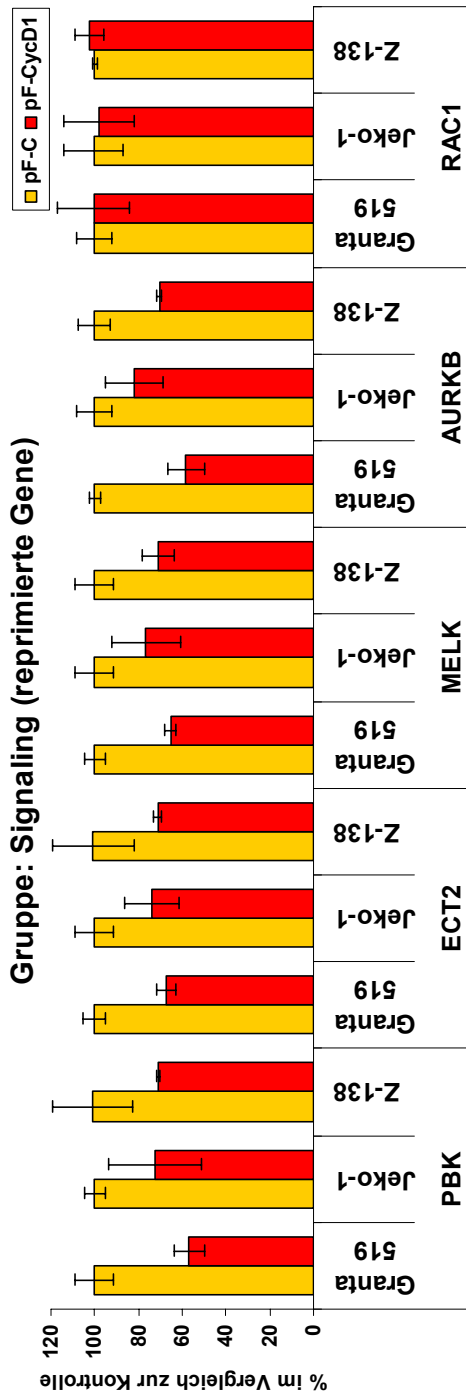
Abbildung 41: Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen. Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Genen der Gruppe Transkription (Tabelle 3) in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die mit leerem Virus infizierten Zellen und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). In der Tabelle unter dem Diagramm ist für jedes Gen und jede Zelllinie der im Vergleich zur Kontrolle erhaltene Wert in % angegeben. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).

Von den neun ausgewählten Signalling-Genen (Tabelle 3) konnten immerhin sechs durchgehend in allen überprüften Zelllinien validiert werden (Abbildung 42; reprimiert: *AURKB/ ECT2/ MELK/ PBK*; induziert: *PNRC1/ RGS13*). Das aufgrund seiner Veränderung im Genexpressionsprofil der infizierten Z-138-Zellen ausgewählte Gen *RAC1* konnte in keiner der überprüften Zelllinien bestätigt werden, während die Gene *NFKBIE* und *RASSF4* nur in der Zelllinie Granta 519 induziert vorlagen.

Bezüglich der Gruppe Immun-Signalling (Tabelle 3/ Abbildung 43) konnte bestätigt werden, dass das auf B-Lymphozyten exprimierte Oberflächenmarker-Gen *CD20* in allen überprüften Zelllinien durch Cyclin D1-Hinunterregulation induziert wird. Das Gleiche galt für das Gen *TNFSF13B*, wobei hier die Induktion in der Zelllinie Z-138 nur sehr gering war. Auch die Induktion des Gens *LGALS3* konnte bestätigt werden, allerdings nur in den Zelllinien Granta 519 und Z-138, da die Expression in der Zelllinie Jeko-1 kaum nachweisbar war. Beim Oberflächenmarker-Gen *CD40* konnte nur in der Zelllinie Granta 529 eine Induktion gefunden werden.

Aus der Gruppe der Apoptose-Gene konnten alle vier Gene validiert werden. Ebenso wie im GEP waren die beiden anti-apoptotischen Gene *ANXA4* und *BCL2A1* und das Gen *TP53INP1* in den überprüften Zelllinien induziert, während das apoptotische Gen *CTNNAL1* in den überprüften Zelllinien reprimiert war (Tabelle 3/ Abbildung 44).

Bezüglich der Gene aus verschiedenen Prozessen in der Zelle konnten die Gene *ASF1B* und *DHFR* (beide reprimiert durch verminderte Cyclin D1-Expression) in allen überprüften Zelllinien bestätigt werden, während die Induktion des Gens *AICDA*, das beim Prozess der somatischen Hypermutation in reifenden B-Zellen eine wichtige Rolle spielt, in zwei von drei Zelllinien (Granta 519 und Z-138) bestätigt werden konnte (Tabelle 3/ Abbildung 45). Die induzierte Expression von *TFPI2* und die reprimierte Expression von *TMSL8* konnte zumindest in den Zelllinien, in denen die Expression überhaupt nachweisbar war (*TFPI2*: nur Granta 519; *TMSL8*: Granta 519 und Z-138), validiert werden.



Wert von pF-CycD1 im Verhältnis zur Kontrolle (%)			
Gen	Granta 519	Jeko-1	Z-138
PBK	57	72	71
ECT2	67	74	71
MELK	65	77	71
AURKB	58	82	71
RAC1	100	98	103
RGS13	211	143	259
PNRC1	193	134	153
RASSF4	201	98	102
NFKBIE	136	87	98

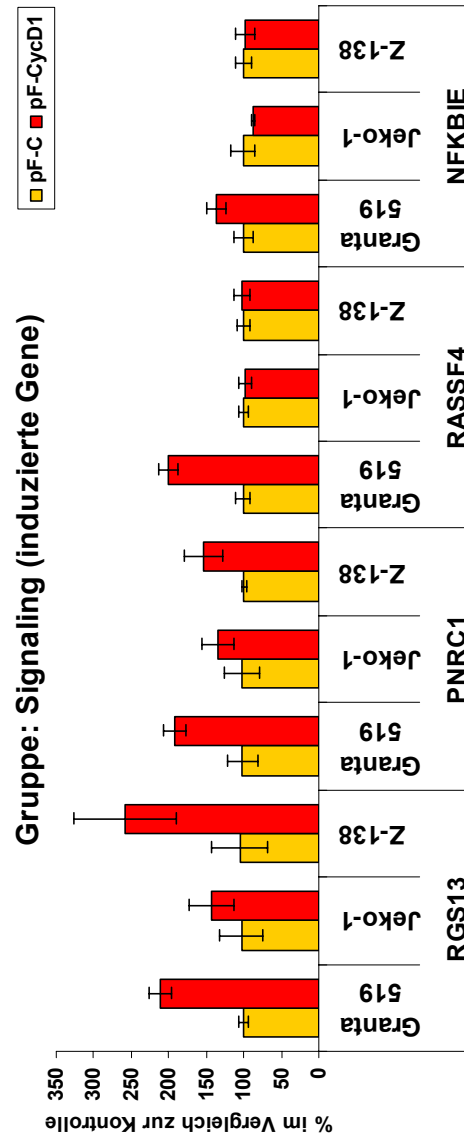
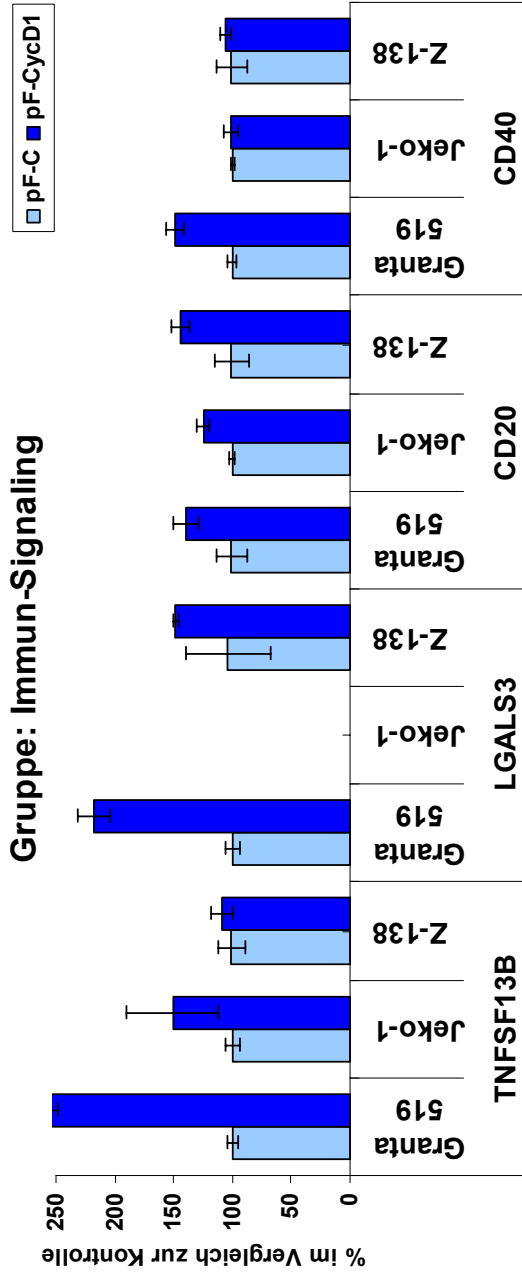
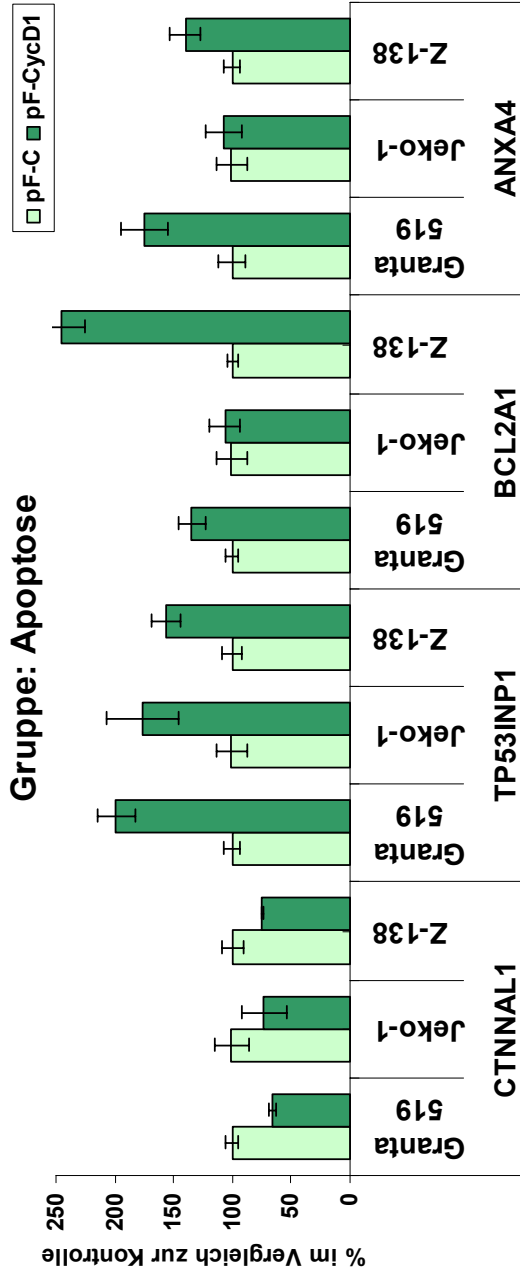


Abbildung 42: Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen. Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Genen der Gruppe Signaling (Tabelle 3) in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die mit leerem Virus infizierten Zellen und Auswertung nach der ΔC_t -Methode (Abschnitt 3.8.2). In der Tabelle unter dem Diagramm ist für jedes Gen und jede Zelllinie der im Vergleich zur Kontrolle erhaltene Wert in % angegeben. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).



