
TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

Bedeutung von Cyclin D1 mRNA Varianten beim multiplen Myelom

Bianca Julia Slotta-Huspenina

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. Fend,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
(schriftliche Beurteilung)
Priv.-Doz. Dr. Q. Martinez de Fend
(mündliche Prüfung)
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel
3. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel

Die Dissertation wurde am 19.05.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.2010 angenommen.

**Meinem Ehemann Stefan
und Kindern Paul und Niklas**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Das multiple Myelom	8
1.1.1 Definition	8
1.1.2 Epidemiologie, Ätiologie und Klinik	8
1.1.3 Diagnostik und Therapie	10
1.1.4 Pathogenese	12
1.1.5 Anomalien des Karyotypes	15
1.1.6 Cyclin D1 beim multiplen Myelom	17
1.2 Das Zellzyklusgen Cyclin D1	18
1.2.1 Funktionen von Cyclin D1	18
1.2.2 Struktur von Cyclin D1 Gen und Protein	20
1.2.3 Entstehung und Bedeutung von Cyclin D1 mRNA Varianten	21
1.2.3.1 Lange und kurze Cyclin D1 alpha (a)mRNA	23
1.2.3.2 Cyclin D1 beta mRNA	25
1.2.4 Rolle von Cyclin D1 bei B-Non Hodgkin Lymphomen	27
2. Zielsetzung der Arbeit	28
3. Materialien und Methoden	29
3.1 Zelllinien	29
3.2 Gewebematerial	30
3.3 Methoden	31
3.3.1 Zellkultur	31
3.3.1.1 Auftauen und Kultivieren von Zellen	31
3.3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl und Einfrieren von Zellen	31
3.3.1.3 Herstellung von Paraffin-Zellblocks	31
3.3.2 Histologische und immunhistochemische Analysen	32
3.3.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten	32

3.3.2.2	Histologische Standardfärbungen	32
3.3.2.3	Immunhistochemische Färbungen	32
3.3.3	Mikrodissektion	33
3.3.3.1	Laser Capture Mikrodissektion (LCM)	33
3.3.3.2	Manuelle Mikrodissektion	34
3.3.4	Molekularbiologische Methoden	34
3.3.4.1	Methoden zur RNA-Analyse	34
3.3.4.1.1	Arbeiten mit RNA	34
3.3.4.1.2	Isolierung von RNA aus humanen Zelllinien	34
3.3.4.1.3	Isolierung von RNA aus Paraffinmaterial	34
3.3.4.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit der UV Spektroskopie	35
3.3.4.1.5	Reverse Transkription	35
3.3.4.2	Methoden zur DNA-Analyse	36
3.3.4.2.1	Aufbereitung von Paraffinmaterial	36
3.3.4.2.2	Die Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.3.4.2.3	Quantitative PCR (TaqMan)	37
3.3.4.2.3.1	Prinzip	37
3.3.4.2.3.2	Absolute Quantifizierung mit Standardkurve	38
3.3.4.2.3.3	Relative Quantifizierung mit $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode	39
3.3.4.2.3.4	PCR Bedingungen	40
3.3.4.2.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	41
3.3.4.2.5	Sequenzierung von PCR Produkten	42
3.3.4.2.6	Interphase-FISH auf Paraffinschnitten	43
3.3.4.3	Proteinchemische Methoden-Western Blot	43
3.3.5	Statistische Analysen	44
4.	Ergebnisse	45
4.1	Allgemeines	45
4.1.1	Design variantenspezifischer Cyclin D1 qRT-PCR Assays	45
4.1.1.1	Spezifität und Sensitivität	49
4.1.1.2	Effizienz	50
4.1.2	Etablierung der genomischen qPCR	51

4.2	Besonderheiten bei der Etablierung von Taqman Assays im formalinfixierten paraffineingebetteten Material	53
4.2.1	CT-Differenzen in nativem und FFPE Material	55
4.2.2	Berechnung von Korrekturfaktoren	59
4.2.3	Weitere untersuchte mögliche Einflussfaktoren	63
4.2.3.1	Expressionshöhe eines Gens	63
4.2.3.2	Einfluss der RNA-Isolierungsmethode	65
4.2.3.3	Länge und Adenosingehalt des Amplifikats	66
4.2.3.4	Zeitdauer bis zur Fixierung des Gewebes	68
4.2.3.5	Zeitdauer des Proteinase K Verdaus	69
4.2.3.6	EDTA-Entkalkung	71
4.3	Expression von Cyclin D1 mRNA Varianten	72
4.3.1	Auswahl der Primärtumoren	72
4.3.2	Bestimmung eines Schwellenwertes	72
4.3.3	CyD1 mRNA Expressionshöhe der Myelome	73
4.3.4	Immunhistochemische Ergebnisse	73
4.3.4.1	Cyclin D1 Expression	74
4.3.4.2	Proliferationsaktivität	75
4.3.5	Zytogenetische Alterationen	76
4.3.6	Expression der 3'UTR defizienten CyD1a mRNA	78
4.3.6.1	Lymphomzelllinien	79
4.3.6.2	CyD1+Kontrollgewebe	81
4.3.6.3	CyD1+Myelome (Primärtumore)	82
4.3.6.4	Korrelation mit Zytogenetik und CyD1mRNA Gesamtexpression	86
4.3.6.5	Korrelation mit der Proliferationsrate	88
4.3.6.6	Korrelation mit der Überlebenszeit	90
4.3.7	Genomische Alterationen des CyD1-3'UTR Lokus	91
4.3.7.1	Genomische qRT-PCR	91
4.3.7.2	Sequenzierung des CyD1 3'UTR-Lokus	94
4.3.8	Expression der Spleißvariante CyD1b mRNA	95
4.3.8.1	Lymphomzelllinien	95
4.3.8.2	CyD1+ Kontrollgewebe	96
4.3.8.3	CyD1+Myelome (Primärtumore)	96

4.3.8.4	Korrelation mit dem Genotyp A870G	96
4.3.8.5	Korrelation mit der Proliferationsrate	99
4.3.9	Morphologie (Bartl-Klassifikation)	100
5.	Diskussion	102
5.1	Besonderheiten bei der Etablierung von TaqMan Assays im FFPE Material	102
5.2	Expression von Cyclin D1 mRNA Varianten	107
6.	Zusammenfassung	113
7.	Literaturverzeichnis	114
8.	Anhang	130
8.1	Materialien	130
8.1.1	Chemikalien und biochemische Reagentien	130
8.1.2	Puffer und Lösungen	131
8.1.3	Kits und Reaktionssysteme	131
8.1.4	Enzyme	131
8.1.5	Antikörper	132
8.1.6	Verbrauchsmaterialien	132
8.1.7	Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen	132
8.1.8	Geräte	133
8.1.9	Oligonukleotide (Primer und Sonden)	134
8.1.10	Plasmide	136
8.2	Verzeichnis der Abkürzungen	137
8.3	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	139
8.4	Veröffentlichungen	141
	Danksagung	143

1. Einleitung

1.1 Das multiple Myelom

1.1.1 Definition

Das **multiple Myelom** (MM, Morbus Kahler) ist ein aggressives B-Non-Hodgkin Lymphom und gehört zum Formenkreis der Plasmazellneoplasien. Diese sind charakterisiert durch eine klonale Plasmazellproliferation und gehen in der großen Mehrzahl der Fälle mit der Bildung eines Paraproteins einher. Für die Diagnose eines MM wird die Erfüllung folgender drei Minimal Kriterien gefordert:

1. Vorhandensein von mehr als 10% atypischen Plasmazellen und/oder histologisch eine „myelomtypische“ Plasmazellverteilung im Knochenmark.
2. Vorhandensein von klinischen Zeichen, wie beispielsweise Knochenschmerzen, Anämie, B-Symptomen, Hyperkalzämie oder Niereninsuffizienz.
3. Vorhandensein von mindestens einer der drei folgenden Veränderungen:
monoklonales Protein im Serum (>3 g/dl)
und/oder monoklonales Protein im Urin
und/oder Vorhandensein von osteolytischen Knochenläsionen.

1.1.2 Epidemiologie, Ätiologie und Klinik

Nach Inzidenzraten des Surveillance, Epidemiology and End Result (SEER)-Programms des National Cancer Instituts der USA macht das MM 1% aller malignen Erkrankungen in der weißen Bevölkerung (Kaukasier) und etwa 2 % in der farbigen Bevölkerung aus. Unter den lymphoretikulären Neoplasien macht das MM 13% bei Kaukasier und 31% bei Afroamerikanern aus. Die jährliche Inzidenzrate liegt bei 4,7/ 100.000 bei Männern und bei 3,2/ 100.000 bei Frauen (Kaukasier) bzw. bei 10,7 oder 6,7/ 100.000 (Farbige). Die mittlere jährliche Inzidenzrate steigt mit dem Alter an (Erkrankungsgipfel in der 8. Lebensdekade). Während die Mortalitätsrate zwischen 1950 und 1988 dramatisch angestiegen ist, kam es in den letzten 20 Jahren zu einer Stabilisierung.

Das MM ist eine bislang unheilbare Erkrankung. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Weißen bei 26,3% und bei Farbigen bei 28,3%, mit einem relativ höheren Überleben bei Frauen als bei Männern (29,3% vs 27,5% für Farbige, 27,5% vs 25,0% für Weiße) (Ries et al 1991).

Als Vorläuferläsion ist die **monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS)** beschrieben. Die MGUS ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von monoklonalen Immunglobulinen im Blut und einer Plasmozytose des Knochenmarks, wobei die Plasmazellen einen Anteil von 10% der kernhaltigen Knochenmarkstromazellen definitionsgemäß nicht überschreiten. Die MGUS hat eine altersabhängige Inzidenzrate (4-5% bei >80-jährigen). Bei 10-30% der Fälle geht das MGUS innerhalb von 10 Jahren in ein multiples Myelom oder ein anderes B-NHL über.