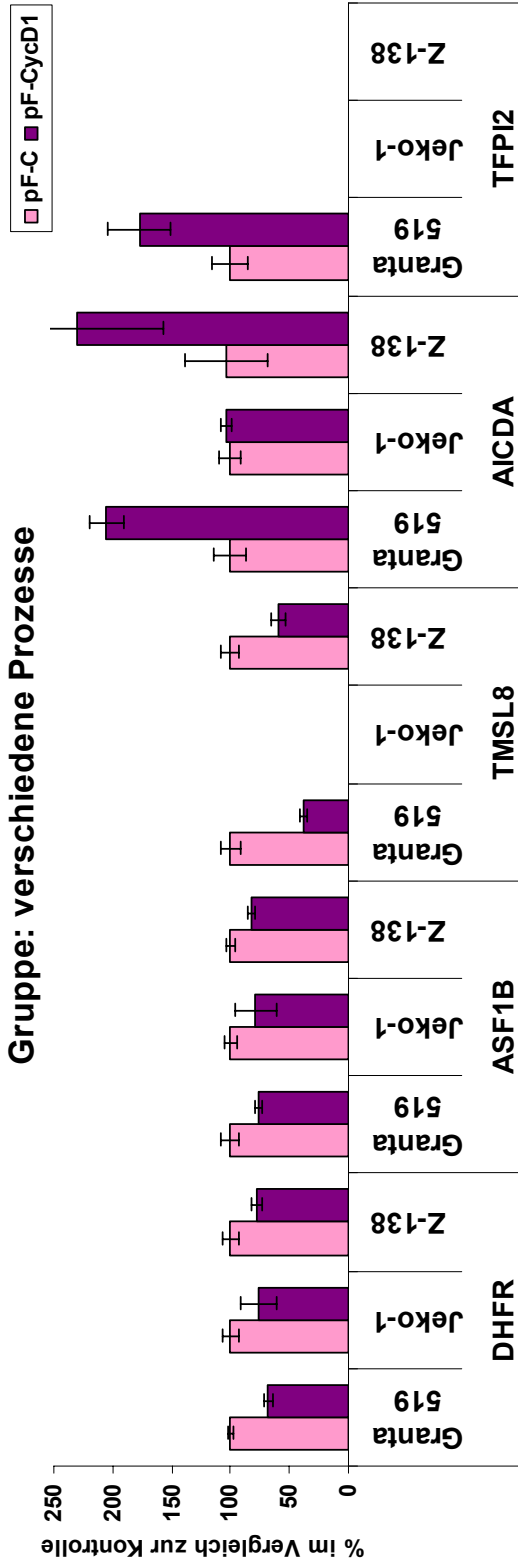
Wert von pF-CycD1 im Verhältnis zur Kontrolle (%)	
Gen	Z-138
TNFSF13B	109
LGALS3	148
CD20	144
CD40	107

Abbildung 43: Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen. Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Genen der Gruppe Immun-Signaling (Tabelle 3) in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die mit leerem Virus infizierten Zellen und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). In der Tabelle unter dem Diagramm ist für jedes Gen und jede Zelllinie der im Vergleich zur Kontrolle erhaltene Wert in % angegeben. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C). n. d. = nicht detektierbar.



Wert von pF-CycD1 im Verhältnis zur Kontrolle (%)		
Gen	Jeko-1	Z-138
CTNNAL1	66	75
TP53INP1	199	157
BCL2A1	134	245
ANXA4	175	140

Abbildung 44: Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen. Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Genen der Gruppe Apoptose (Tabelle 3) in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die mit leerem Virus infizierten Zellen und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). In der Tabelle unter dem Diagramm ist für jedes Gen und jede Zelllinie der im Vergleich zur Kontrolle erhaltene Wert in % angegeben. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C).



Wert von pF-CycD1 im Verhältnis zur Kontrolle (%)			
Gen	Granta 519	Jeko-1	Z-138
DHFR	68	76	78
ASF1B	76	79	82
TMSL8	38	n.d.	59
AICDA	205	103	230
TFPI2	177	n.d.	n.d.

Abbildung 45: Validierung ausgewählter Gene aus den Genexpressionsprofilen. Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von Genen der Gruppe verschiedene Prozesse (Tabelle 3) in den Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Z-138 sieben Tage nach Infektion. Die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Kalibrierung auf die mit leerem Virus infizierten Zellen und Auswertung nach der Δ Ct-Methode (Abschnitt 3.8.2). In der Tabelle unter dem Diagramm ist für jedes Gen und jede Zelllinie der im Vergleich zur Kontrolle erhaltene Wert in % angegeben. pF = mit leerem Virus infizierte Zellen; pF-CycD1 = mit Cyclin D 1-shRNA-Virus infizierte Zellen (Sequenz pF-CycD1-C). n.d. = nicht detektierbar.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, die Rolle der deregulierten Expression von Cyclin D1 bei der Tumorgenese des Mantelzell-Lymphoms aufzuklären. Diese Fragestellung konnte durch bisherige Studien wie z.B. die Überexpression von Cyclin D1 im lymphoiden Gewebe nicht eindeutig geklärt werden.

Deshalb wurde in dieser Arbeit der entgegengesetzte Weg gewählt und die Cyclin D1-Expression in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mittels RNA-Interferenz (RNAi) reprimiert.

Durch die Auswahl einer effizienten Cyclin D1-siRNA-Sequenz (4.2) und die Verwendung eines lentiviralen Infektions-Systems (4.3) konnte eine ausreichende Verminderung der Cyclin D1-Expression in den ansonsten nur schwer zu manipulierenden Mantelzell-Lymphom-Zelllinien erreicht werden.

Die Hinunterregulation von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien hatte insgesamt nur einen moderaten Effekt auf die zellulären Prozesse, die durch Cyclin D1 beeinflusst werden (4.4 - 4.6). Interessanterweise konnte aber eine Induktion der Cyclin D2-Expression nach Blockierung der Cyclin D1-Expression in allen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien außer der Zelllinie JVM-2 gefunden werden (4.7). Letztere exprimiert bereits ungewöhnlich hohe basale Mengen an Cyclin D2. Eine Ausschaltung beider D-Typ-Cycline führte aber nicht zur Intensivierung der Effekte, die bei der alleinigen Ausschaltung von Cyclin D1 beobachtet worden waren (4.8).

Um auf Genexpressions-Ebene ein umfassenderes Bild von den durch die Cyclin D1-Hinunterregulation bewirkten Veränderungen zu bekommen, wurde abschließend ein Genexpressionsprofil vor und nach Hemmung der Cyclin D1-Expression von den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Granta 519 und Z-138 erstellt (4.9).

5.1 Etablierung eines geeigneten Systems zur Manipulation von Genen in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

In dieser Arbeit sollte zunächst ein geeignetes System für eine ausreichende Verminderung der Expression von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien etabliert werden. In der Vergangenheit hatte sich gezeigt, dass nichtvirale Methoden bei Lymphom-Zelllinien nur geringe Transfektions-Effizienzen haben und ausschließlich durch die umstrittene Selektion stabil transfizierter Klone anwendbar sind [204, 205]. Die Elektroporation als eine dieser Methoden führt z.B. je nach

Lymphom-Zelllinie nur zu Transfektionsraten von 2% [206] bzw. abhängig vom Protokoll auch zu 15 bis 45% [204], während gleichzeitig die Zellen durch den Prozess erheblich geschädigt werden (30 bis 90% tote Zellen). Eine leichte Verbesserung wurde durch die Weiterentwicklung dieser Methode zur Nukleofektion erreicht, die durch die Optimierung elektrischer Parameter und Zelltyp-spezifischer Lösungen den Prozess schonender für die Zellen macht [207, 208]. Auch die Lipofektion, also die Einschleusung von Genen über liposomale Komplexe, konnte hier keine Abhilfe schaffen [206]. Erst durch den Einsatz viraler Vektoren konnten die Transfektionseffizienzen für Lymphom-Zelllinien entscheidend verbessert werden, je nach Lymphom-Zelllinie wurden bis zu 100% der Zellen transduziert [206, 209-211]. Neben Faktoren wie Viren-Konzentration, Zellzahl und Infektions-Volumen ist dabei wichtig, dass der Virus mit der Zelle ausreichend Kontakt hat, was einerseits über eine gemeinsame Zentrifugation und Inkubation erreicht wird, andererseits über ladungsneutralisierende kationische Reagenzien. Das Problem, dass bestimmte Zelllinien aufgrund des Fehlens von Oberflächenrezeptoren, die für das Andocken des Virus notwendig sind, resistent gegenüber dieser Methode sind [212-215], konnte bei der Infektion mit Lentiviren durch die Pseudotypisierung der Virus-Partikel gelöst werden (siehe 2.3).

Da es aufgrund der Überexpression von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien entscheidend war, die shRNA gegen Cyclin D1 möglichst effizient in die Zellen zu bringen, wurde in dieser Arbeit ein lentiviraler Vektor eingesetzt. Das gesetzte Ziel, Transfektionsraten von annähernd 100% zu erhalten, konnte durch die Optimierung der Virenproduktion und der eingesetzten Virenmenge sowie durch den Einsatz der polykationischen Verbindung Polybren[®] erreicht werden. Diesem Prozess ging die Selektion einer möglichst effizienten Cyclin D1-shRNA-Sequenz voraus. Wie wichtig die Auswahl einer geeigneten Methode ist, zeigt der Vergleich mit zwei Veröffentlichungen, die ebenfalls einen Versuch der Hinunterregulation von Cyclin D1 und weiteren Genen in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Granta 519 beschreiben [100, 216]. Während in der einen Publikation durch eine stabile transgene Einschleusung der Cyclin D1-shRNA eine zu dieser Arbeit vergleichbare Reprimierung der Cyclin D1-Expression beschrieben wird, konnte in der anderen Arbeit durch die Anwendung der Nukleofektion im Durchschnitt nur eine Verminderung auf 60% der Ausgangsmenge an mRNA beobachtet werden.

Dieses Ausmaß ist für ein überexprimiertes Gen wie Cyclin D1 eine zu geringe Veränderung, um Folge-Effekte feststellen zu können.

5.2 Rolle von Cyclin D1 im Hinblick auf die Entstehung und Entwicklung des Mantelzell-Lymphoms

Die effiziente Hinunterregulation von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien hatte insgesamt nur einen moderaten Effekt auf die zellulären Prozesse, die durch Cyclin D1 beeinflusst werden. Die Zellen zeigten keinen Wachstums-Stopp, aber das Wachstum verminderte sich zumindest um 32 bis 52% bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Abbildung 27). Parallel dazu konnte beim Zellzyklus ein Anstieg der G₁-Phase um 12,7 bis 17,6%, eine leichte Induktion der Expression von p27^{Kip1} sowie eine Reduktion der Cyclin D1/ CDK4-abhängigen Phosphorylierung von Rb (Ser807/811) beobachtet werden (Abbildung 28). Außerdem führte die Verringerung der Expression von Cyclin D1 nicht zur Induktion von Apoptose (Abbildung 29). Bezüglich der moderaten Wachstumsverminderung stimmen diese Daten mit einer bereits durchgeführten Studie überein, die mit einem anderen System eine ähnlich starke Verminderung von Cyclin D1 in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Granta 519 erzielt und daraufhin eine Wachstumsverminderung um etwa 40% beschreibt [216].

5.2.1 Kompensation von Cyclin D1 durch Cyclin D2?

Es gibt zwei mögliche Erklärungen, warum die beobachteten Effekte nach der Hinunterregulation von Cyclin D1 insgesamt relativ schwach sind. Zum ersten könnte der nur schwache anti-proliferative Effekt nach der Reprimierung von Cyclin D1 daher kommen, dass andere Zellzyklus-Proteine den Verlust an Cyclin D1 kompensieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese kann in den mit Cyclin D1-shRNA infizierten Zellen eine Induktion von Cyclin D2 auf RNA- und Proteinebene beobachtet werden (Abschnitt 4.7/ Abbildung 30).

Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, in welcher Beziehung die drei D-Typ-Cycline zueinander stehen. Cyclin D1, D2 und D3 werden durch separate Gene kodiert, weisen aber bezüglich ihrer Aminosäure-Sequenzen ein hohes Maß an Homologie auf [217]. Weiterhin ist die Expression in den verschiedenen Geweben voneinander unabhängig und kann teilweise überlappend sein. Reife B-Lymphozyten exprimieren Cyclin D2 und D3, nicht aber Cyclin D1 nach der Aktivierung des B-Zell-Rezeptors.

Hierbei scheint zwischen Cyclin D2 und D3 ein hohes Maß an funktioneller Redundanz vorhanden zu sein, denn die Ausschaltung eines der beiden D-Typ-Cycline *in vitro* führt zur Kompensation durch das verbleibende D-Typ-Cyclin [218, 219].

Betrachtet man die Situation bei den B-Zell-Lymphomen, so kann man hier eine selektive Expression der einzelnen D-Typ-Cycline feststellen [220] und speziell im Mantelzell-Lymphom rückt in den wenigen Cyclin D1-negativen Fällen oft Cyclin D2 oder D3 an die Stelle des normalerweise überexprimierten Cyclin D1 [31]. Im Bezug auf den Einfluß des überexprimierten Cyclin D1 auf die Expression der anderen beiden D-Typ-Cycline im Mantelzell-Lymphom finden zwei Studien eine inverse Korrelation zwischen der Cyclin D1- und Cyclin D3-Expression [221, 222].

Dagegen zeigt eine weitere Arbeit, dass die Mantelzell-Lymphom-Zelllinie JVM-2, die im Vergleich zu den anderen Zelllinien nur geringe Mengen an Cyclin D1 exprimiert, alternativ Cyclin D2 exprimiert [223]. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit eine inverse Korrelation zwischen den Mengen an Cyclin D1- und Cyclin D2-mRNA in allen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien einschließlich der lymphoblastoiden Zelllinie CM, welche die Situation in B-Lymphozyten widerspiegelt, gefunden (Abschnitt 4.1.1/Abbildung 20). Setzt man diese Ergebnisse zusammen, so kommt man zu der Hypothese, dass der unerwartet schwache Effekt der Cyclin D1-Hinunterregulation das Ergebnis des kompensatorischen Anstiegs an Cyclin D2-mRNA und -Protein ist.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem parallel Cyclin D1 und Cyclin D2 in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Granta 519 blockiert wurden (Abbildung 31). Die Infektion mit einer Kombination aus einem Cyclin D1-shRNA- und einem Cyclin D2-shRNA-Virus konnte zwar die Induktion von Cyclin D2-mRNA und -Protein nach Cyclin D1-Reprimierung verhindern, aber eine Verminderung unter die Ausgangsmengen wurde nicht erreicht, wobei diese in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien sehr gering sind (Abschnitt 4.1.1/Abbildung 20B). Die parallele Hemmung von Cyclin D1 und D2 führte nicht zur Induktion von Cyclin D3 und zeigte im Bezug auf Zellwachstum, Zellzyklus und Apoptose dieselben Effekte wie die alleinige Blockierung von Cyclin D1. Dies deutet darauf hin, dass der ausgleichende Anstieg von Cyclin D2 zwar auf einem regulatorischen Mechanismus zwischen Cyclin D1 und D2 basiert, dass dieser Mechanismus aber keine Auswirkung auf das Wachstum und Überleben der Zellen hat.

Dieser Befund ist nicht überraschend, da durch Mausmodelle, bei denen entweder die D-Typ-Cycline oder deren katalytische Partner Cdk4 und Cdk6 transgen ausgeschaltet wurden, gezeigt werden konnte, dass diese Proteine nur in bestimmten Geweben während der Embryogenese essentiell benötigt werden [96, 224, 225]. Dies impliziert, dass bezüglich des Zellwachstums auch Cyclin-unabhängige Mechanismen existieren. Die zusätzliche Erkenntnis, dass die Transformationsfähigkeit von Zellen reduziert ist, bei denen die D-Typ-Cycline ausgeschaltet sind [96], unterstützt die These, dass Cyclin D1 zwar für die initiiierende Transformation der Zellen, aber anschließend nicht mehr für die Persistenz und Weiterentwicklung des Mantelzell-Lymphoms notwendig ist.

5.2.2 Kompensation von Cyclin D1 durch sekundäre genetische Veränderungen?

Die abschließende These im vorherigen Abschnitt führt zur zweiten möglichen Erklärung, warum die beobachteten Effekte nach der Hinunterregulation von Cyclin D1 insgesamt relativ schwach sind. Geht man nämlich davon aus, dass die Überexpression von Cyclin D1 nur ein initiiierendes Ereignis bei der Entwicklung des Mantelzell-Lymphoms ist, so ergibt sich daraus auch die Erklärung, dass zusätzliche genetische Veränderungen in einer späteren Phase der Lymphomgenese die Rolle des überexprimierten Cyclin D1 übernehmen und damit Cyclin D1 (und D2) überflüssig machen.

Diese Erklärung wird durch drei experimentelle Beobachtungen unterstützt: zum ersten entwickeln transgene Mäuse, die in ihren B-Lymphozyten Cyclin D1 überexprimieren erst in der Kooperation mit einem zweiten Onkogen wie MYC oder RAS Lymphome [94, 95]. Zum zweiten entwickelt ein Maus-Modell mit einer in den B-Lymphozyten überexprimierten Cyclin D1-Mutante, die keinen nukleären Export erlaubt, B-Zell-Lymphome, die sekundäre genetische Veränderungen aufweisen [226]. Zum dritten findet man geringe Zahlen an B-Lymphozyten, welche die chromosomale Translokation t(11;14) tragen, auch im Blut von gesunden Patienten (Anteil von 1 bis 2%), ohne dass diese Patienten ein Mantelzell-Lymphom entwickeln [227, 228].

Zytogenetische Untersuchungen zur Identifizierung sekundärer genetischer Veränderungen, die an der Tumorgenese des Mantelzell-Lymphoms beteiligt sein könnten, haben aufgedeckt, dass das Mantelzell-Lymphom unter den bösartigen

lymphoiden Neoplasmen das höchste Maß an genomischer Instabilität aufweist [176]. Zu den wiederkehrenden Veränderungen gehören chromosomale Verluste und Gewinne sowie Amplifikationen bestimmter chromosomaler Regionen in hoher Kopienzahl (Tabelle 4).

Tabelle 4: Häufig veränderte, chromosomale Regionen im Mantelzell-Lymphom.

Chromosomale Region *	% der Fälle	Mögliche Zielgene **
<i>Gewinne</i>		
3q25-qter	32-70	ECT2, SERPINI2, ?
4p12-13	57	?
7p21-22	16-34	GPR30, CARD11, ETV1
8q21-qter	16-36	MYC
9q22	16-31	SYK , GAS1, FANCC
10p11-12	12-24	BMI1
12q13	3-30	CDK4
18q11-q23	5-18	BCL2
<i>Verluste</i>		
1p13-p31	18-52	GCLM, CDC14A, DPYD
2q13	17	BCL2L11 ***
6q23-q27	18-38	TNFAIP3, IFNGR1
8p21-pter	17-34	TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, DLGAP3
9p21-p22	18-41	CDKN2A , ARF1
9q21-qter	18-45	CDC14B, FANCC, GAS1, c9orf3
10p14-15	18-31	PRKCQ, KIN, c10orf47
11q22-q23	16-59	ATM
13q14-q34	25-70	RFP2, ING1, LIG4, TNFSF13B, DLEU1, DLEU2
17p13-pter	13-45	TP53
22q12	17-50	UCRC

* Regionen variieren leicht zwischen den einzelnen Studien

** Bestätigte Zielgene sind fett gedruckt

*** Homozygote Deletionen dieses Gens konnten in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien, aber nicht in primären Tumoren nachgewiesen werden [229]

Manche dieser Veränderungen wie z.B. die Verluste von 11q und 13q treten bei allen histologischen Varianten des Mantelzell-Lymphoms auf, während die hochproliferative und sich klinisch aggressiv verhaltende blastische Variante einen komplexeren Karyotyp mit häufigen Gewinnen von 3q und 12q und Verlusten von 9p, 9q und 17p aufweist [30, 229-236]. Auch Tetraploidie tritt häufiger in der blastischen Variante als in der klassischen Variante auf (36% vs. 8% der Fälle) [16]. Des Weiteren finden genomische Studien eine starke Überlappung zwischen Regionen,

die im Mantelzell-Lymphom häufig deletiert sind, und Regionen mit uniparentalen Disomien [106, 237]. Dies würde dafür sprechen, dass hier uniparentale Disomie einen alternativen Mechanismus zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen darstellt [238]. Die Identifizierung der Gene, die von den beschriebenen chromosomalen Veränderungen betroffen sind (Tabelle 4), hat ergeben, dass die meisten dieser Gene an zwei wichtigen, pathogenetischen Signalwegen beteiligt sind: dem Zellzyklus und der DNA-Reparatur [239]. Außerdem ergeben neuere Studien, dass auch Apoptose-Gene das Ziel genomischer Veränderungen sein können und dadurch die Wirksamkeit neuer Therapeutika beeinflusst wird [124, 229, 240, 241].

5.2.3 Schlussfolgerungen zur Rolle von Cyclin D1 beim Mantelzell-Lymphom

Die in dieser Arbeit untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien tragen verschiedene sekundäre genetische Deletionen oder Mutationen, die zum Verlust von Tumorsuppressor-Genen führen (z.B. p53 in Jeko-1, Rb in UPN-1, p16^{INK4a} in Granta 519 und Z-138) oder zur Amplifikation von Onkogenen (z.B. BCL2 in Granta 519 und UPN-1) (siehe Tabelle 2). Die Tatsache, dass der Effekt der Cyclin D1-Hinunterregulation in allen verwendeten Zelllinien ähnlich moderat ist, spricht dafür, dass die Unabhängigkeit von der Cyclin D1-Überexpression auf verschiedenen Wegen erreicht werden kann. Außerdem bestätigt die fehlende Induktion von Apoptose nach Cyclin D1-Inhibierung (Abbildung 29) frühere Studien, die zeigen, dass Mantelzell-Lymphom-Zellen aufgrund von Veränderungen in den zugehörigen Signalwegen resistent gegen Apoptose sind [97, 242, 243]. Insgesamt bestätigt diese Arbeit das in den letzten Jahren aus den verschiedenen Studien entwickelte, pathogenetische Modell für die Entstehung und Weiterentwicklung des Mantelzell-Lymphoms [109] (Abbildung 46). Nach diesem Modell ist die Deregulierung von Cyclin D1 durch die t(11;14)-Translokation ein primäres Ereignis, das zur Transformation und Expansion von B-Lymphozyten in der Mantelzone lymphatischer Follikel führt. Die Weiterentwicklung zur klassischen Variante des Mantelzell-Lymphoms geschieht dann möglicherweise über Keimbahn-Mutationen bei Genen der DNA-Reparatur und die dadurch geschaffene, genomische Instabilität führt über weitere genomische Veränderungen hin zur blastoiden Variante des Mantelzell-Lymphoms.

Welche Konsequenzen haben die Ergebnisse dieser Arbeit im Bezug auf die Therapie-Ansätze für Mantelzell-Lymphom-Patienten? Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird aufgrund der hohen Rückfallraten bei Anwendung von Standardtherapien unter anderem die Dysregulation des Zellzyklus als Ausgangspunkt für neue Therapie-Ansätze genommen (Abschnitt 2.1.6). Man geht davon aus, dass Cyclin D1 die zentrale Ursache unkontrollierter Proliferation ist und will durch die direkte oder indirekte Inhibierung von Cyclin D1 einen Wachstumsstopp bzw. Apoptose in den Mantelzell-Lymphom-Zellen auslösen. Um die Synthese oder Funktion von Cyclin D1 zu inhibieren, werden z.B. mTOR-Inhibitoren, welche die Translation von Zellzyklus-Proteinen einschließlich Cyclin D1 blockieren oder CDK-Inhibitoren wie Flavopiridol eingesetzt [120, 123].

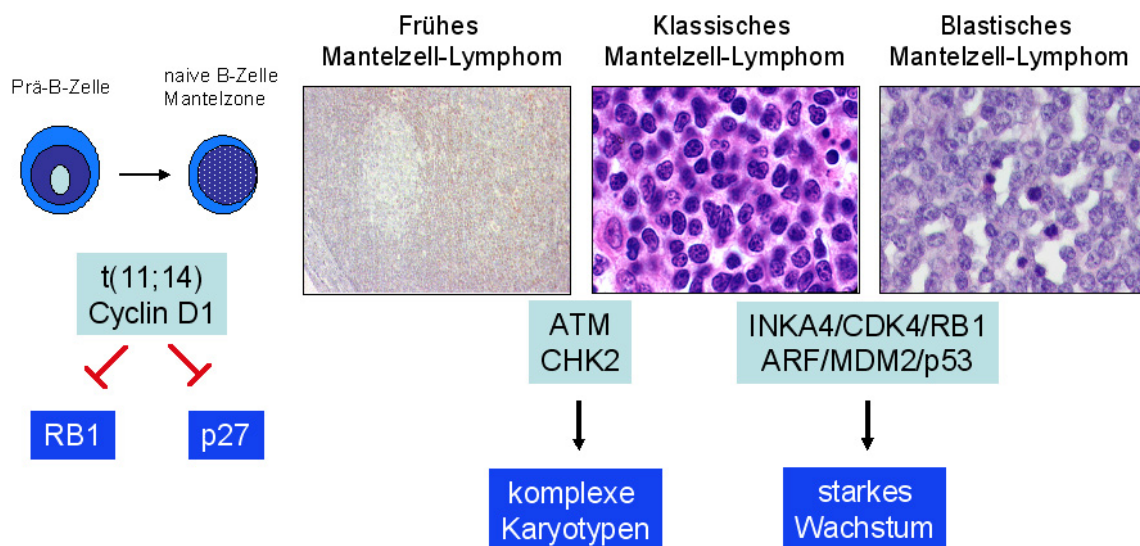


Abbildung 46: Pathogenetisches Modell für die Entstehung und Weiterentwicklung des Mantelzell-Lymphoms. Die t(11;14)-Translokation in unreifen B-Zellen führt zur konstitutiven Deregulierung von Cyclin D1 und einer frühen Expansion von Tumor-B-Zellen in der Mantelzone lymphatischer Follikel. Die Inaktivierung des DNA-Reparatur-Systems über Keimbahn-Mutationen wird bei der Weiterentwicklung zum klassischen Mantelzell-Lymphom benötigt. Gleichzeitig erleichtert die dadurch entstehende genomische Instabilität die Entstehung weiterer genomischer Veränderungen, die zur Ausprägung eines blastischen Mantelzell-Lymphoms führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass aufgrund der Redundanz des Zellzyklus-Systems und aufgrund der sekundären genomischen Veränderungen eine Inhibition von Cyclin D1 allein nicht ausreicht, um das Wachstum der Mantelzell-Lymphom-Zellen zu stoppen. Tatsächlich können einige Studien durch den Einsatz von Proteasom- oder Histondeacetylase-Inhibitoren beim Mantelzell-Lymphom eine Induktion von Apoptose erreichen, aber diese steht in keinem direktem Zusammenhang mit der Blockierung von Cyclin D1 [116, 244, 245]. So beruht z.B.

der cytotoxische Effekt des Proteasom-Inhibitors Bortezomib auf der Akkumulation pro-apoptischer Proteine und nicht auf der Repression von Cyclin D1 in den behandelten Zellen [240]. Diese Beobachtungen sprechen gegen Cyclin D1 als direktes therapeutisches Target beim Mantelzell-Lymphom.