Epidemiologische Studien lassen vermuten, dass eine chronische Antigenstimulation des Immunsystems (z.B. durch bakterielle oder virale Erkrankungen, Immunisierungen, Allergien oder Autoimmunstörungen) bei der Entstehung des MGUS bzw. des MM eine Rolle spielen könnte (Bourguet et al 1993). Von den bisher vielen untersuchten möglichen exogenen Faktoren ist die Strahlenexposition am besten belegt (Shimizu et al 1990, Darby et al 1987, Boice et al 1985). Daneben wurden die landwirtschaftsbezogene Exposition mit Pestiziden (Davis et al 1990) sowie die Einnahme verschiedener Medikamente (Phenytoin, Phenobarbital, Diazepam, Propanolol, Ibuprofen, Erytromycin, Chlorpheniramin, Gentamicinsulfat, Sulfamethoxazol, Terpinhydrat) (Selby et al 1989) wiederholt als mögliche ätiologische Faktoren genannt. Obwohl über eine familiäre Häufung des MM berichtet wurde, ist nicht von einer hereditären Erkrankung auszugehen.

Der Erkrankungsbeginn ist bei den meisten Patienten symptomlos. Das MM durchläuft typischerweise drei Erkrankungsstadien: Im ersten Stadium (inaktive Phase) besteht eine Infiltration des Knochenmarks mit reifen, nicht proliferierenden Plasmazellen. Es sind meist keine Krankheitssymptome vorhanden. Im zweiten Stadium (aktive Phase) nimmt der Anteil der proliferierenden unreifen Plasmazellen (Plasmablasten) im Knochenmark kontinuierlich zu. Es bestehen meist unspezifische Erkrankungssymptome. Im dritten Stadium (fulminante Phase) kommt es zur extramedullären Ausbreitung der meist undifferenzierten proliferierenden Plasmazellblasten (Hallek et al 1998). In diesem Stadium sind die typischen Symptome der Erkrankung vorhanden (siehe Abbildung 1).

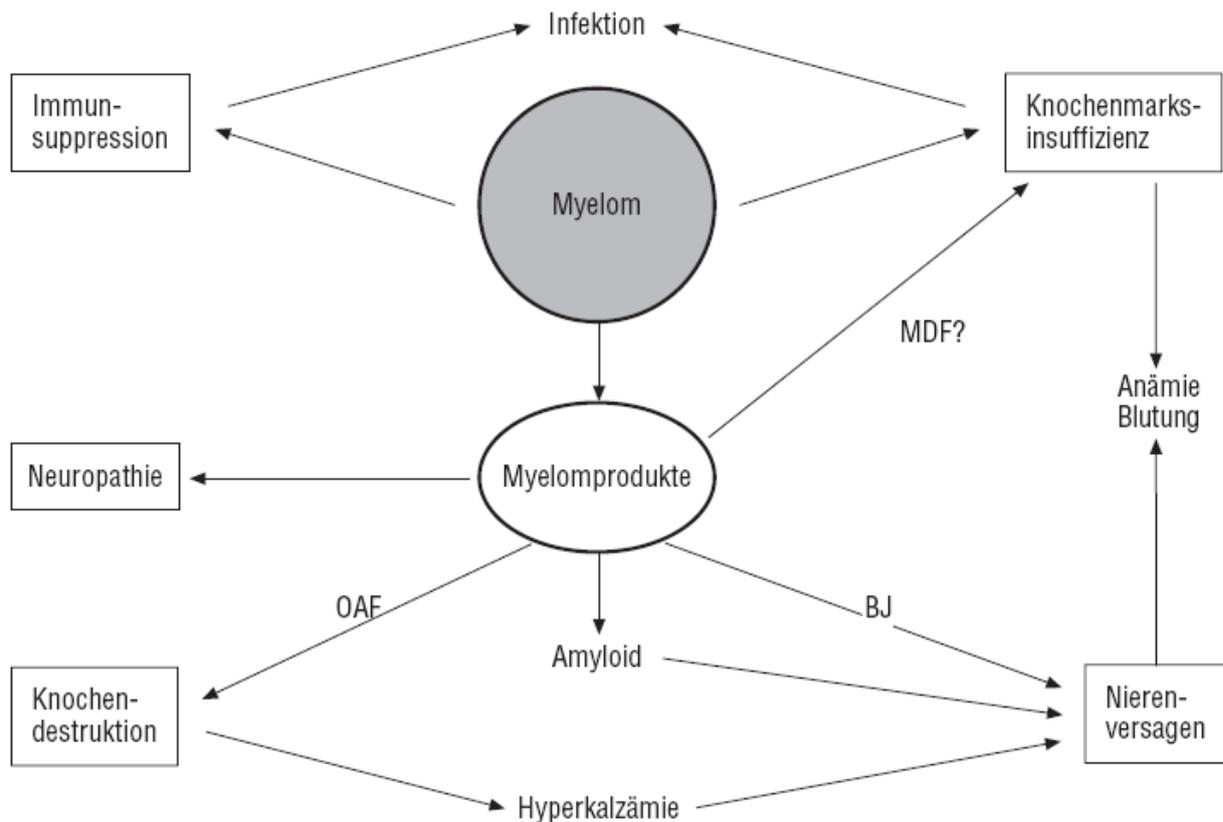


Abbildung 1: Klinische Symptome und Komplikationen beim multiplen Myelom (Bartl et al 1986). Steigende Tumorzellmasse im KM führt zu einer KM-Insuffizienz mit Anämie und Immunsuppression. Die von den Myelomzellen in Massen produzierten Immunglobuline (Ig) können bei Ausscheidung von Bence Jones Proteinen (BJ) über die Niere zu einem Nierenversagen führen. Des Weiteren können die Ig eine Neuropathie verursachen. Weitere von den Myelomzellen sezernierte Produkte wie der Osteoklasten-aktivierende Faktor (OAF) sowie der Myelopoiesis-depressing-Faktor (MDF) führen zu einer Knochendestruktion bzw. KM-Insuffizienz. Das durch die Knochendestruktion freiwerdende Kalzium schädigt zusätzlich zum Amyloid und Bence Jones Protein (BJ) die Nieren.

1.1.3 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik des MM beruht auf der Beurteilung der klinischen Symptomatik, der Proteinchemie mit qualitativer und quantitativer Bestimmung der Immunglobuline in Serum und Urin, auf bildgebenden Verfahren (Röntgen, Computertomografie, Magnetresonanztomografie, Knochendichtemessung) sowie auf der pathologischen Knochenmark (KM)-Diagnostik. Die KM-Diagnostik ist für die definitive Beurteilung über das Vorliegen eines MM nach wie vor ausschlaggebend und umfasst üblicherweise eine

Beckenkamm-Biopsie und mehrere Aspirationen für Zytologie und andere Techniken (Immunzytologie, Zytogenetik und Molekulargenetik). Bei der histologischen Beurteilung der KM-Biopsien werden fünf morphologische Hauptkriterien beurteilt: Quantitative, qualitative und histotopographische Anomalien der Plasmazellen, Veränderungen der Hämatopoese und des Knochenmarkstromas sowie des Knochens. Es werden morphologisch sechs verschiedene Zelltypen (Typ 1 bis 6) unterschieden und die Erkrankung je nach dominierendem Zelltyp nach Bartl (Bartl, et al. 1987) in drei prognostische unterschiedliche Grade (Bartl Grad I, II und III) klassifiziert (siehe Abbildung 2):

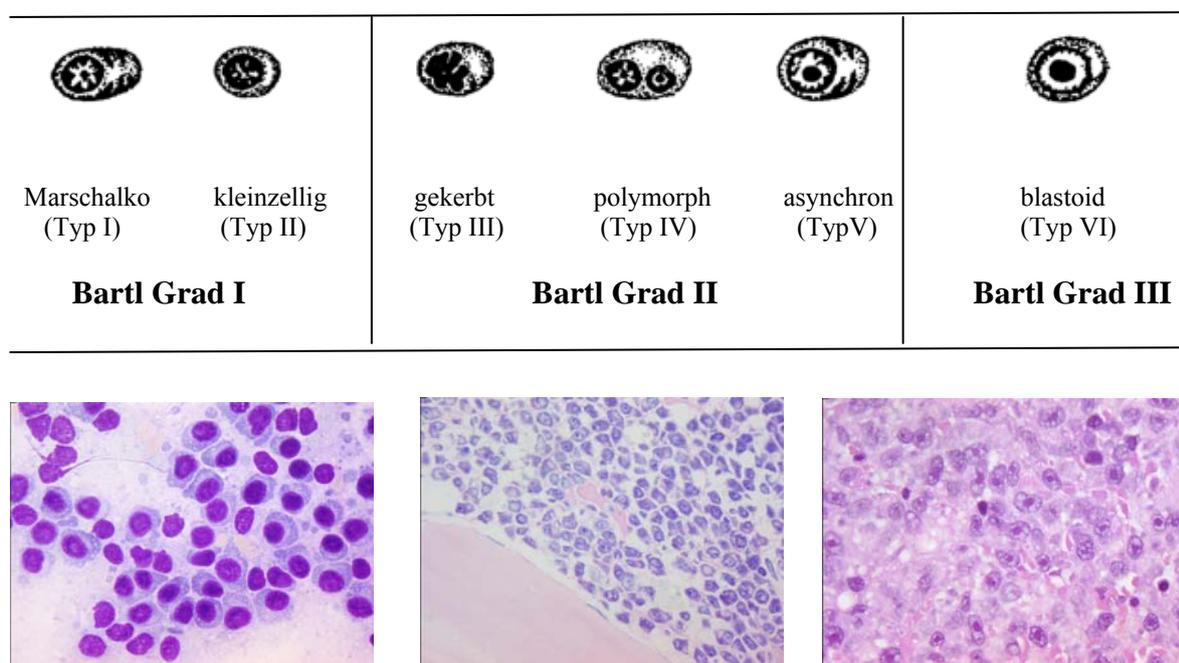


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Myelom-Zelltypen und Histologie.