5.3 Ergebnisse der Genexpressionsprofile

Bei den vergleichenden Genexpressionsprofilen vor und nach der Hinunterregulation von Cyclin D1 mittels Genechip-Analyse waren im GEP der drei und sieben Tage infizierten Granta 519-Zellen 139 bzw. 217 Gene signifikant verändert und im GEP der sieben Tage infizierten Z-138-Zellen 236 Gene signifikant verändert (Auswertung mit der CarmaWeb-Software). Im Granta 519-Genexpressionsprofil der drei und sieben Tage infizierten Zellen waren die differentiell exprimierten Gene mehrheitlich induziert (89 bzw. 145), während im Z-138-GEP die Gene überwiegend reprimiert waren (153). Die Überschneidung zwischen allen drei Profilen war mit nur 19 Genen relativ gering, so dass für die Validierung auch Gene ausgewählt wurden, die nur bei den Granta 519-Zellen unter den signifikant veränderten Genen waren. Aufgrund der Tatsache, dass das Z-138-GEP insgesamt etwas schwächere Fluoreszenz-Signale ergeben hatte und sich die Validierungs-Methode (qRT-PCR) durch eine höhere Sensitivität auszeichnet, konnten die Mehrheit der ausgewählten Granta 519-Gene auch in der Zell-Linie Z-138 validiert werden. Die geringe Überschneidung zwischen den GEP der Granta 519-Zellen und dem GEP der Z-138-Zellen zeigte sich zusätzlich in der Verteilung der Gene auf die biologischen Prozesse, da hier mit 18,6% der Schwerpunkt im Granta 519-GEP auf den Zellzyklus- und Signaltransduktions-Genen lag, während beim Z-138-GEP der Nukleinsäure-Stoffwechsel mit vielen veränderten Histon-Genen mit 19,2% den größten Anteil hatte.

Insgesamt wurden einerseits Gene identifiziert, deren Zusammenhang mit Cyclin D1 bzw. mit dem Mantelzell-Lymphom schon bekannt war. Andererseits wurden unter den differentiell exprimierten Genen aber auch neue Kandidaten-Gene gefunden, deren Expression möglicherweise ein prognostischer Marker für Mantelzell-Lymphom-Patienten werden kann.

5.3.1 Zellzyklus- und Replikationsgene

So ist es angesichts der zentralen Rolle von Cyclin D1 im Zellzyklus nicht verwunderlich, dass nach Expressionsverminderung von Cyclin D1 vor allem bei Granta 519 in den Genexpressionsprofilen einige reprimierte Zellzyklus-Gene auftauchen, deren verminderte Expression durch qRT-PCR bestätigt werden kann (Abbildung 39). Unter den ebenfalls reprimierten Replikations-Genen (Abbildung 39) befindet sich interessanterweise auch der Lizenzierungsfaktor CDT1, dessen erhöhte Expression in einigen Mantelzell-Lymphom-Fällen schon als ein möglicher Ausgangspunkt für die Anhäufung chromosomaler Aberrationen diskutiert wird und mit erhöhten Cyclin D1-Konzentrationen korreliert [188].

5.3.2 Gene „Proliferation signature“

In der Einleitung wurde bei den bisher erstellten Genexpressionsprofilen beim Mantelzell-Lymphom (Abschnitt 2.1.5) eine Publikation detailliert beschrieben, in der unter anderem eine Signatur von 20 Genen erstellt wird, deren Expression ein Maß für die Überlebensrate der Patienten ist und angeblich mit der Expression von Cyclin D1 korreliert [26]. Von diesen 20 Genen befanden sich 16 Gene als Probeset auf dem in dieser Arbeit verwendeten Array und es wurden sechs dieser 16 Gene unter den reprimierten Zellzyklus- und Replikationsgenen bei den drei erstellten GEPs wiedergefunden. Zusätzlich wurde aus dieser Signatur auch noch die Ubiquitin-Ligase UHRF1 bei den nach Cyclin D1-Hinunterregulation reprimierten Genen gefunden. Nach der teilweisen Validierung dieser Gene durch qRT-PCR (Abbildung 38) kann man also sagen, dass in dieser Arbeit nur sieben von 16 Genen aus der publizierten „Proliferation signature“ mit Cyclin D1 in Zusammenhang gebracht wurden.

5.3.3 DNA-Reparatur-Gene

Unter den fünf ausgewählten Genen der DNA-Reparatur (Abbildung 40), die alle als differentiell exprimiert validiert werden konnten, befindet sich neben den vier reprimierten Genen *BRCA1*, *BRIP1*, *CHEK1* und *RAD54L* das durch Cyclin D1-Blockierung induzierte Gen *BTG2* (B cell translocation gene 2). Dieses Gen ist ebenso wie *TP53INP1* aus der Gruppe der Apoptose-Gene ein Ziel-Gen von p53 und die validierte Induktion beider Gene selbst in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie Jeko-

1 ist insofern erstaunlich, da in dieser Zelllinie p53 eigentlich deletiert bzw. mutiert vorliegt (siehe Material und Methoden, Tabelle 2).

5.3.4 Transkriptions-Gene

Bei der Gruppe Transkription (Abbildung 41) wurden für die Validierung vier Gene ausgewählt, die durch die Cyclin D1-Hinunterregulation induziert wurden (*EGR1*, *ELL2*, *MXD4*, *TFEC*) und fünf Gene, die entsprechend reprimiert wurden (*CUTL1*, *EZH2*, *FOXM1*, *MLF1IP*, *MYBL1*). Die induzierten Gene konnten bis auf *EGR1* in der Mehrheit der Zell-Linien validiert werden. Besonders deutlich zeigte sich die Induktion beim basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor MXD4 (MAX dimerization protein 4), der als Heterodimer mit dem MAX-Protein einen transkriptionell reprimierenden Komplex bildet. Da der Bindungspartner MAX auch mit dem MYC-Protein einen Komplex bilden kann, der im Gegensatz dazu transkriptionell aktivierend wirkt, fungiert MXD4 in diesem System als ein Tumorsuppressor mit wachstumkontrollierender Funktion [246]. Bis jetzt konnte nur für das nahe verwandte MXD3-Protein eine Regulation durch E2F1 gezeigt werden, aber eine Beeinflussung von MXD4 durch Cyclin D1 war bis jetzt noch nicht bekannt [247].

Die Transkriptionsfaktoren *EGR1* und *TFEC* sind unter anderem wichtig für die myeloische Differenzierung, außerdem spielt *EGR1* je nach Zell-Typ eine tumorsuppressorische oder tumorfördernde Rolle und reguliert möglicherweise die Expression von Cyclin D2 [248, 249]. Unter den reprimierten Transkriptionsfaktoren, die bis auf *CUTL1* in der Mehrheit der Zell-Linien validiert werden konnten, befindet sich der transkriptionelle Repressor *MLF1IP*, der im Gegensatz zu *EGR1* und *TFEC* Differenzierungsprozesse unterdrückt und dadurch möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung von Erythroleukämien und anderen Tumoren spielt [250].

Der ebenfalls reprimierte Transkriptionsfaktor *FOXM1* ist wichtig für den Ablauf der Mitose, aber auch für die DNA-Reparatur (Zielgene: *Cdc25B*, *AURKB*, *Survivin*, *CENPA*, *CENPB*) [251, 252]. Er wird ähnlich wie E2F durch das Retinoblastoma-Protein Rb gehemmt und kann durch die Cyclin D1/CDK4-abhängige Phosphorylierung von Rb freigesetzt werden [253]. Außerdem reguliert er indirekt die Expression der CDK-Inhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} [252]. Eine neue Erkenntnis ist die direkte Expressions-Abhängigkeit von Cyclin D1. Dies gilt auch für das Polycomb-

Protein EZH2, das in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt und speziell beim Mantelzell-Lymphom schon als prognostischer Marker vorgeschlagen wurde [192].

5.3.5 Signalling-Gene

Von den neun ausgewählten Signalling-Genen (Abbildung 42) konnten nur sechs in der Mehrheit der Zell-Linien validiert werden, unter ihnen das reprimierte FOXM1-Zielgen AURKB (aurora kinase B), welches ebenso wie FOXM1 eine entscheidende Funktion im mitotischen Ablauf hat. Das Proto-Onkogen ECT2, das ebenfalls durch Cyclin D1-Hinunterregulation reprimiert wird, ist ein wichtiger Regulator der Zytokinese und kann bei Überexpression und/oder fehlender Regulierung durch den Rb/E2F-Signalweg zu erhöhten Zellteilungsraten in Tumoren führen [193]. Passend dazu gibt es bezüglich der Region, in der das Gen liegt, in 32-70% der Mantelzell-Lymphome einen chromosomalen Zugewinn (Tabelle 4). Bei den durch die Verminderung der Cyclin D1-Expression induzierten Signalling-Genen kodiert das Gen *PNRC1* für ein Koaktivator-Protein der nukleären Rezeptoren, das durch Interaktion mit dem Adaptor-Protein Grb2 suppressorisch auf den MAP-Kinase-/Ras-Signalweg oder auf den nukleären Rezeptor selbst wirkt [196]. Ein weiteres induziertes Signal-Protein, RGS13, ist ein negativer Regulator des G-Protein-Signalling. Da viele Chemokine an die Rezeptoren dieser Signalkaskaden binden, geht man davon aus, dass RGS13 die Chemokin-Sensitivität von B-Zellen steuert [254]. In der Literatur ist bis jetzt kein Zusammenhang zwischen Cyclin D1 und RGS13 zu finden, aber ein vor fünf Jahren erstelltes Genexpressionsprofil beim Mantelzell-Lymphom (Abschnitt 2.1.5) zeigt nur im lymphoiden Kontroll-Gewebe eine normale Expression von RGS13 und keine oder nur eine sehr verminderte Expression im Mantelzell-Lymphom. Dabei wird RGS13 als neuer Tumor-Marker vorgeschlagen [98]. Ob durch die verminderte Expression von RGS13 die Zellen stärker auf Cytokine reagieren und dadurch die Tumorgenese vorangetrieben wird, ist noch nicht geklärt.