Oben: Einteilung der Myelomzellen nach dem zytologischen Erscheinungsbild in Zelltypen (Typ 1-6) und prognostische Grade (Bartl Grad I-III). Zelltypen 1 und 2 entsprechen Bartl Grad I, Zelltypen 3, 4 und 5 entsprechen Bartl Grad II und Zelltyp 6 entspricht Bartl Grad III. Unten: HE-gefärbte Myelome.

Das multiple Myelom (MM) ist bislang eine mit konventioneller Therapie unheilbare Erkrankung. Während in den frühen Erkrankungsstadien in der Regel keine Therapie durchgeführt wird, steht in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien die palliative Therapie mit symptomatischer Linderung der Beschwerden im Vordergrund. Die Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Knochenmark,- oder Blutstammzelltransplantation stellt eine potentielle kurative Therapie dar, die zu einer kompletten Remission über mehrere Jahre führen kann (Child et al 2003, Gertz et al 2006). Diese aggressive Therapieform wird

allerdings aufgrund der hohen therapiebedingten Mortalität nur bei jüngeren Patienten (unter 65-70 Jahren) in gutem Allgemeinzustand empfohlen. Die Patienten, welche nicht für eine Hochdosistherapie in Frage kommen, werden mit einer Chemotherapie in Standarddosierung (konventionelle Chemotherapie) behandelt.

Weitere eingesetzte Substanzen wie z.B. Thalidomid und andere immunmodulatorische Substanzen (z.B. Revlimid) sind vor allem gegen das Zusammenspiel zwischen Myelomzellen und Knochenmarkstroma gerichtet. Proteasomen-Inhibitoren (z.B. Bortezomib) können über eine Stabilisierung von Zellzyklusregulatoren zum Zellzyklusarrest zur Apoptose von Myelomzellen beitragen. Weitere zielgerichtete Therapeutika werden in experimentellen Zelllinien-Modellen, präklinischen und klinischen Studien getestet.

1.1.4 Pathogenese

Das MM ist ein malignes Non-Hodgkin-Lymphom, welches auf der malignen Entartung und Wucherung von terminal ausdifferenzierten B-Zellen beruht. Die Ursprungszelle des Myelomzellklons ist bislang nicht bekannt. Myelomzellen exprimieren reife Plasmazellmarker (CD138⁺⁺, CD 38⁺⁺, CD45⁻) und ähneln somit phänotypisch reifen langlebigen Plasmazellen. Auch die genomischen Umlagerungen der Immunglobulin (Ig) Schwereketten (H) und Leichtketten (L) Gene, wie sie beim normalen Reifungsprozess zu langlebigen Plasmazellen vorkommen, haben in Myelomzellen stattgefunden (Bakkus et al 1995). Daraus kann gefolgert werden, dass die Reifungsprozesse zur Plasmazelle durch onkogene Ereignisse nicht gestört werden oder dass die onkogenen Ereignisse erst nach den Reifungsprozessen auftreten.

Die Tumorentstehung und Progression des intramedullären zum extramedullären Myelom ist begleitet von sequenziellen genetischen Ereignissen, wobei die zeitliche Abfolge zum Teil bekannt ist (siehe Abbildung 3). Nach Immortalisierung der Plasmazelle durch diese genetischen Ereignisse hängt die Etablierung und das Überleben der Myelomzellen im Knochenmark von der Gegenwart von Wachstumsfaktoren ab, welche auch physiologischerweise die Proliferation, Differenzierung und Funktion lymphohämatopoetischer Zellen regulieren (Klein et al 1995). Wachstumsfaktoren binden dabei an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und bewirken über eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden eine biologische Antwort. Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) ist ein zentraler Wachstumsfaktor für die Myelomzellen, es wird überwiegend von den Knochenmarkstromazellen gebildet (parakrin), kann aber auch von Myelomzellen selbst

produziert werden (autokrin). Während IL-6 das Wachstum frisch isolierter Myelomzellen in vitro stimuliert, wird dieses durch IL-6 Antagonisten gehemmt. Ebenso zeigte die Behandlung von MM-Patienten mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 zytostatische Wirkung (Akira et al 1993).

Es werden von IL-6 zwei wesentliche Signaltransduktionswege aktiviert: der Ras-MAPK (**R**at sarcoma-**M**itogen aktivierte **P**rotein **K**inase) und der JAK/STAT (**J**anus **K**inase/**S**ignal**T**ransduktoren und **A**ktivatoren der **T**ranskription)-Signaltransduktionsweg. Die Aktivierung des Ras-MAPK-Signalweges durch IL-6 ist von gesicherter Bedeutung für die Pathogenese des MM und bewirkt eine proliferationsfördernde Wirkung in der Phase der Etablierung (Schaeffer et al 2001). Die Bedeutung der Aktivierung des JAK/STAT Signalweges für die Pathogenese des MM ist Gegenstand aktueller Studien (Quintanilla-Martinez et al 2003). Im weiteren Verlauf der Erkrankung akquirieren die Tumorzellen weitere genomische Alterationen, die ihnen ein wachstumsfaktor-unabhängiges Wachstum erlauben, so dass die Tumorzellen das Knochenmark verlassen können. Insbesondere aktivierende Ras-Mutation und FGFR3 Mutationen werden mit der Entkopplung der Myelomzellen vom Knochenmark und der extramedullären Ausbreitung in Zusammenhang gebracht (Bezieau et al 2001). Veränderungen der Tumorsuppressorgene p16, p18 und p53 sowie aktivierende c-myc Translokationen treten meist erst in späten Erkrankungsphasen auf und kennzeichnen das extramedulläre MM.

1. Einleitung

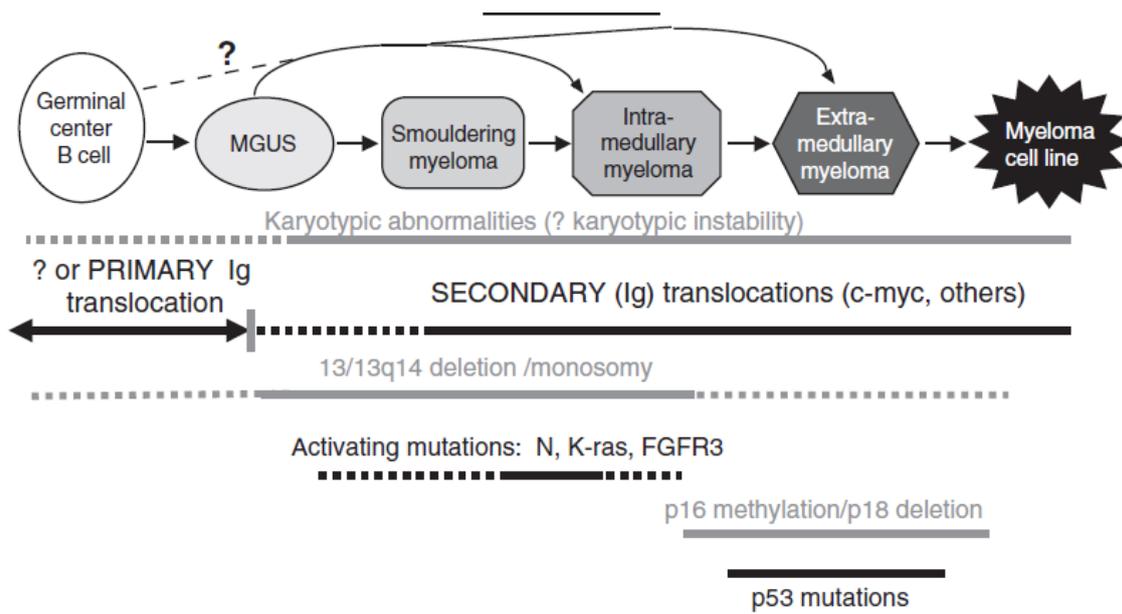


Abbildung 3: Genetische Ereignisse in der Pathogenese der Plasmazellneoplasien.
(Bergsagel et al 2003).

1.1.5 Anomalien des Karyotypes

Das MM zeigt im Gegensatz zu vielen anderen Lymphomen und Leukämien keine einzelne krankheitsspezifische chromosomale Anomalie, sondern eine Anzahl verschiedener rekurrerender Alterationen. Insgesamt lassen sich Veränderungen des Karyotyps bei 89-96% der MM nachweisen (Drach et al 1995).

Das MM kann hinsichtlich vorhandener Chromosomenanomalien in zwei unterschiedliche Tumorgruppen, in hypodiploide/pseudodiploide und hyperdiploide Tumoren eingeteilt werden (Bergsagel et al 2005). Hypodiploide Tumoren (etwa die Hälfte der MM) sind gekennzeichnet durch das Auftreten von primären Translokationen unter Einbezug des Immunglobulin-Schwerketten Gens (Chromosom 14) und Deregulation eines Onkogens auf dem Partnerchromosom. Als regelmäßige Partner sind dabei die fünf folgenden Loci (Gene) in angegebener Häufigkeit betroffen: 16% Chromosom 11q13 (Cyclin D1), 15% Chromosom 4p16.3 (FGFR 3, MMSET), 5% Chromosom 16q23 (c-maf), 3% Chromosom 6p21 (Cyclin D3) und 2% Chromosom 20q12 (MAFB). Die Inzidenz der Ig(H) Translokationen ist vom Stadium der Erkrankung abhängig. Während Ig(H) Translokationen bei 44-48% der MGUS Fälle und 55-73% der intramedullären Myelome diagnostiziert werden, sind diese bei >68% der fortgeschrittenen MM nachweisbar (Bergsagel et al 2001). Humane Myelom-Zelllinien, die aufgrund des knochenmarksunabhängigen Wachstums meist erst in finalen MM Stadien etabliert werden können, verfügen sogar zu >90% über Ig(H) Translokationen (Chng et al 2007). Die hyperdiploiden Myelome hingegen sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein von multiplen Chromosomen-Trisomien (meist Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15 und 19). Bei einem kleineren Teil der Fälle können daneben auch IgH-Translokationen gefunden werden. Obwohl Plasmazellneoplasien üblicherweise eine geringe proliferative Aktivität haben, konnte mittels Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass so gut wie alle Myelome eine Deregulation eines D-Typ Cyclins aufweisen. Diese steht z.T. direkt, z.T. indirekt in Zusammenhang mit den bereits genannten genetischen Alterationen. Basierend auf dem Vorhandensein von Translokationen und der Expression der D-Typ Cycline wurde die so genannte TC- Klassifikation (translocation /cyclin D) vorgeschlagen, welche die MM in acht Gruppen einteilt (Bergsagel et al 2005). Interessanterweise unterscheiden sich diese Gruppen nicht nur im Phänotyp und dem Genexpressionsmuster der Tumorzellen, sondern zeigen typische prognostisch bedeutsame biologische und klinische Merkmale (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 :TC-Klassifikation (Bergsagel et al 2005)

Gruppe	Häufigkeit (%)	Translokation	Partnerchromosom	Gen auf	D1-Typ Cyclin	Ploidie	Proliferation	Knochenbeteiligung	Prognose
6p21	3	6p21	D3	D3	hypo	mittel	100	Gut	
11q13	16	11q13	D1	D1	hypo	mittel	94	Gut	
D1	34	-	-	D1	hyper	niedrig	86	Gut	
D1 + D2	6	-	-	D1 + D2	hyper	hoch	100	Schlecht	
D2	17	-	-	D2	hypo, hyper	mittel	67	?	
-	2	-	-	-	hypo	mittel	100	Gut	
4p16	15	4p16	FGFR3/MMSET	D2	hypo	mittel	57	Schlecht	
maf	5	6q23	c-maf	D2	hypo	hoch	55	Schlecht	
	2	20q11	mafB		hypo				

1.1.6 Cyclin D1 beim multiplen Myelom

Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, zeigen ca. 50% der MM eine Überexpression von Cyclin D1, welches in normalen Plasmazellen nicht nachweisbar ist (Furukawa et al, 2000). Im Gegensatz zum Mantelzell-Lymphom, einer anderen B-Zell-Neoplasie mit aberranter Cyclin D1 Expression, kann die Translokation t(11;14) nur bei ca. 30% der D1+Myelome (TC Klassifikation Gruppe 11q13) nachgewiesen werden. Die Translokation t(11; 14)(q13; q32) bewirkt die Juxtaposition des starken regulatorischen Immunglobulin-Ig(H) Enhancers auf Chromosom 14q32 mit dem Cyclin D1 Lokus auf Chromosom 11q13, wodurch Cyclin D1 aktiviert und exprimiert wird. Obwohl die Bruchpunkte auf Chromosom 11 meist mehr als 120 kB vom Cyclin D1 Gen entfernt liegen (telomerwärts), scheint Cyclin D1 das Zielgen der t(11;14) zu sein, da eine eindeutige Assoziation zwischen der Translokation t(11;14) und der Überexpression von Cyclin D1 besteht (Akiyama et al 1994, Specht et al 2004). Bei der Mehrzahl der D1+Myelome ohne vorhandene Translokation (TC Klassifikation Gruppe D1 und D1+D2) kann eine Polysomie von Chromosom 11 nachgewiesen werden (Specht et al 2004, Slotta-Huspenina et al 2008) Diese bewirkt möglicherweise über einen Gen-Dosis-Effekt die Überexpression von Cyclin D1. Ob das in mehreren Kopien vorliegende Cyclin D1 Gen tatsächlich die aberrante D1mRNA, -und Proteinexpression erklären kann, oder ob andere mit der Polysomie 11 assoziierte bisher unbekannte Mechanismen ursächlich beteiligt sind, ist unklar. Auf einen bisher unbekanntem Cyclin D1- aktivierendem Mechanismus deutet eine Studie hin, die eine Reihe von D1+ Myelomen ohne Translokation t(11; 14) oder Polysomie 11 beschrieben haben (Agnelli et al, 2005). Obwohl die Rolle von Cyclin D1 als ein proliferationsförderndes Onkogen mehrfach beschrieben wurde, scheint die Überexpression von Cyclin D1 beim Myelom nicht generell mit einer höheren Proliferationsrate der Tumorzellen einherzugehen. Im Gegenteil konnte gezeigt werden, dass Cyclin D1+ Myelome paradoxerweise eine geringere Proliferationsaktivität aufweisen als Myelome ohne Cyclin D1 Expression (Fonseca et al 2002, Wilson et al 2001). Im Gegensatz zu älteren Studien, die das Vorhandensein der Translokation t(11;14) bzw. die Expression des Cyclin D1 Proteins mit einer schlechten klinischen Prognose assoziierten (Fonseca et al 1998, Hoechtlen-Vollmar et al 2000), oder solche, die keine Assoziation mit der Prognose fanden (Rasmussen et al 2001), belegen aktuelle Studien einen eindeutigen prognostischen Vorteil von MM-Patienten mit vorhandener Translokation t(11;14) gegenüber Patienten ohne t(11;14) (Avet-Loiseau et al 2001, Moreau et al 2002, Gertz et al 2005). Darüber hinaus wurde interessanterweise gezeigt, dass die Überexpression von Cylin D1 beim MM unabhängig von der zugrunde liegenden genetischen Alterationen ein prognostisch günstiger

Faktor ist (Cook et al 2006, Soverini et al 2003). Diese klinischen Beobachtungen deuten darauf hin, dass Cyclin D1 bei der Tumorigenese des MM eine komplexe Rolle spielt, und die mechanistische Betrachtung von Cyclin D1 als proliferationsförderndes Onkogen nicht zulässig ist. Eine mögliche Ursache für den fehlenden Proliferationsstimulus von Cyclin D1 beim multiplen Myelom könnte das Fehlen einer adäquaten Expression der cyclinabhängigen-Kinase-4 (Ely et al 2005) sein.

1.2 Das Zellzyklusgen Cyclin D1

Cyclin D1 gehört zur Gruppe der Cyclin-Gene. Diese kodieren für Proteine, die klassischerweise als die „Motoren des Zellzyklus“ verstanden werden. Der Zellzyklus setzt sich aus vier definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammen: Der G1,- S,- G2,- und M-Phase. Das Fortschreiten der Zelle durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus wird an bestimmten Kontrollpunkten (sog. Restriktionspunkten) reguliert, wobei der Übergang in die nächste Phase durch Expression von Cyclinen beschleunigt werden kann (Donjerkovic et al 2000). Cyclin D1 reguliert den cdk-abhängigen Übergang der G1 in die S-Phase (Motokura et al 1993).

1.2.1 Funktionen von Cyclin D1

Nach mitogener Stimulierung aus dem Extrazellarraum assoziiert Cyclin D1 mit seinen katalytischen Untereinheiten, den cyclinabhängigen-Kinasen 4 und 6 (**cyclin dependent kinases**, cdk). Diese werden dadurch aktiviert und phosphorylieren das Protein **Retinblastom** (Rb). Das phosphorylierte Rb-Protein gibt den Transkriptionsfaktor **Elongationsfaktor 2F** (E2F) frei, wodurch der Übergang zur S-Phase des Zellzyklus eingeleitet wird (Baldin et al 1993) (siehe Abbildung 4).

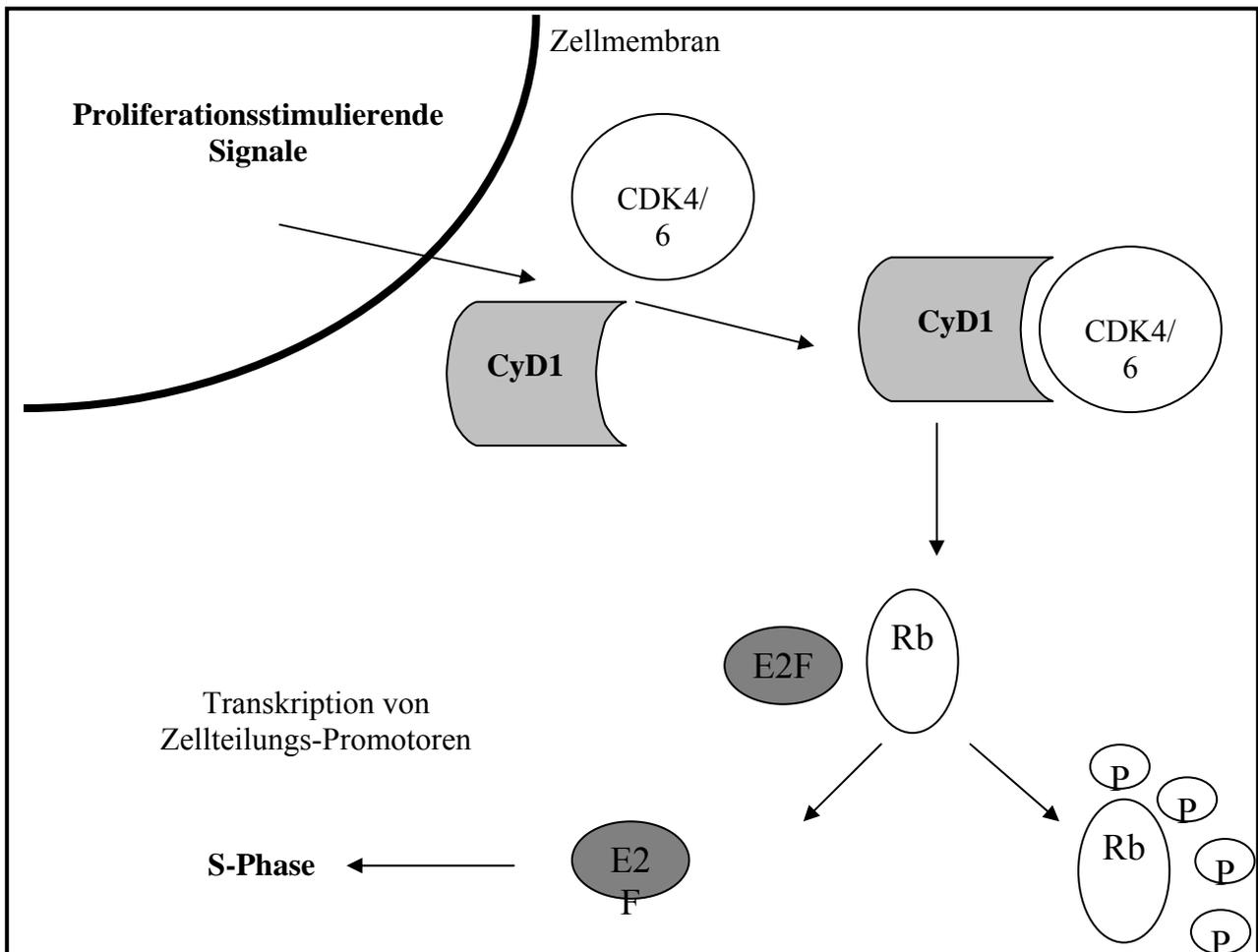


Abbildung 4: CDK-abhängige Funktion von Cyclin D1 (CyD1)