5.3.6 Immun-Signalling-Gene

Bei den vier ausgewählten Genen der Gruppe Immun-Signalling konnten drei in der Mehrheit der Zell-Linien validiert werden (Abbildung 43). Eines dieser drei Gene, *MS4A1*, kodiert für den Oberflächenmarker CD20, der von reifen B-Zellen exprimiert wird und eine Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen zu Plasma-Zellen spielt. Bei

der Immun-Therapie des Mantelzell-Lymphoms ist dieser Oberflächenmarker das Ziel des monoklonalen Antikörpers Rituximab (Abschnitt 2.1.6), eine Verbindung zwischen CD20 und Cyclin D1 gab es aber bisher noch nicht. Bei Galektin-3 (Gen: *LGALS3*), einem multifunktionellen Lektin, dass an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist (Zelladhäsion, Proliferation, Differenzierung, Angiogenese), konnte dagegen schon eine transkriptionelle Regulation von Cyclin D1 beobachtet werden [255]. Wie aber die Repression von Cyclin D1 zu einer Induktion von Galektin-3 führen kann bzw. ob diese Induktion wie bei anderen B-Zell-Neoplasien etwas mit der anti-apoptotischen Funktion von Galektin-3 zu tun hat [198], ist noch unklar. Das ebenfalls durch die Cyclin D1-Hinunterregulation induzierte Cytokin TNFSF13B gehört zur Familie der TNF-Liganden und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von B- und T-Zellen. So bewirkt es bei ruhenden B-Zellen den Eintritt in den Zellzyklus und induziert über die Aktivierung von NFκB die Expression von Cyclin D2 und CDK4 [199]. In Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) korrelieren hohe Konzentrationen an TNFSF13B mit einem aggressiveren Tumor-Wachstum und einer schlechteren Prognose für den Patienten [256]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von NHL-Zellen mit rekombinantem TNFSF13B eine anti-apoptotische Wirkung hat [257]. Dies ist wahrscheinlich auch der Hintergrund für die in dieser Arbeit beobachtete Induktion von TNFSF13B.

5.3.7 Apoptose-Gene

Die vier Gene der Gruppe Apoptose (Abbildung 44) konnten alle in der Mehrheit der Zell-Linien validiert werden, darunter das deutlich induzierte Gen *BCL2A1* (BCL2-related protein A1), das zur BCL-2-Genfamilie gehört und dessen Gen-Produkt über die Reduktion von freiem Cytochrom C anti-apoptotisch wirkt. Weiterhin wird *BCL2A1* in Reaktion auf inflammatorische Signale (GM-CSF, CD40, Phorbol ester, TNF, IL-1) durch NFκB transkriptionell reguliert und führt bei Überexpression zur Apoptose-Resistenz von Tumoren [258]. Ein Zusammenhang mit Cyclin D1 ist bis jetzt nicht bekannt, während im Gegensatz dazu hat das ebenfalls anti-apoptotische alpha-Catulin (Gen: *CTNNA1*) über den Rho-GTPase und den Wnt-Signalweg einen hemmenden Einfluss auf den Cyclin D1-Promotor hat [200]. Da auf der anderen Seite eine Überexpression von alpha-Catulin ebenso wie bei *BCL2A1* Apoptose-Resistenz erzeugt [259], ist nicht ganz klar, warum die Expressionsverringering von Cyclin D1 letztendlich zu einer Repression von alpha-Catulin führt.

5.3.8 Gene verschiedener Prozesse

In der letzten Gruppe wurden sechs Gene, die verschiedensten Prozessen angehören, zusammengefasst (Abbildung 45). Zwei dieser Gene, *AICDA* und *TFPI2*, werden durch die Hemmung von Cyclin D1 induziert. *AICDA* kodiert für das Enzym „Activation Induced Cytidine Deaminase“, das eine wichtige Rolle bei der somatischen Hypermutation in reifen-B-Zellen spielt, mittels derer höhere Antikörper-Affinitäten erreicht werden sollen. Interessanterweise wurde die Expression von *AICDA* bereits in Mantelzell-Lymphom-Fällen untersucht und man fand im Vergleich zum lymphoiden Kontroll-Gewebe deutlich verminderte Konzentrationen [201]. Die Induktion von *AICDA* nach Blockierung von Cyclin D1 würde für einen Zusammenhang zwischen verminderter *AICDA*-Expression und Cyclin D1-Überexpression sprechen. Das zweite induzierte Gen, *TFPI2* (tissue factor pathway inhibitor 2), kodiert für einen Serinprotease-Inhibitor, der als Gegenspieler der Blutgerinnung bei kleinsten Verletzungen fungiert. Weiterhin hat *TFPI2* eine anti-onkogene Funktion durch die Inhibierung von Zellmigration und Metastasierung [203], eine Verbindung zu Cyclin D1 ist aber bis jetzt noch nicht beschrieben. Das reprimierte Histon-Chaperon *ASF1B* spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau der Nukleosomen und damit auch beim DNA-Reparatur-System und transkriptionellem Silencing. Im Jahr 2007 wurde herausgefunden, dass *ASF1B* ein transkriptionelles Target von *E2F1* ist, wodurch schon eine gewisse Verbindung mit Cyclin D1 hergestellt ist [202]. Die Repression eines weiteren Gens, *DHFR*, welches für das Enzym Dihydrofolat-Reduktase kodiert, ist insofern keine Überraschung, da es ein zentrales Enzym der Nukleotid- und Glycin-Biosynthese ist. Seine Aktivität steht also in direktem Zusammenhang mit Replikation und Zellzyklus und ist das Ziel vieler Tumorthérapien (Methotrexat). Abschließend ist noch ein Gen zu erwähnen, *TMSL8* (thymosin-like 8), das ebenfalls durch die Blockierung von Cyclin D1 reprimiert wird und an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist. Da dieses Gen bei der Metastasierung von Tumoren in erhöhtem Maße exprimiert wird und als ein Marker-Gen für das Mantelzell-Lymphom gilt [260], ist hier schon eine indirekte Verbindung zu Cyclin D1 hergestellt.

5.3.9 Schlussfolgerungen zu den Ergebnissen der Genexpressionsprofile

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich einerseits durch die Induktion von p53-Zielgenen (*BTG2*, *TP53INP1*) und anderen proliferationshemmenden Genen (*MXD4*, *PNRC1*, *RGS13*, *TFPI2*) bzw. durch die gleichzeitige Hemmung proliferationsfördernder Gene (*MLF1IP*, *FOXM1*, *EZH2*, *AURKB*, *ECT2*) die Auswirkungen der Blockierung von Cyclin D1 zeigen. Auf der anderen Seite erfolgt aber durch die Induktion anti-apoptotischer Proteine (*EGR1*, *TNFSF13B*, *BCL2A1*, *Galektin-3*), die teilweise zusätzlich einen fördernden Effekt auf die Cyclin D2-Expression haben, eine deutliche Gegenregulation. Dieser Ausgleich führt in Kombination mit den sekundären genomischen Veränderungen möglicherweise zu den insgesamt nur moderaten Effekten der Cyclin D1-Hinunterregulation bei den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. Es konnten aber durch die vergleichenden Genexpressionsprofile neue Abhängigkeiten zwischen der Cyclin D1-Überexpression und bestimmten Genen gefunden werden. Abgesehen davon, dass die Ergebnisse der Genexpressionsprofile zu einem besseren Verständnis der Lymphomgenese beim Mantelzell-Lymphom führen, können sich also in weiterführenden Arbeiten möglicherweise auch neue prognostische Marker und/oder therapeutische Ansätze für die Behandlung des Mantelzell-Lymphoms ergeben. Dies würde die Situation für den einzelnen Patienten im Hinblick auf eine individualisierte Therapie eventuell verbessern.

6. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Das Mantelzell-Lymphom ist infolge der charakteristischen Translokation t(11;14)(q13;q32) durch eine deregulierte Expression von Cyclin D1 gekennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Cyclin D1 mittels RNA-Interferenz in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien auszuschalten, um so Rückschlüsse auf die Rolle der Überexpression von Cyclin D1 bei der Tumorgenese des Mantelzell-Lymphoms ziehen zu können.

Dabei bestand ein wichtiger Teil der Arbeit darin, ein System zu etablieren, dass die erfolgreiche Manipulation dieser nur schwer zu transfizierenden Mantelzell-Lymphom-Zelllinien ermöglichte. Aufgrund der guten Ergebnisse bei anderen Lymphom-Zelllinien fiel dabei die Wahl auf eine Infektion durch Lentiviren. Nach Optimierung der lentiviralen Infektion und der Auswahl einer geeigneten Cyclin D1-siRNA-Sequenz konnte damit eine ausreichende Verminderung der Cyclin D1-Expression in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien erreicht werden. Des Weiteren wird dieses erfolgreich etablierte System auch für zukünftige Fragestellungen von Nutzen sein.

Nach Hinunterregulation von Cyclin D1 in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurden im Bezug auf die durch Cyclin D1 beeinflussten zellulären Prozesse insgesamt nur moderate Effekte beobachtet.

Die zunächst aufgestellte Hypothese, dass dies mit der gleichzeitig beobachteten Induktion von Cyclin D2 auf RNA- und Proteinebene zusammenhängen könnte, wurde durch die gleichzeitige Ausschaltung von Cyclin D1 und D2, die diese moderaten Effekte nicht intensivieren konnte, widerlegt.

Somit liegt die Antwort auf die Frage nach der Rolle der Cyclin D1-Überexpression bei der Tumorgenese des Mantelzell-Lymphoms wohl darin, dass Cyclin D1 zwar für die initiiierende Transformation der Zellen, aber anschließend nicht mehr für die Persistenz und Weiterentwicklung des Mantelzell-Lymphoms notwendig ist. Gestützt wird diese Antwort für allem durch die Tatsache, dass das Mantelzell-Lymphom unter den bösartigen lymphoiden Neoplasmen das höchste Maß an genomischer Instabilität aufweist [176]. Somit können zusätzliche genetische Veränderungen in einer späteren Phase der Lymphomgenese die Rolle des überexprimierten Cyclin D1 übernehmen und damit Cyclin D1 überflüssig machen.

Um dennoch ein umfassenderes Bild von den durch die Cyclin D1-Blockierung bewirkten Expressionsunterschieden zu bekommen, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit von den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien ein vergleichendes Genexpressionsprofil vor und nach der Behandlung mit der Cyclin D1-siRNA erstellt.

Nach Erstellung dieser GEP wurde deutlich, dass unter den differentiell exprimierten Genen einerseits solche waren, bei denen bereits eine Verbindung zu Cyclin D1 und/oder dem Mantelzell-Lymphom bestand, andererseits aber auch solche, bei denen bis jetzt noch kein direkter Zusammenhang mit Cyclin D1 bekannt ist. So erfolgt beispielsweise nach Blockierung von Cyclin D1 eine deutliche Repression des Polycomb-Proteins EZH2, das eine entscheidende Rolle bei der Zugänglichkeit des Chromatins für die Transkription spielt. Es liegt in vielen Tumoren überexprimiert vor und wurde speziell beim Mantelzell-Lymphom schon als prognostischer Marker vorgeschlagen [192]. Eine neue Erkenntnis ist in diesem Zusammenhang die direkte Verbindung mit Cyclin D1.

Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass die weiterführenden Arbeiten einerseits darin liegen müssen, die hier erhaltenen Ergebnisse im Patienten-Material zu überprüfen, was auf lange Sicht eventuell zur Entwicklung neuer prognostischer Marker und zu gezielteren Therapie-Möglichkeiten beim Mantelzell-Lymphom führen könnte.

Da aber Cyclin D1 in seiner Überexpression doch Gene zu beeinflussen scheint, die in ihrer Gesamtheit möglicherweise eine hohe Apoptose-Resistenz auslösen, wäre es auch sinnvoll zu testen, ob die mit der Cyclin-D1-siRNA behandelten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien sensitiver auf die Zugabe von derzeit angewandten Chemotherapeutika reagieren.

7. LITERATUR

1. Janeway, C.A., et al., *Immunologie*. Vol. 5. 2002, Heidelberg / Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
2. Jaffe, E.S., et al., *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2001, Lyon: IARC Press.
3. *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project*. *Blood*, 1997. **89**(11): p. 3909-18.
4. Tort, F., et al., *Familial lymphoid neoplasms in patients with mantle cell lymphoma*. *Haematologica*, 2004. **89**(3): p. 314-9.
5. Campo, E., M. Raffeld, and E.S. Jaffe, *Mantle-cell lymphoma*. *Semin Hematol*, 1999. **36**(2): p. 115-27.
6. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. *Blood*, 1994. **84**(5): p. 1361-92.
7. Lai, R. and L.J. Medeiros, *Pathologic diagnosis of mantle cell lymphoma*. *Clin Lymphoma*, 2000. **1**(3): p. 197-206; discussion 207-8.
8. Pileri, S.A., et al., *The pathologist's view point. Part II --aggressive lymphomas*. *Haematologica*, 2000. **85**(12): p. 1308-21.
9. Bosch, F., et al., *PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma*. *Blood*, 1994. **84**(8): p. 2726-32.
10. de Boer, C.J., et al., *Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma*. *Blood*, 1995. **86**(7): p. 2715-23.
11. Teramoto, N., et al., *Expression of cyclin D2 and D3 in lymphoid lesions*. *Int J Cancer*, 1999. **81**(4): p. 543-50.
12. Hummel, M., et al., *Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle*. *Blood*, 1994. **84**(2): p. 403-7.
13. Walsh, S.H. and R. Rosenquist, *Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis*. *Med Oncol*, 2005. **22**(4): p. 327-41.
14. Chibbar, R., et al., *bcl-1 gene rearrangements in mantle cell lymphoma: a comprehensive analysis of 118 cases, including B-5-fixed tissue, by polymerase chain reaction and Southern transfer analysis*. *Mod Pathol*, 1998. **11**(11): p. 1089-97.

15. Li, J.Y., et al., *Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization*. Am J Pathol, 1999. **154**(5): p. 1449-52.
16. Ott, G., et al., *Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1421-9.
17. Rimokh, R., et al., *Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas*. Blood, 1994. **83**(7): p. 1871-5.
18. Welzel, N., et al., *Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1629-36.
19. Stamatopoulos, K., et al., *Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation*. Br J Haematol, 1999. **105**(1): p. 190-7.
20. Belaud-Rotureau, M.A., et al., *A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas*. Mod Pathol, 2002. **15**(5): p. 517-25.
21. Katz, R.L., et al., *Detection of chromosome 11q13 breakpoints by interphase fluorescence in situ hybridization. A useful ancillary method for the diagnosis of mantle cell lymphoma*. Am J Clin Pathol, 2000. **114**(2): p. 248-57.
22. Xiong, Y., et al., *Human D-type cyclin*. Cell, 1991. **65**(4): p. 691-9.
23. Seto, M., et al., *Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation*. Oncogene, 1992. **7**(7): p. 1401-6.
24. de Boer, C.J., et al., *Visualization of mono-allelic chromosomal aberrations 3' and 5' of the cyclin D1 gene in mantle cell lymphoma using DNA fiber fluorescence in situ hybridization*. Oncogene, 1997. **15**(13): p. 1599-603.
25. Wiestner, A., et al., *Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4599-606.
26. Rosenwald, A., et al., *The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma*. Cancer Cell, 2003. **3**(2): p. 185-97.
27. Sander, B., et al., *Mantle cell lymphomas with low levels of cyclin D1 long mRNA transcripts are highly proliferative and can be discriminated by elevated cyclin A2 and cyclin B1*. Int J Cancer, 2005. **117**(3): p. 418-30.
28. Krieger, S., et al., *Relevance of cyclin D1b expression and CCND1 polymorphism in the pathogenesis of multiple myeloma and mantle cell lymphoma*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 238.

29. Marzec, M., et al., *Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1744-50.
30. Salaverria, I., et al., *Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature*. J Clin Oncol, 2007. **25**(10): p. 1216-22.
31. Fu, K., et al., *Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4315-21.
32. Lamb, J., et al., *A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer*. Cell, 2003. **114**(3): p. 323-34.
33. Matsushime, H., et al., *Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK}-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins*. Cell, 1992. **71**(2): p. 323-34.
34. Meyerson, M. and E. Harlow, *Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2077-86.
35. Koff, A., et al., *Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family*. Cell, 1991. **66**(6): p. 1217-28.
36. Koff, A., et al., *Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle*. Science, 1992. **257**(5077): p. 1689-94.
37. Sherr, C.J., *Mammalian G1 cyclins*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1059-65.
38. Ewen, M.E., et al., *Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins*. Cell, 1993. **73**(3): p. 487-97.
39. Kato, J., et al., *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Genes Dev, 1993. **7**(3): p. 331-42.
40. Brehm, A., et al., *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 597-601.
41. Harbour, J.W., et al., *Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1*. Cell, 1999. **98**(6): p. 859-69.
42. Nevins, J.R., *Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families*. Cell Growth Differ, 1998. **9**(8): p. 585-93.
43. Zhang, H.S., et al., *Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF*. Cell, 2000. **101**(1): p. 79-89.

44. Hatakeyama, M., et al., *Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein*. *Genes Dev*, 1994. **8**(15): p. 1759-71.
45. Hinds, P.W., et al., *Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins*. *Cell*, 1992. **70**(6): p. 993-1006.
46. Lundberg, A.S. and R.A. Weinberg, *Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(2): p. 753-61.
47. Cheng, M., et al., *The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts*. *EMBO J*, 1999. **18**(6): p. 1571-83.
48. LaBaer, J., et al., *New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors*. *Genes Dev*, 1997. **11**(7): p. 847-62.
49. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. *Genes Dev*, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
50. Montagnoli, A., et al., *Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation*. *Genes Dev*, 1999. **13**(9): p. 1181-9.
51. Nguyen, H., D.M. Gitig, and A. Koff, *Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(2): p. 1190-201.
52. Pagano, M., et al., *Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*. *Science*, 1995. **269**(5224): p. 682-5.
53. Sheaff, R.J., et al., *Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1*. *Genes Dev*, 1997. **11**(11): p. 1464-78.
54. Vlach, J., S. Hennecke, and B. Amati, *Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*. *EMBO J*, 1997. **16**(17): p. 5334-44.
55. Bienvenu, F., H. Gascan, and O. Coqueret, *Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(20): p. 16840-7.
56. Ganter, B., S. Fu, and J.S. Lipsick, *D-type cyclins repress transcriptional activation by the v-Myb but not the c-Myb DNA-binding domain*. *EMBO J*, 1998. **17**(1): p. 255-68.
57. Inoue, K. and C.J. Sherr, *Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclin-dependent-kinase-independent mechanism*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(3): p. 1590-600.

58. Knudsen, K.E., W.K. Cavenee, and K.C. Arden, *D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability*. Cancer Res, 1999. **59**(10): p. 2297-301.
59. Lin, H.M., L. Zhao, and S.Y. Cheng, *Cyclin D1 Is a Ligand-independent Co-repressor for Thyroid Hormone Receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28733-41.
60. Ratineau, C., et al., *Cyclin D1 represses the basic helix-loop-helix transcription factor, BETA2/NeuroD*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8847-53.
61. Shao, Z. and P.D. Robbins, *Differential regulation of E2F and Sp1-mediated transcription by G1 cyclins*. Oncogene, 1995. **10**(2): p. 221-8.
62. Skapek, S.X., et al., *Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 7043-53.
63. Zwijsen, R.M., et al., *CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1*. Cell, 1997. **88**(3): p. 405-15.
64. Adnane, J., Z. Shao, and P.D. Robbins, *Cyclin D1 associates with the TBP-associated factor TAF(II)250 to regulate Sp1-mediated transcription*. Oncogene, 1999. **18**(1): p. 239-47.
65. Lazaro, J.B., P.J. Bailey, and A.B. Lassar, *Cyclin D-cdk4 activity modulates the subnuclear localization and interaction of MEF2 with SRC-family coactivators during skeletal muscle differentiation*. Genes Dev, 2002. **16**(14): p. 1792-805.
66. McMahon, C., et al., *P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5382-7.
67. Siegert, J.L., et al., *Cyclin D1 suppresses retinoblastoma protein-mediated inhibition of TAFII250 kinase activity*. Oncogene, 2000. **19**(50): p. 5703-11.
68. Zwijsen, R.M., et al., *Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3488-98.
69. Quelle, D.E., et al., *Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest*. Cell, 1995. **83**(6): p. 993-1000.
70. Kamijo, T., et al., *Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8292-7.
71. Pomerantz, J., et al., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53*. Cell, 1998. **92**(6): p. 713-23.

72. Stott, F.J., et al., *The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2.* EMBO J, 1998. **17**(17): p. 5001-14.
73. Zhang, Y., Y. Xiong, and W.G. Yarbrough, *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways.* Cell, 1998. **92**(6): p. 725-34.
74. Sherr, C.J., *Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway.* Genes Dev, 1998. **12**(19): p. 2984-91.
75. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles.* Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
76. Bani-Hani, K., et al., *Prospective study of cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma.* J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(16): p. 1316-21.
77. Bartkova, J., et al., *Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer.* Int J Cancer, 1994. **57**(3): p. 353-61.
78. Bartkova, J., et al., *Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer.* Cancer Res, 1995. **55**(4): p. 949-56.
79. Bartkova, J., et al., *The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas.* Int J Cancer, 1994. **58**(4): p. 568-73.
80. Gillett, C., et al., *Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining.* Cancer Res, 1994. **54**(7): p. 1812-7.
81. Ikeguchi, M., et al., *Cyclin D1 expression and retinoblastoma gene protein (pRB) expression in esophageal squamous cell carcinoma.* J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(9): p. 531-6.
82. Vos, C.B., et al., *Cyclin D1 gene amplification and overexpression are present in ductal carcinoma in situ of the breast.* J Pathol, 1999. **187**(3): p. 279-84.
83. Jares, P., et al., *Expression of retinoblastoma gene product (pRb) in mantle cell lymphomas. Correlation with cyclin D1 (PRAD1/CCND1) mRNA levels and proliferative activity.* Am J Pathol, 1996. **148**(5): p. 1591-600.
84. Zukerberg, L.R., et al., *Expression of the retinoblastoma protein in low-grade B-cell lymphoma: relationship to cyclin D1.* Blood, 1996. **88**(1): p. 268-76.
85. Pinyol, M., et al., *Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis.* Blood, 2007. **109**(12): p. 5422-9.
86. Oyama, T., et al., *Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast.* Cancer Res, 1998. **58**(13): p. 2876-80.

87. Zukerberg, L.R., et al., *Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene*. *Mod Pathol*, 1995. **8**(5): p. 560-7.
88. Quintanilla-Martinez, L., et al., *Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor*. *Am J Pathol*, 1998. **153**(1): p. 175-82.
89. Chiarle, R., et al., *Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2000. **95**(2): p. 619-26.
90. Lim, M.S., et al., *Expression of Skp2, a p27(Kip1) ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: correlation with p27(Kip1) and proliferation index*. *Blood*, 2002. **100**(8): p. 2950-6.
91. Quintanilla-Martinez, L., et al., *Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis*. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 3181-7.
92. Weinstat-Saslow, D., et al., *Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions*. *Nat Med*, 1995. **1**(12): p. 1257-60.
93. Hinds, P.W., et al., *Function of a human cyclin gene as an oncogene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(2): p. 709-13.
94. Bodrug, S.E., et al., *Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene*. *EMBO J*, 1994. **13**(9): p. 2124-30.
95. Lovec, H., et al., *Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice*. *EMBO J*, 1994. **13**(15): p. 3487-95.
96. Kozar, K., et al., *Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins*. *Cell*, 2004. **118**(4): p. 477-91.
97. Hofmann, W.K., et al., *Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray*. *Blood*, 2001. **98**(3): p. 787-94.
98. Islam, T.C., et al., *High level of cannabinoid receptor 1, absence of regulator of G protein signalling 13 and differential expression of Cyclin D1 in mantle cell lymphoma*. *Leukemia*, 2003. **17**(9): p. 1880-90.
99. Martinez, N., et al., *The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival*. *Cancer Res*, 2003. **63**(23): p. 8226-32.
100. Ortega-Paino, E., et al., *Functionally associated targets in mantle cell lymphoma as defined by DNA microarrays and RNA interference*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1617-24.

-
101. Rizzatti, E.G., et al., *Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways*. Br J Haematol, 2005. **130**(4): p. 516-26.
 102. Thieblemont, C., et al., *Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2727-37.
 103. de Vos, S., et al., *Cell cycle alterations in the blastoid variant of mantle cell lymphoma (MCL-BV) as detected by gene expression profiling of mantle cell lymphoma (MCL) and MCL-BV*. Diagn Mol Pathol, 2003. **12**(1): p. 35-43.
 104. Ek, S., et al., *Increased expression of Ki-67 in mantle cell lymphoma is associated with de-regulation of several cell cycle regulatory components, as identified by global gene expression analysis*. Haematologica, 2004. **89**(6): p. 686-95.
 105. Zhu, Y., et al., *Investigatory and analytical approaches to differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2002. **119**(4): p. 905-15.
 106. Rinaldi, A., et al., *Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2006. **132**(3): p. 303-16.
 107. Jares, P. and E. Campo, *Advances in the understanding of mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2008.
 108. Brody, J. and R. Advani, *Treatment of mantle cell lymphoma: current approach and future directions*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **58**(3): p. 257-65.
 109. Jares, P., D. Colomer, and E. Campo, *Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 750-62.
 110. Forstpointner, R., et al., *Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG)*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4003-8.
 111. Lenz, G., et al., *Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG)*. J Clin Oncol, 2005. **23**(9): p. 1984-92.
 112. Romaguera, J.E., et al., *High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine*. J Clin Oncol, 2005. **23**(28): p. 7013-23.