Neben der Assoziation mit cyclinabhängigen Kinasen wurden cdk-unabhängige Funktionen von Cyclin D1 beschrieben. So wurde gezeigt, dass Cyclin D1 den Zellzyklusinhibitor p27Kip1 bindet und möglicherweise inaktiviert (Quintanilla-Martinez et al 2002). Außerdem assoziiert Cyclin D1 mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren wie z.B. B-myb und C/EPB β und agiert so möglicherweise als transkriptioneller Cofaktor (Horstmann et al 2000, McMahon et al 1999). Desweiteren bindet Cyclin D1 an eine Vielzahl von Zellkern-Rezeptoren (Androgen-, Östrogen-, und Schilddrüsenhormonrezeptoren) (Knudsen et al 1999, Reutens et al 2001, Zwijsen et al 1997, Adnane et al 1999).

Die Entdeckung dieser neuen Bindungspartner deutete darauf hin, dass Cyclin D1 nicht nur über den cdk/Rb-Weg, sondern möglicherweise auch über andere Mechanismen zur Tumorigenese beiträgt. Obwohl Cyclin D1 als Onkogen betrachtet wird, reicht eine exogene Expression von

Cyclin D1 für die Transformation von lymphatischen Zellen nicht aus. Transgene Mäuse mit exogener Überexpression von Wildtyp-Cyclin D1 zeigen keine erhöhte Inzidenz von malignen Lymphomen, solange nicht ein weiteres Onkogen, wie z.B. c-myc dereguliert ist (Bodrug et al 1994). Interessanterweise führt die forcierte Überexpression von Cyclin D1 in verschiedenen Zellkulturmodellen zu unterschiedlichen Resultaten. Das Spektrum der Veränderungen reicht dabei von einem verkürztem Zellzyklus mit erhöhter Tumorigenität bis hin zu Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion (Atadja et al 1995, Imoto et al 1997, Han et al 1995, Jiang et al 1993, Duquesne et al 2001). Diese teils paradoxe Wirkung scheint vom Zelltyp und der Höhe der Cyclin D1 Expression abhängig zu sein.

1.2.2 Struktur von Cyclin D1 Gen und Protein

Das Cyclin D1 Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 11 (11q13) lokalisiert und erstreckt sich über 13,7 kb. Es wurde erstmals 1984 im Zusammenhang mit der Klonierung von Bruchpunkten der Translokation t(11;14) bei einem damals als chronisch lymphatische Leukämie diagnostizierten B-NHL als BCL-1 Gen (**B**-cell-leukemia) beschrieben (Chen et al 1995, Tsujimoto et al 1984). Wie fast alle eukaryontischen Gene ist das Cyclin D1 Gen nicht kontinuierlich aufgebaut, sondern besteht aus einer Abfolge von kodierenden Sequenzen (Exons) und nicht kodierenden Sequenzen (Introns). Die Struktur des Cyclin D1 Genes ist in Abbildung 5 grafisch dargestellt

Cyclin D1 Gen- 11q13

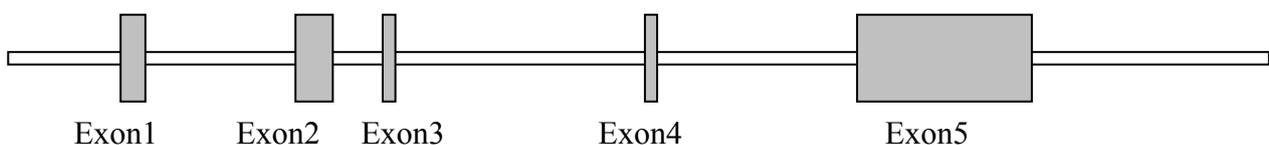


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Cyclin D1 Genes auf Chromosom 11q13. Graue Rechtecke repräsentieren kodierende Bereiche, leere Balken nicht kodierende Bereiche.

Das Cyclin D1 Gen generiert ein 295 Aminosäuren langes Protein (36 kDa). Die für die CDK-abhängigen Funktionen kodierenden Proteindomänen sind die Bindedomänen für die cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6, welche auch „Cyclin Box“ genannt werden, sowie die Bindedomäne für das Retinoblastom(Rb)-Protein (Abbildung 6). Diese funktionell wichtigen Domänen werden von Exon 1-4 kodiert.

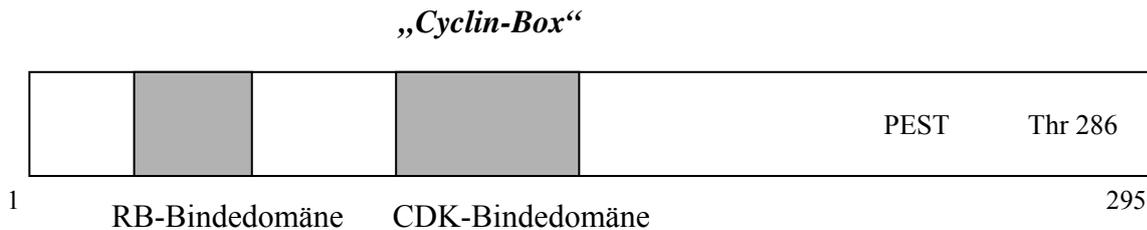


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Cyclin D1 Proteins: Grau markierte Bereiche repräsentieren wichtige funktionelle Domänen; RB: Retinoblastom, CDK: Cyclinabhängige Kinase, PEST: Sequenz bestehend aus Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin, Thr286: Aminosäure Threonin (Position 286).

Zwei von Exon 5 kodierte Domänen, die sog. PEST Sequenz (Prolin, Glutaminsäure, Serin, Threonin) und die Aminosäure Threonin an Position 286 spielen eine möglicherweise nicht unbedeutende Rolle in der Kinetik des Proteinabbaus (Alt et al 2000).

Wie andere Zellzyklusgene wird Cyclin D1 nach mitogener Stimulierung transkriptionell aktiviert und translatiert. Sowohl die mRNA als auch das Protein haben eine kurze Halbwertszeit von je max. 30 Minuten, womit die rasche Reaktion der Zelle auf mitogene Stimuli gewährleistet wird.

1.2.3 Entstehung und Bedeutung von Cyclin D1 mRNA Varianten

Ein Gen kodiert meist nicht nur für eine mRNA, sondern es können in Abhängigkeit von exogenen Signalen oder DNA-Polymorphismen unterschiedliche Transkripte generiert werden, die oft für Proteine mit dramatisch unterschiedlichen Funktionen kodieren. Die Tatsache, dass aus einem einzigen Gen verschiedenen mRNA Transkripte und Proteine entstehen können, erklärt die Vielfalt eukaryontischer Transkriptome und Proteome.

Allgemeine Grundlagen zu den physiologischen Prozessen von der DNA zur reifen mRNA sind in Abbildung 7 grafisch dargestellt.