113. Schulz, H., et al., *Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(9): p. 706-14.
114. Georgakis, G.V., Y. Li, and A. Younes, *The heat shock protein 90 inhibitor 17-AAG induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell lines by depleting cyclin D1, Akt, Bid and activating caspase 9*. Br J Haematol, 2006. **135**(1): p. 68-71.
115. Goy, A., et al., *Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(4): p. 667-75.
116. Kawamata, N., J. Chen, and H.P. Koeffler, *Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; vorinostat) suppresses translation of cyclin D1 in mantle cell lymphoma cells*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2667-73.
117. Kouroukis, C.T., et al., *Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 2003. **21**(9): p. 1740-5.
118. O'Connor, O.A., et al., *Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(4): p. 676-84.
119. Park, I.W., et al., *Evaluation of novel cell cycle inhibitors in mantle cell lymphoma*. Oncogene, 2007. **26**(38): p. 5635-42.
120. Venkataraman, G., et al., *Induction of apoptosis and down regulation of cell cycle proteins in mantle cell lymphoma by flavopiridol treatment*. Leuk Res, 2006. **30**(11): p. 1377-84.
121. Witzig, T.E., et al., *Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(23): p. 5347-56.
122. Yee, K.W., et al., *Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(17): p. 5165-73.
123. Haritunians, T., et al., *Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(2): p. 333-9.
124. Perez-Galan, P., et al., *The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4441-9.
125. Weigert, O., et al., *Sequence-dependent synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(3): p. 524-8.

126. Yazbeck, V.Y., et al., *Temsirolimus downregulates p21 without altering cyclin D1 expression and induces autophagy and synergizes with vorinostat in mantle cell lymphoma*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(4): p. 443-50.
127. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
128. Waterhouse, P.M., M.B. Wang, and T. Lough, *Gene silencing as an adaptive defence against viruses*. *Nature*, 2001. **411**(6839): p. 834-42.
129. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
130. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
131. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. *RNA*, 2004. **10**(2): p. 185-91.
132. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
133. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. *Genes Dev*, 2002. **16**(6): p. 720-8.
134. Nykanen, A., B. Haley, and P.D. Zamore, *ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway*. *Cell*, 2001. **107**(3): p. 309-21.
135. Martinez, J., et al., *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. *Cell*, 2002. **110**(5): p. 563-74.
136. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. *Dev Biol*, 1999. **216**(2): p. 671-80.
137. Song, J.J., et al., *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity*. *Science*, 2004. **305**(5689): p. 1434-7.
138. Meister, G. and T. Tuschl, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 343-9.
139. Saxena, S., Z.O. Jonsson, and A. Dutta, *Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(45): p. 44312-9.
140. Caplen, N.J., et al., *Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference*. *Mol Ther*, 2002. **6**(2): p. 243-51.

141. Ngo, H., et al., *Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14687-92.
142. Sanchez Alvarado, A. and P.A. Newmark, *Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5049-54.
143. Wianny, F. and M. Zernicka-Goetz, *Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 70-5.
144. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
145. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
146. Kawasaki, H. and K. Taira, *Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 700-7.
147. McManus, M.T., et al., *Gene silencing using micro-RNA designed hairpins*. RNA, 2002. **8**(6): p. 842-50.
148. Sui, G., et al., *A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5515-20.
149. Yu, J.Y., S.L. DeRuijter, and D.L. Turner, *RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6047-52.
150. Miyagishi, M. and K. Taira, *U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(5): p. 497-500.
151. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. Science, 2002. **296**(5567): p. 550-3.
152. Paddison, P.J., et al., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. Genes Dev, 2002. **16**(8): p. 948-58.
153. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
154. Lewis, P., M. Hensel, and M. Emerman, *Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle*. EMBO J, 1992. **11**(8): p. 3053-8.
155. Weinberg, J.B., et al., *Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1477-82.

156. Roe, T., et al., *Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis*. EMBO J, 1993. **12**(5): p. 2099-108.
157. Bukrinsky, M.I., et al., *A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 666-9.
158. Lewis, P.F. and M. Emerman, *Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 510-6.
159. Buchschacher, G.L., Jr. and F. Wong-Staal, *Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2499-504.
160. Kim, V.N., et al., *Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 811-6.
161. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 871-5.
162. Naldini, L., et al., *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11382-8.
163. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
164. Naviaux, R.K., et al., *The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 5701-5.
165. Miyoshi, H., et al., *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8150-7.
166. Lois, C., et al., *Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors*. Science, 2002. **295**(5556): p. 868-72.
167. Zennou, V., et al., *HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap*. Cell, 2000. **101**(2): p. 173-85.
168. Schorpp, M., et al., *The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(9): p. 1787-8.
169. Zufferey, R., et al., *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 2886-92.
170. Doms, R.W., et al., *Human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus env proteins possess a functionally conserved assembly domain*. J Virol, 1990. **64**(7): p. 3537-40.

171. Burns, J.C., et al., *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8033-7.
172. Yee, J.K., et al., *A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(20): p. 9564-8.
173. *siDESIGN® Center*, Dharmacon,
<http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>.
174. *BLOCK-iT™ RNAi Designer*, Invitrogen,
<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=sirna&pid=5130662534313683663>.
175. *siMAX™ Design-Software*, Eurofins MWG Operon,
<http://www.eurofinsdna.com/de/products-services/sirna-synthese/sirna-design.html>.
176. Salaverria, I., et al., *Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives*. Haematologica, 2006. **91**(1): p. 11-6.
177. Jadayel, D.M., et al., *Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519)*. Leukemia, 1997. **11**(1): p. 64-72.
178. Peng, H.W., et al., *Establishment and characterization of a new human lymphoma-derived cell line--HBL-2*. Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi, 1985. **18**(2): p. 79-85.
179. Jeon, H.J., et al., *Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line*. Br J Haematol, 1998. **102**(5): p. 1323-6.
180. Melo, J.V., et al., *Two new cell lines from B-prolymphocytic leukaemia: characterization by morphology, immunological markers, karyotype and Ig gene rearrangement*. Int J Cancer, 1986. **38**(4): p. 531-8.
181. Raynaud, S.D., et al., *Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclin D1 expression in B-cell malignancies*. Genes Chromosomes Cancer, 1993. **8**(2): p. 80-7.
182. M'Kacher, R., et al., *Blastoid mantle cell lymphoma: evidence for nonrandom cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) and generation of a mouse model*. Cancer Genet Cytogenet, 2003. **143**(1): p. 32-8.
183. Medeiros, L.J., Z. Estrov, and G.Z. Rassidakis, *Z-138 cell line was derived from a patient with blastoid variant mantle cell lymphoma*. Leuk Res, 2006. **30**(4): p. 497-501.

184. Koch, I., et al., *Real-time quantitative RT-PCR shows variable, assay-dependent sensitivity to formalin fixation: implications for direct comparison of transcript levels in paraffin-embedded tissues*. *Diagn Mol Pathol*, 2006. **15**(3): p. 149-56.
185. Specht, K., et al., *Identification of cyclin D1 mRNA overexpression in B-cell neoplasias by real-time reverse transcription-PCR of microdissected paraffin sections*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(9): p. 2902-11.
186. Nusse, M., et al., *Measurement of micronuclei by flow cytometry*. *Methods Cell Biol*, 1994. **42 Pt B**: p. 149-58.
187. Hui, D., et al., *Immunohistochemical detection of cdc2 is useful in predicting survival in patients with mantle cell lymphoma*. *Mod Pathol*, 2005. **18**(9): p. 1223-31.
188. Pinyol, M., et al., *Unbalanced expression of licensing DNA replication factors occurs in a subset of mantle cell lymphomas with genomic instability*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(12): p. 2768-74.
189. Bae, I., et al., *BRCA1 regulates gene expression for orderly mitotic progression*. *Cell Cycle*, 2005. **4**(11): p. 1641-66.
190. Gupta, S., et al., *Tumor suppressor pRB functions as a co-repressor of the CCAAT displacement protein (CDP/cut) to regulate cell cycle controlled histone H4 transcription*. *J Cell Physiol*, 2003. **196**(3): p. 541-56.
191. Johnstone, R.W., et al., *Functional analysis of the leukemia protein ELL: evidence for a role in the regulation of cell growth and survival*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(5): p. 1672-81.
192. Kienle, D., et al., *Quantitative gene expression deregulation in mantle-cell lymphoma: correlation with clinical and biologic factors*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(19): p. 2770-7.
193. Eguchi, T., et al., *RB silencing compromises the DNA damage-induced G2/M checkpoint and causes deregulated expression of the ECT2 oncogene*. *Oncogene*, 2007. **26**(4): p. 509-20.
194. Gray, D., et al., *Maternal embryonic leucine zipper kinase/murine protein serine-threonine kinase 38 is a promising therapeutic target for multiple cancers*. *Cancer Res*, 2005. **65**(21): p. 9751-61.
195. Simons-Evelyn, M., et al., *PBK/TOPK is a novel mitotic kinase which is upregulated in Burkitt's lymphoma and other highly proliferative malignant cells*. *Blood Cells Mol Dis*, 2001. **27**(5): p. 825-9.
196. Zhou, D., et al., *A novel crosstalk mechanism between nuclear receptor-mediated and growth factor/Ras-mediated pathways through PNRG-Grb2 interaction*. *Oncogene*, 2004. **23**(31): p. 5394-404.

197. Zhang, B., Y. Zhang, and E. Shacter, *Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(14): p. 6205-14.
198. Hoyer, K.K., et al., *An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 893-902.
199. Huang, X., et al., *Homeostatic cell-cycle control by BLYS: Induction of cell-cycle entry but not G1/S transition in opposition to p18INK4c and p27Kip1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(51): p. 17789-94.
200. Merdek, K.D., N.T. Nguyen, and D. Toksoz, *Distinct activities of the alpha-catenin family, alpha-catenin and alpha-catenin, on beta-catenin-mediated signaling*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(6): p. 2410-22.
201. Guikema, J.E., et al., *Quantitative RT-PCR analysis of activation-induced cytidine deaminase expression in tissue samples from mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia patients*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2997-8; discussion 2998-9.
202. Hayashi, R., et al., *Transcriptional regulation of human chromatin assembly factor ASF1*. DNA Cell Biol, 2007. **26**(2): p. 91-9.
203. Lee, W.Y., et al., *Alterations of metastasis-related genes identified using an oligonucleotide microarray of genistein-treated HCC1395 breast cancer cells*. Nutr Cancer, 2007. **58**(2): p. 239-46.
204. Brielmeier, M., et al., *Improving stable transfection efficiency: antioxidants dramatically improve the outgrowth of clones under dominant marker selection*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(9): p. 2082-5.
205. Ramqvist, T., et al., *Wild-type p53 induces apoptosis in a Burkitt lymphoma (BL) line that carries mutant p53*. Oncogene, 1993. **8**(6): p. 1495-500.
206. Buttgereit, P., et al., *Efficient gene transfer into lymphoma cells using adenoviral vectors combined with lipofection*. Cancer Gene Ther, 2000. **7**(8): p. 1145-55.
207. Gresch, O., et al., *New non-viral method for gene transfer into primary cells*. Methods, 2004. **33**(2): p. 151-63.
208. Schakowski, F., et al., *Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines*. Genet Vaccines Ther, 2004. **2**(1): p. 1.
209. Meeker, T.C., et al., *Adenoviral vectors efficiently target cell lines derived from selected lymphocytic malignancies, including anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin's disease*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(3): p. 357-64.
210. Turturro, F., P. Seth, and C.J. Link, Jr., *In vitro adenoviral vector p53-mediated transduction and killing correlates with expression of coxsackie-adenovirus receptor and alpha(nu)beta5 integrin in SUDHL-1 cells derived from anaplastic large-cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 185-92.