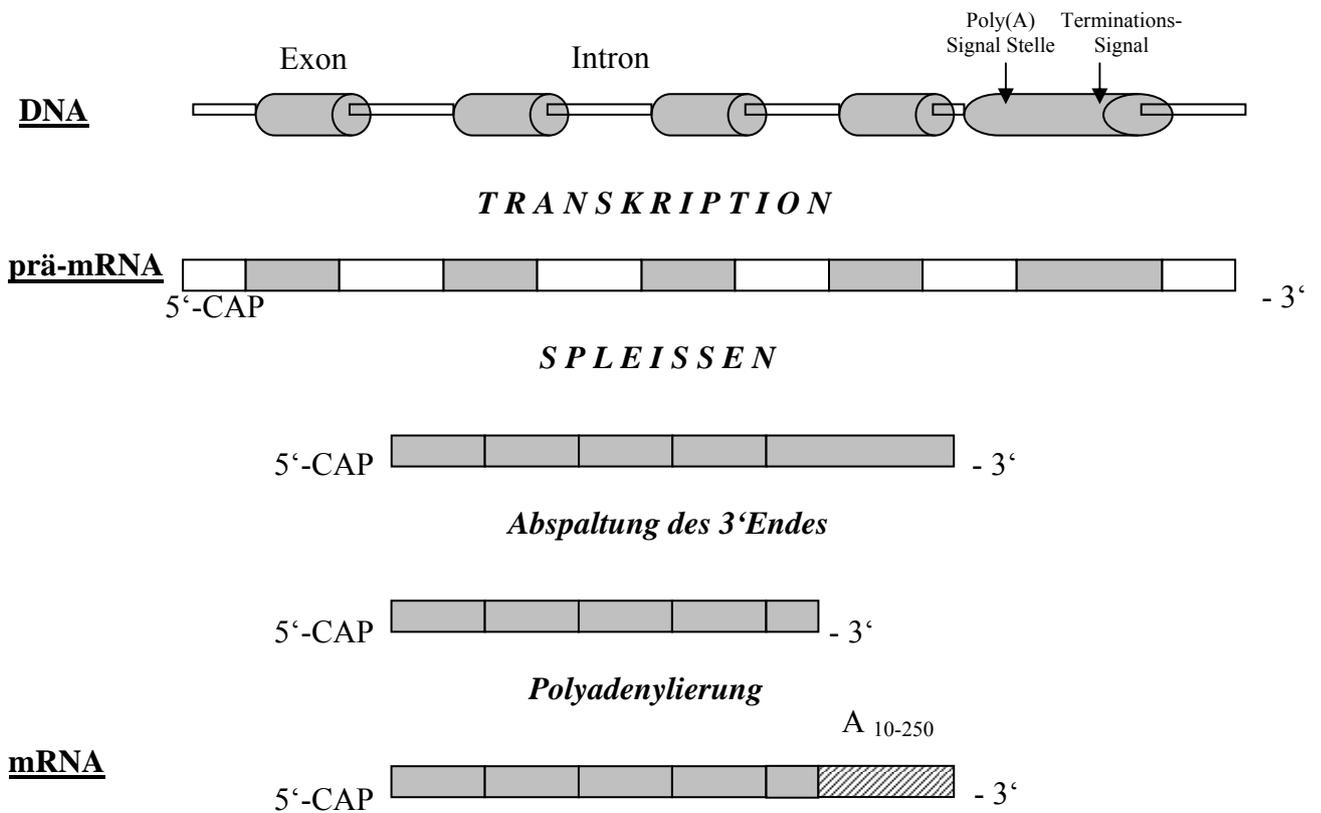


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Prozessierung von DNA zur reifen mRNA:
 Weiße Rechtecke repräsentieren Introns, graue Rechtecke Exons.

Die Transkription eines DNA Abschnittes in die prä-mRNA umfasst zunächst sowohl die kodierenden Exons wie auch die nicht kodierenden Introns. Im Verlauf der mRNA Prozessierung werden die Introns entfernt, was als konstitutives Spleißen bezeichnet wird. Neben dem konstitutiven Spleißen können durch alternatives Spleißen nicht kodierende DNA-Sequenzen (Introns) in die reife mRNA eingebaut werden. In diesen Sequenzen können Stopkodons vorhanden sein, so dass ein trunkiertes Protein mit möglicherweise veränderter Funktion entsteht. Durch Selektion unterschiedlicher Spleißstellen, die einerseits von der Nukleotidsequenz und andererseits von den Expression von Spleißfaktoren abhängt, kann so unter physiologischen Bedingungen eine Vielzahl unterschiedlicher mRNAs gebildet werden.

Die mRNA Reifungsprozesse beinhalten desweiteren das Anhängen eines Methylguanosen-Restes an das 5'Ende der mRNA (5'Cap), welcher bei der Translation als Anker für das Anheften

an die Ribosomen gilt. Nach dem „Capping“ und Spleißen folgt im Rahmen der mRNA Prozessierung das Anfügen von Polyadenylsäure-Molekülen an das 3'Ende der mRNA. Dieser 3'endständige Abschnitt wird als Poly(A)-Schwanz bezeichnet und spielt vermutlich eine Rolle bei der Stabilisierung der mRNA und der Kontrolle der Translation. Das Anfügen des Poly(A) Schwanzes ist abhängig vom Vorhandensein einer Konsensussequenz, der so genannten Poly(A) Signal-Sequenz (AAUAAA), welche sich 11 bis 30 Nukleotide vor der Stelle befindet, an der die Polyadenylierung erfolgen soll. Bei Deletion oder Mutation des AAUAAA-Hexamers kann an der vorgesehenen Stelle keine Polyadenylierung stattfinden. Umgekehrt ist es möglich, dass durch eine Mutation eine zusätzliche Poly(A) Signalsequenz generiert wird, wodurch eine verkürzte mRNA entsteht.

Es sind in der Literatur drei Cyclin D1 mRNA Varianten beschrieben, die sich z.T in der Länge und Funktion unterscheiden. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese alternativen Cyclin D1 mRNA Varianten möglicherweise eine nicht unbedeutende Rolle bei der Entstehung von Tumoren, insbesondere bei der Entstehung von malignen Lymphomen spielen könnten (Wang et al 2006, Pettigrew et al 2008, Pajares et al 2007).

1.2.3.1 Lange und kurze Cyclin D1 alpha (a)mRNA

Die unter physiologischen Bedingungen prädominant vorhandene mRNA ist die so genannte lange CyD1 alpha(a)mRNA, welche 4,5 kB lang ist und aus fünf aufeinander folgenden Exons besteht. Das Exon 5 beinhaltet an seinem 3'Ende eine 3 kB lange nicht translatierte Region (3' untranslated region, UTR). Neben diesem 4,5 kB langem „Standardtranskript“ deuteten Northern-Blot Daten von Mantelzelllymphomen bzw. B-Zell-Lymphom- Zelllinien aus den Jahren 1992 bzw. 1994 auf das Vorhandensein einer kurzen mRNA Variante mit einer Länge von 1,5 kB hin (Seto et al 1992, Lebwohl et al 1994). Diese kurze CyD1 a mRNA besteht aus Exon 1 bis 5, es fehlen jedoch weite Anteile der 3'UTR. Da die kodierenden Bereiche vollständig enthalten sind, wird aus der CyD1 a mRNA ein normales 36 kDa schweres voll funktionstüchtiges normales CyD1 Protein generiert. Daher nimmt man an, dass jegliche biologischen Konsequenzen, die mit der vermehrten Expression dieser kurzen trunkierten Cyclin D1 Variante einhergehen, begründet sind durch eine veränderte mRNA-Kinetik. In der Tat enthält die 3'untranslatierte Region Adenin und Thymidin-reiche Elemente (ARE), welche eine wichtige Rolle beim Abbau der mRNA spielen. Untersuchungen deuten darauf hin, dass mRNA Moleküle, denen diese ARE fehlen eine höhere Stabilität und somit eine höhere Halbwertszeit haben (Lebwohl et al 1994).

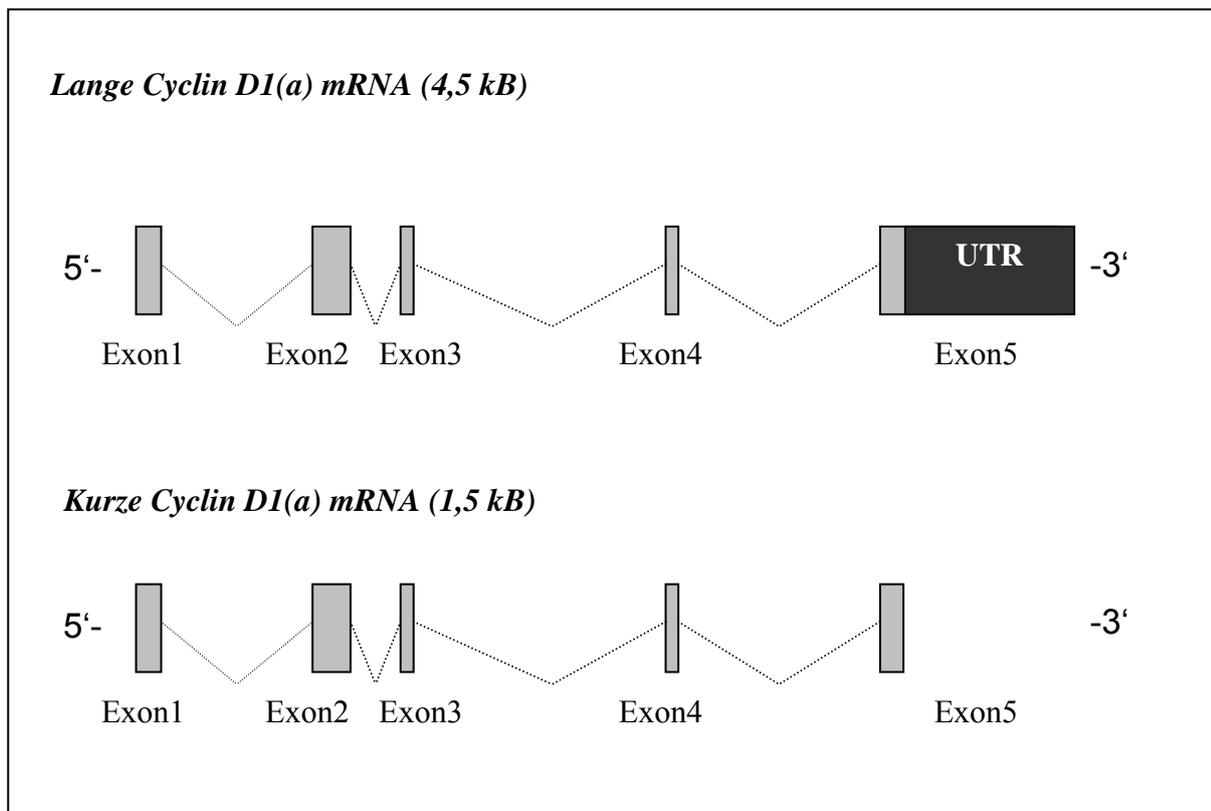


Abbildung 8: Schematische Darstellung der langen und kurzen Cyclin D1 alpha(a) mRNA. Graue Rechtecke repräsentieren Exons, schwarzes Rechteck stellt die 3'untranslatierte Region (UTR) von Exon 5 dar.

1.2.3.2 Cyclin D1 beta mRNA

Neben der eben beschriebenen 3'UTR defizienten CyD1a mRNA ist eine weitere trunkierte mRNA, die so genannte CyD1 beta(b) mRNA beschrieben. Diese entsteht aufgrund eines alternativen Spleißmechanismus am Übergang von Exon 4 zu Intron 4, wobei ein Teil des Intron 4 in der reifen mRNA verbleibt (Abbildung 9).

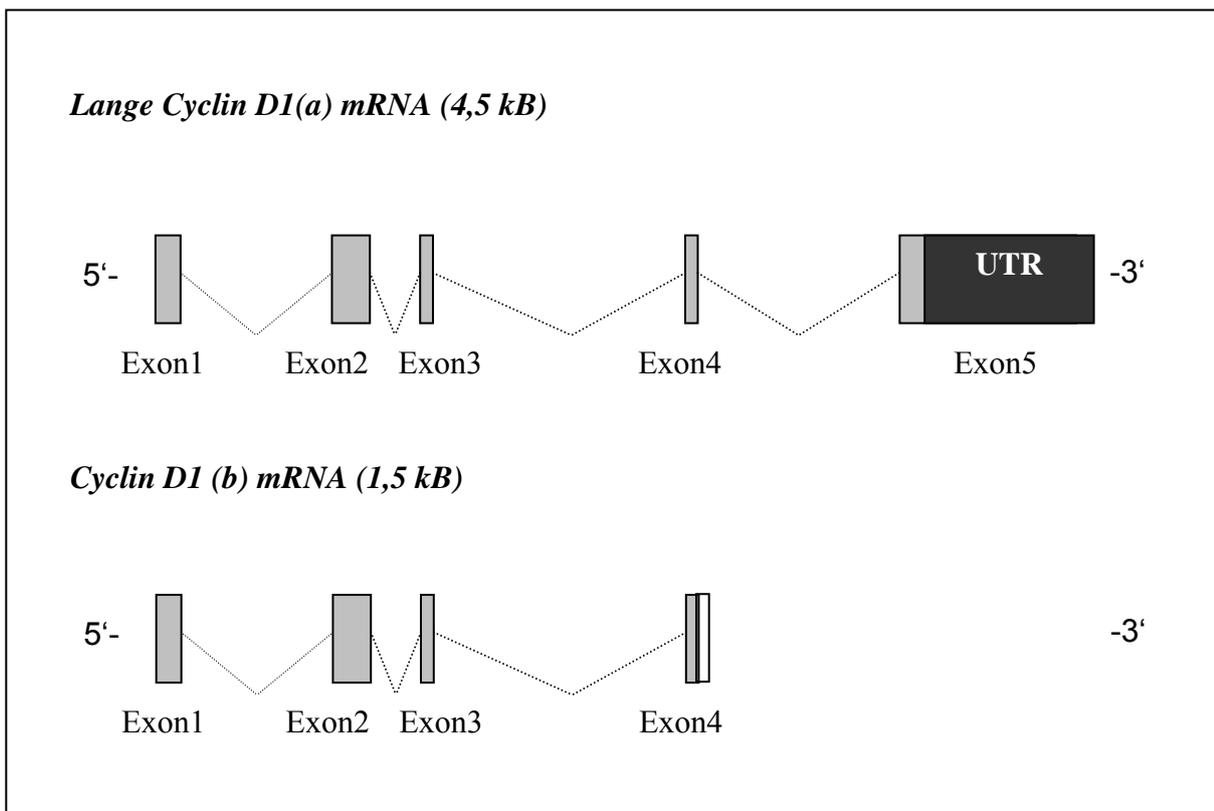


Abbildung 9: Schematische Darstellung der CyD1a und CyD1b mRNA.

Graue Rechtecke repräsentieren Exons, weißes Rechteck stellt einen Anteil von Intron 4 dar.

Da sich im Intron vier nach 79 Bp ein klassisches Translationsstop-Signal befindetet, wird von der Spleißvariante CyD1b mRNA ein trunkiertes 34 kDa schweres CyD1 Protein translatiert. Es enthält die zwei wichtigsten für die cdk-abhängigen Funktionen kodierenden Proteindomänen (cdk-, -und Rb-Bindedomäne), es fehlen aber die von Exon 5 kodierte PEST Sequenz sowie die GSK-3-beta Phosphorylierungsstelle (Threonin 286). Während der PEST Sequenz eine Rolle beim Proteinabbau zugesprochen wird (Dragnev et al 2001), ist die Phosphorylierungsstelle Threonin 286 in den nukleären Export des Cyclin D1 Proteins und im proteasominduzierten Abbau beteiligt (Diehl et al 1997, Guo et al 2005, Alt et al 2000). In Transfektionsexperimenten wurde

gezeigt, dass das trunkierte CyD1 beta Protein im Zellkern akkumuliert und damit möglicherweise eine „onkogene“ CyD1 Variante darstellt (Lu et al 2003).

Überraschenderweise weist das Cyclin D1 beta Protein weder eine verlängerte Halbwertszeit auf, noch bewirkt es im Vergleich zum normalen CyD1 Protein eine verstärkte Phosphorylierung/Inaktivierung des Rb-Proteins (Solomon et al 2003). Aufgrund der Diskrepanz zwischen zunehmender onkogener Eigenschaften und unveränderter Rb-Inaktivierungskapazität wird angenommen, dass die onkogenen Eigenschaften des trunkierten CyD1 beta Proteins möglicherweise auch auf einer veränderten Regulierung der Transkription anderer Gene beruhen. An Prostatakarzinomen wurde kürzlich gezeigt, dass trunkiertes CyD1 beta Protein eine vom normalen CyD1 Protein abweichende Regulation des Androgenrezeptors aufweist, und die Expression von CyD1 beta das Tumorwachstum beeinflusst (Burd et al 2006).

Frühe Daten zeigten einen Zusammenhang zwischen der Expression der CyD1 beta mRNA mit einem Polymorphismus im Cyclin D1 Gen (A870G) an der Grenze von Exon 4 zu Intron 4 (Hosokawa et al 1999, Betticher et al 1995). Das Entstehen der CyD1 b mRNA Variante erklärt man sich dadurch, dass das Allel A an Position 870 die Spleißdonorstelle schwächt, diese nicht benutzt wird und so das Intron 4 in der mRNA verbleibt. Bisher gibt es überwiegend nur indirekte Hinweise für die Beteiligung von CyD1 b an der Pathogenese von humanen Tumoren. So konnten zahlreiche Studien zeigen, dass Personen mit homozygoten A-Allel (A870G) eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, an einem soliden malignen Tumor zu erkranken bzw. die Tumorerkrankung einen schwereren Verlauf zeigt als bei Personen die heterozygot bzw. homozygot für das G-Allel sind (Kong et al 2000, Holley et al 2001, Costea et al 2003, Wang et al 2003, Porter et al 2002, Wang et al 2002). Die Aussagen bezüglich einer Bedeutung des A870G sind jedoch nicht konsistent, da andere Studien einen Zusammenhang zwischen homozygotem G und höherer Tumorsuszeptibilität bzw. einen schwereren Verlauf einer Erkrankung aufwiesen (Dhar et al 1999, Ho-Pun-Cheung et al 2007, Jia et al 2008).

1.2.4 Rolle von Cyclin D1 bei B-Non Hodgkin Lymphomen

Genetische Ereignisse, die zur Deregulation des Zellzyklus und insbesondere des Übergangs von der G1 in die S-Phase führen, sind eine der häufigsten (Mit-)Ursachen für die Entstehung von malignen Tumoren (Diehl et al 2002). Cyclin D1 wird bei einer Vielzahl von B-Non Hodgkin-Lymphomen überexprimiert. So zeigt das **Mantelzell-Lymphom (MCL)** bei praktisch allen Fällen und das multiple Myelom und die **Haarzell-Leukämie (HCL)** bei ca. 50-65% der Fälle die Überexpression von Cyclin D1. Aufgrund der nicht gänzlich verstandenen Rolle von Cyclin D1 in der Genese von B-Zell-Lymphomen haben die bisher wenig untersuchten CyD1 mRNA Varianten neues Interesse erlangt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Untergruppe von D1+Mantelzelllymphomen ausschließlich 3'UTR defiziente CyD1a mRNA exprimiert und diese Untergruppe sich durch hohe Cyclin D1 Expressionsspiegel, eine hohe „Proliferationssignatur“ und eine schlechte klinische Prognose auszeichnet (Rimokh et al 1994, Rosenwald et al 2003). Als Ursachen konnten hierfür einerseits eine genomische Deletionen und andererseits Mutationen in der UTR, die zu alternativen Polyadenylierungssignalstellen führen, gefunden werden (Wiestner et al 2007). Wenige andere Studien haben die Rolle der CyD1b mRNA bei Lymphomen untersucht. So konnte beim Mantelzell-Lymphom weder ein Einfluss des A870G Polymorphismus noch der Expressionshöhe von CyD1b mRNA auf das Überleben der Patienten gefunden werden (Krieger et al 2006, Wang et al 2006).

Insbesondere die Beobachtungen beim Mantelzell-Lymphom haben der Frage nach der biologischen Relevanz der Cyclin D1 mRNA Varianten bei Cyclin D1 exprimierenden multiplen Myelom neue Aktualität verliehen.

2. Zielsetzung der Arbeit

50% der primären multiplen Myelome weisen eine aberrante Expression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 auf. Obwohl Cyclin D1 klassischerweise als proliferationsförderndes Protein verstanden wird, geht die Expression von Cyclin D1 beim Myelom nicht mit einer höheren Proliferationsrate einher. Paradoxe Weise haben Myelome mit Cyclin D1 Expression eine bessere klinische Prognose als Myelome ohne Cyclin D1 Expression. Im Hinblick auf die möglicherweise komplexe Bedeutung von Cyclin D1 ist die Frage nach der Expression der Cyclin D1 mRNA Varianten besonders interessant. Literaturdaten weisen darauf hin, dass die sog. kurze Cyclin D1a mRNA, welcher die 3'untranslatierten Region (3'UTR) fehlt, gegenüber der Cyclin D1a mRNA Standardvariante eine längere Halbwertszeit aufweist und stabiler ist. Eine weitere kurze CyD1mRNA, die sog. Cyclin D1b mRNA, enthält aufgrund eines alternativen Spleißens Anteile von Intron 4. Da das Intron 4 ein klassisches Stop-Codon enthält, wird von der CyD1b mRNA ein trunkiertes Cyclin D1 Protein generiert, welchem die von Exon 5 kodierten Bereiche fehlen. Literaturdaten deuten darauf hin, dass das CyD1 b Protein gegenüber dem CyD1 a Protein eine z.T. abweichende Funktion und Kinetik haben könnte. In dieser Arbeit wurde daher die Expressionshöhe der 3'UTR defizienten Cyclin D1 mRNA und der Spleißvariante Cyclin D1 beta mRNA an einer Serie von CyD1+multiplen Myelomen und Lymphomzelllinien bestimmt und deren mögliche tumorbiologische bzw. prognostische Relevanz untersucht. Des Weiteren wurden die genetischen Grundlagen, die möglicherweise ursächlich für die aberrante Expression der CyD1mRNA Varianten sind, analysiert.