-
211. Stripecke, R., et al., *Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses*. *Blood*, 2000. **96**(4): p. 1317-26.
212. Cantwell, M.J., et al., *Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Blood*, 1996. **88**(12): p. 4676-83.
213. Huang, S., R.I. Endo, and G.R. Nemerow, *Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery*. *J Virol*, 1995. **69**(4): p. 2257-63.
214. Prince, H.M., et al., *Efficient adenovirus-mediated gene expression in malignant human plasma cells: relative lymphoid cell resistance*. *Exp Hematol*, 1998. **26**(1): p. 27-36.
215. Silver, L. and C.W. Anderson, *Interaction of human adenovirus serotype 2 with human lymphoid cells*. *Virology*, 1988. **165**(2): p. 377-87.
216. Pscherer, A., et al., *Antagonizing inactivated tumor suppressor genes and activated oncogenes by a versatile transgenesis system: application in mantle cell lymphoma*. *FASEB J*, 2006. **20**(8): p. 1188-90.
217. Inaba, T., et al., *Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes*. *Genomics*, 1992. **13**(3): p. 565-74.
218. Lam, E.W., et al., *Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3479-84.
219. Mataraza, J.M., et al., *Disruption of cyclin D3 blocks proliferation of normal B-1a cells, but loss of cyclin D3 is compensated by cyclin D2 in cyclin D3-deficient mice*. *J Immunol*, 2006. **177**(2): p. 787-95.
220. Suzuki, R., et al., *Selective usage of D-type cyclins in lymphoid malignancies*. *Leukemia*, 1999. **13**(9): p. 1335-42.
221. Jones, C.D., et al., *CyclinD1/CyclinD3 ratio by real-time PCR improves specificity for the diagnosis of mantle cell lymphoma*. *J Mol Diagn*, 2004. **6**(2): p. 84-9.
222. Ott, M.M., et al., *Cyclin D1 expression in mantle cell lymphoma is accompanied by downregulation of cyclin D3 and is not related to the proliferative activity*. *Blood*, 1997. **90**(8): p. 3154-9.
223. Tucker, C.A., et al., *Four human t(11;14)(q13;q32)-containing cell lines having classic and variant features of Mantle Cell Lymphoma*. *Leuk Res*, 2006. **30**(4): p. 449-57.
224. Malumbres, M., et al., *Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6*. *Cell*, 2004. **118**(4): p. 493-504.

-
225. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases*. Genes Dev, 2004. **18**(22): p. 2699-711.
226. Gladden, A.B., et al., *Expression of constitutively nuclear cyclin D1 in murine lymphocytes induces B-cell lymphoma*. Oncogene, 2006. **25**(7): p. 998-1007.
227. Hirt, C., et al., *Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR*. Blood, 2004. **104**(3): p. 904-5.
228. Limpens, J., et al., *Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals*. Blood, 1995. **85**(9): p. 2528-36.
229. Tagawa, H., et al., *Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM*. Oncogene, 2005. **24**(8): p. 1348-58.
230. Allen, J.E., et al., *Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization*. Br J Haematol, 2002. **116**(2): p. 291-8.
231. Bea, S., et al., *Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4365-74.
232. Bentz, M., et al., *t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **27**(3): p. 285-94.
233. Flordal Thelander, E., et al., *Detailed assessment of copy number alterations revealing homozygous deletions in 1p and 13q in mantle cell lymphoma*. Leuk Res, 2007. **31**(9): p. 1219-30.
234. Kohlhammer, H., et al., *Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions*. Blood, 2004. **104**(3): p. 795-801.
235. Rubio-Moscardo, F., et al., *Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4445-54.
236. Schraders, M., et al., *Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1686-93.
237. Nielaender, I., et al., *Partial uniparental disomy: a recurrent genetic mechanism alternative to chromosomal deletion in malignant lymphoma*. Leukemia, 2006. **20**(5): p. 904-5.
238. Fitzgibbon, J., et al., *Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9152-4.

-
239. Fernandez, V., et al., *Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6364-9.
240. Perez-Galan, P., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status*. Blood, 2006. **107**(1): p. 257-64.
241. Rudolph, C., et al., *Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. **153**(2): p. 144-50.
242. Hipp, S., et al., *Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells*. Haematologica, 2005. **90**(10): p. 1433-4.
243. Korz, C., et al., *Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4554-61.
244. Heider, U., et al., *Histone deacetylase inhibitors reduce VEGF production and induce growth suppression and apoptosis in human mantle cell lymphoma*. Eur J Haematol, 2006. **76**(1): p. 42-50.
245. Pham, L.V., et al., *Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 88-95.
246. Hurlin, P.J., et al., *Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5646-59.
247. Fox, E.J. and S.C. Wright, *The transcriptional repressor gene Mad3 is a novel target for regulation by E2F1*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 1): p. 307-13.
248. Baron, V., et al., *Antisense to the early growth response-1 gene (Egr-1) inhibits prostate tumor development in TRAMP mice*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1002**: p. 197-216.
249. Gibbs, J.D., D.A. Liebermann, and B. Hoffman, *Egr-1 abrogates the E2F-1 block in terminal myeloid differentiation and suppresses leukemia*. Oncogene, 2008. **27**(1): p. 98-106.
250. Hanissian, S.H., et al., *Regulation of myeloid leukemia factor-1 interacting protein (MLF1IP) expression in glioblastoma*. Brain Res, 2005. **1047**(1): p. 56-64.
251. Tan, Y., P. Raychaudhuri, and R.H. Costa, *Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 1007-16.

-
252. Wang, I.C., et al., *Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(24): p. 10875-94.
253. Wierstra, I. and J. Alves, *Transcription factor FOXM1c is repressed by RB and activated by cyclin D1/Cdk4*. Biol Chem, 2006. **387**(7): p. 949-62.
254. Han, J.I., et al., *RGS1 and RGS13 mRNA silencing in a human B lymphoma line enhances responsiveness to chemoattractants and impairs desensitization*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1357-68.
255. Lin, H.M., et al., *Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells*. Oncogene, 2002. **21**(52): p. 8001-10.
256. Novak, A.J., et al., *Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2247-53.
257. He, B., et al., *Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3268-79.
258. Morales, A.A., et al., *High expression of bfl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Int J Cancer, 2005. **113**(5): p. 730-7.
259. Wiesner, C., et al., *Alpha-catulin, a Rho signalling component, can regulate NF-kappaB through binding to IKK-beta, and confers resistance to apoptosis*. Oncogene, 2008. **27**(15): p. 2159-69.
260. Staudt, L.M.S.S., MD, US), Wright, George (Takoma Park, MD, US), Dave, Sandeep (Washington, DC, US), Tan, Bruce K. (Baltimore, MD, US), *Methods for identifying, diagnosing, and predicting survival of lymphomas*. 2005: United States.

PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

Publikationen

- 2008** **Klier M**, Anastasov N, Hermann A, Meindl T, Angermeier D, Raffeld M, Fend F, Quintanilla-Martinez L:
Specific lentiviral shRNA-mediated knockdown of cyclin D1 in mantle cell lymphoma has minimal effects on cell survival and reveals a regulatory circuit with cyclin D2
Leukemia (accepted for publication)
- 2006** Quintanilla-Martinez L, Pittaluga S, Miething C, **Klier M**, Rudelius M, Davies-Hill T, Anastasov N, Martinez A, Vivero A, Duyster J, Jaffe E S, Fend F, Raffeld M:
NPM-ALK-dependent expression of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma
Blood. 2006 Sep 15;108(6):2029-36
- 2004** Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, **Klier M**, Lössner U, Blüher M, Paschke R:
Serum amyloid A3 expression is stimulated by dexamethasone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes
J Endocrinol. 2004 Dec;183(3):561-7
- 2004** Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, **Klier M**, Lössner U, Blüher M, Paschke R:
Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes
Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 30;317(2):598-604
- 2004** Fasshauer M, Kralisch S, **Klier M**, Lössner U, Blüher M, Klein J, Paschke R:
Insulin resistance-inducing cytokines differentially regulate SOCS mRNA expression via growth factor- and Jak/Stat-signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes
J Endocrinol. 2004 Apr;181(1):129-38

- 2004** Fasshauer M, Kralisch S, **Klier M**, Lössner U, Blüher M, Chambaut-Guerin AM, Klein J, Paschke R:
Interleukin-6 is a positive regulator of tumor necrosis factor alpha-induced adipose-related protein in 3T3-L1 adipocytes
FEBS Lett. 2004 Feb 27;560(1-3):153-7
- 2004** Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, **Klier M**, Lössner U, Blüher M, Paschke R:
Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes
FEBS Lett. 2004 Jan 30;558(1-3):27-32
- 2003** Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Lössner U, **Klier M**, Blüher M, Paschke R:
GH is a positive regulator of tumor necrosis factor alpha-induced adipose related protein in 3T3-L1 adipocytes
J Endocrinol. 2003 Sep;178(3):523-31
- 2003** Fasshauer M, Klein J, Lössner U, **Klier M**, Kralisch S, Paschke R:
Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNFalpha, and dexamethasone
Horm Metab Res. 2003 Apr;35(4):222-7
- 2003** Fasshauer M, Kralisch S, **Klier M**, Lössner U, Blüher M, Klein J, Paschke R:
Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes
Biochem Biophys Res Commun. 2003 Feb 21;301(4):1045-50

Vorträge

- 2007** **7th Annual Symposium of the European MCL Network, Starnberg, Germany**
M. Klier, N. Anastasov, D. Angermeier, F. Fend, M. Raffeld,
L. Quintanilla-Martinez:
Functional analysis of cyclin D1 in MCL by specific lentiviral shRNA mediated knockdown

Poster

- 2007** **49th Annual Meeting of the American Society of Haematology (ASH), Atlanta, USA**
M. Klier, N. Anastasov, D. Angermeier, M. Raffeld, F. Fend,
L. Quintanilla-Martinez
Functional analysis of cyclin D1 in Mantle cell lymphoma by specific lentiviral shRNA mediated knockdown
- 2007** **MDC/DFKZ Summer School 2007, Berlin, Germany:**
Signal transduction & transcriptional regulation in cancer
M. Klier, N. Anastasov, D. Angermeier, F. Fend, L. Quintanilla-Martinez
Functional analysis of cyclin D1 in Mantle cell lymphoma by specific lentiviral shRNA mediated knockdown

DANKE an

Leticia Dafür, dass sie mir das Vertrauen zurückgebracht hat, dass es für Doktoranden nicht nur schlechte Betreuer gibt. Für ihre Unterstützung und ihr Mut-Machen zu jeder Zeit und ihre immerwährende Bereitschaft, Probleme zu lösen anstatt falschen Druck aufzubauen, kurzum, einfach dafür, dass sie eine Anwärtlerin auf den Titel „Großartigste Betreuerin der Welt“ ist.

Prof. Martin Hrabé de Angelis Dafür, dass er sich als Betreuer zur Verfügung gestellt hat und mich damit bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt.

Nataša Dafür, dass sie die Basis für diese Arbeit gelegt hat und wir uns in diesen drei Jahren immer gegenseitig geholfen haben.

Daniela Für ihre tollen Western Blots und für alles, was wir innerhalb und außerhalb des Labors gemeinsam erleben durften.

Irina Fürs eifrige Korrekturlesen und für die Tatsache, dass ich mich schon jetzt auf die weitere Team-Arbeit in Tübingen freue.

Uli Für ihre unterstützende Arbeit und ihr großartiges Organisations-Talent, beides werde ich nebst ihr selbst in Tübingen sehr vermissen.

Sara, Ilaria, Natalia, Misu, Madhavi, Christian, Elke, Evi, Therésè, Claudia K., Nadine, Eleonore, Jaqueline, Natalie, Manuela, Daniela, Claudia B., Bahar, Iria, Michael, Christine, Jan, Nina, Mike, Gaby, Sandra K., Sandra R., Axel, Karin, Uli, Frau Jennen, Herrn Hutzler, Julia, Ilona, Şükrije, Frau Trostl, Elena, Olesya, Saida, Lotte, Frau Svensson, Frau di Grazia und Herrn Schäfer

Dafür, dass es dank ihnen allen Spaß machte, in diesem Institut zu arbeiten, dass immer gegenseitige Hilfe da war, dass ich mit ihnen viele schöne wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Erlebnisse teilen durfte, dass fast immer eine meinem Wesen entgegenkommende italienische Fröhlichkeit in der Luft lag und dass ich teilweise wunderbare Freundschaften über das Labor hinaus gefunden habe.

- Martin** Für die großartige Zusammenarbeit mit ihm hinsichtlich der Arrays und die immer unverzüglich gelieferten Daten.
- Andrea** Für das gemeinsame Ausharren vor dem Cell Sorter.
- Tom** Für die Zusammenarbeit hinsichtlich der Zellzyklus-Studien.
- Ina, Julia und Klara** Für die Versorgung mit Taqman-Assays und weiterem und für den wissenschaftlichen Austausch in den „Fend-Besprechungen“
- Prof. Fend** Für jegliche Unterstützung, sei es durch seine guten Kritiken oder durch das Korrekturlesen dieser Arbeit und des Papers.
- Mark** Für das Korrekturlesen des Papers und den guten, wissenschaftlichen Austausch in Atlanta.
- Meinen Eltern und meinen beiden Schwestern** Fürs Mit-Freuen, Mit-Hoffen, Mit-Zittern und Mit-Leiden zu jeder Zeit.
Und meinen Eltern natürlich fürs Mit-Finanzieren!
- Michael** Dafür, dass es ihn für mich gibt.