Zur Quantifizierung der Cyclin D1 mRNA Varianten standen im nativen Zellkulturmaterial etablierte variantenspezifische TaqMan Assays zur Verfügung. Im formalinfixierten paraffineingebetteten (FFPE) Material kommt es im Vergleich zum nativen Gewebematerial grundsätzlich zu einer Effizienzmindering der Amplifikation, die sich für spezifische Amplikons unterschiedlich stark auswirken kann. Da in dieser Studie ausschließlich FFPE Primärtumormaterial verwendet werden sollte, wurde vorerst die Vergleichbarkeit der variantenspezifischen Taqman Assays im formalinfixierten Material in einem zellkulturbasierten Teilprojekt der Arbeit überprüft.

3. Materialien und Methoden

3.1 Zelllinien

In dieser Studie wurden neun humane Zelllinien mit Cyclin D1 Überexpression, davon sechs Lymphomzelllinien (zwei Myelom,- und vier Mantelzell-Lymphom-Zelllinien) und zwei humane Karzinom-Zelllinien verwendet. Zwei MM-Zelllinien ohne Cyclin D1 Überexpression wurden als Kontrollen verwendet.

Tabelle 2: Humane Zelllinien

	Erkrankung	11q13- Status	Referenz
B-Zell-Lymphom			
KMS 12-BM	MM	t(11;14)(q13;q32)	Namba et al 1989
U 266	MM	Insertion 11q, disom	Nilsson et al 1970
Jeko-1	MCL	t(11;14)(q13;q32)	Jeon et al 1998
Rec-1	MCL	t(11;14)(q13;q32)	Raynaud et al 1993
Granta 519	MCL	t(11;14)(q13;q32)	Jadayel et al 1997
JVM-2	MCL	t(11;14)(q13;q32)	Melo et al 1986
KMS 11	MM	keine Alteration	Namba et al 1989
OPM 2	MM	keine Alteration	Katagiri et al 1985
Karzinom-Zelllinien			
A 431	Plattenepithelkarzinom der Haut	11q13 Amplifikation	Giard et al 1973
HT 29	Adenokarzinom des Kolon	11q13 Amplifikation	von Kleist et al 1975

MM: multiples Myelom, MCL: Mantelzelllymphom; BM: bone marrow; t: Translokation;

3.2 Gewebematerial

Studienfälle

Für die Studie wurde das Archivregister des Instituts für Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München (TUM) und der Pathologie der Universität Innsbruck nach Gewebe von Patienten, bei denen ein multiples Myelom diagnostiziert wurde, durchsucht. Es konnten 103 Paraffinblöcke von 98 Patienten mit diagnostiziertem multiplem Myelom als Studienfälle verwendet werden. Davon waren 75 Knochenmarkstanzen und 28 osteolytische Läsionen, die zwischen 1994 und 2004 einerseits zu diagnostischen Zwecken und andererseits im Rahmen eines operativen Eingriffes gewonnen wurden. Einige der osteolytischen Läsionen waren bereits Gegenstand anderer Studien (Fend et al 2003, Specht et al 2004). Voraussetzung zur Verwendung der Knochenmarksbiopsien war eine Tumorzellinfiltration mit einem Mindestanteil von 20% der kernhaltigen hämatopoetischen Zellen. Hierdurch wurde die erfolgreiche Anreicherung der Plasmazellen mit Mikrodissektionsmethoden gewährleistet.

Alle für diese Studie verwendeten Gewebe wurden nach den Standardprotokollen des Institutes für Pathologie und Pathologische Anatomie in 4 %igem (v/v) gepuffertem Formalin über 24 h fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die fixierten Knochenmarkstanzen wurden vor der Paraffineinbettung zusätzlich 48 Stunden lang in gepuffertem Na-EDTA (pH 7,0) entkalkt.

Kontrollgewebe

Als Kontrollgewebe wurden 20 Gewebeblöcke ohne pathologische Befunde, davon zwei Lymphknotenbiopsien, eine Tonsille, fünf Knochenmarksbiopsien und 18 Biopsien aus dem Magen-Darm-Trakt verwendet.

Sammlung klinischer Daten

Für alle Studienfälle konnte das Geburtsdatum und das Geschlecht aus den offiziellen Befundberichten des Institutes für Pathologie und Pathologische Anatomie und der Universität Innsbruck entnommen werden. Darüber hinaus wurden für 18 Patienten mit vorhandener Translokation t(11; 14)(q13; q32) die klinischen Unterlagen eingesehen und das Datum der Erstdiagnose und die Überlebensdauer katalogisiert.

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultur

3.3.1.1 Auftauen und Kultivieren von Zellen

Kryokulturen wurden nach raschem Auftauen bei 37°C, sofortigem Waschen mit 10 ml Kulturmedium (300 x g, 5 min, 4°C) und Resuspension in 5 ml Kulturmedium in Kultur gebracht. Für die Lymphomzelllinien wurde dazu RPMI 1640 mit 15% FCS versetzt. Für die Myelom Zelllinie U266 wurde dem Medium außerdem 1mM Natriumpyruvat und 4,5 g/l Glucose zugesetzt. Die Zelllinie A 431 wurde in DMEM und die Zelllinie HT29 in McCoy's 5A Medium mit jeweils 10 % FCS kultiviert. Allen Medien wurde 50 U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre (5% CO₂) gezogen. Die Zellzahl der Suspensions-Zelllinien wurde alle 2 Tage bestimmt und auf 5×10^5 Zellen/ml mit frischem Medium eingestellt.

Für die Passagierung der Adhäsions-Zelllinien wurde der Zellrasen einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen, durch Inkubation mit Trypsin-/ EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) vom Flaschenboden abgelöst und mit 10 ml Medium gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 300 x g für 10 min wurde das Zellsediment in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen wieder in gewünschter Dichte ausgesät oder für Analysen verwendet.

3.3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl und Einfrieren von Zellen

Zellkulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, zentrifugiert, in PBS resuspendiert und gezählt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 50 µl der Zellsuspensionen mit 50 µl Trypanblau vermischt. Nach kurzer Einwirkzeit färben sich tote Zellen blau an, während lebende Zellen den sauren Farbstoff nicht stabil aufnehmen. Die Zellsuspension wurde in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Zum Einfrieren wurden Aliquots von 1×10^8 Zellen bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (80% Medium/ 10% FCS/ 10% DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 1,8 ml Kryogefäß gefüllt, und zur langsamen Abkühlung vorerst bei -20 C° für ca. 12 h gelagert, dann zur Dauerlagerung bei -196°C in einen Stickstofftank überführt.

3.3.1.3 Herstellung von Paraffin-Zellblocks

Ca. 1×10^7 Zellen wurden zentrifugiert (300 x g, 2 min, 4°C), mit 10 ml PBS (mit Ca²⁺ und

Mg²⁺) gewaschen und in 500µl humanem Plasma resuspendiert. Die Vernetzung des Plasmas mit den Zellen erfolgte durch Zugabe von 500 µl Thrombin (500 U/ml). Das Zellpellet wurde zur Agglomeration für 3-5 Minuten auf Eis gelagert. Der entstandene Zellklumpen wurde anschließend in eine Biopsiekapsel überführt und in gepuffertem Formaldehyd (4%) für 4-5 h fixiert. Anschließend wurde das Zellpellet dem Routinelabor übergeben. Dort wurde es nach weiterer Fixierung, entsprechend den Standardprotokollen des Instituts für Allgemeine und Pathologische Anatomie entwässert und in Paraffinblöcke eingebettet.

3.3.2 Histologische und immunhistochemische Analysen

3.3.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden mit einem Schlittenmikrotom 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt, in 38 °C warmem Aqua dest. gestreckt und auf SuperfrostPlus-Objektträger aufgezogen. Im Falle von RNA Analysen wurden die Paraffinschnitte in DEPC Wasser gestreckt. Die Schnitte wurden anschließend für 30 min bei 55°C im Brutschrank getrocknet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.3.2.2 Histologische Standardfärbungen

Zur Primärdiagnose dienten histologische Standard-Färbungen wie HE, Giemsa, PAS, Naphthol-AS-D-Chloroacetatesterase und Gömöri. Die Färbungen wurden vom Routinelabor nach Standardprotokollen des Institutes für Pathologie und Pathologische Anatomie durchgeführt. In einigen Fällen wurden zur Diagnosesicherung zusätzlich immunhistochemische Färbungen mit Kappa oder Lambda-Leichtketten-Antikörper und den Plasmazellmarkern CD138 oder CD56 durchgeführt.

3.3.2.3 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden vom Routinelabor nach Standardprotokollen des Institutes für Pathologie und Pathologische Anatomie durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden dazu nach der LSAB (Labeled Strept Avidin Biotin)-Methode in einem automatisierten Färbeautomaten gemäß dem für den jeweiligen Antikörper notwendigen Programm behandelt. Zum Abschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 96%, 100%) entwässert und eingedeckt.

Cyclin D1:

Es wurde der Antikörper Cyclin D1 (Klon P2D11F11) der Fa. Novocastra (Newcastle, GB) verwendet. Die Graduierung der Cyclin D1 Proteinexpression wurde folgendermaßen vorgenommen (Quintanilla-Martinez et al 2003):

+++ Positivität: starke homogene nukleäre Anfärbung von > **80 %** der Tumorzellen

++ Positivität: nukleäre Anfärbung von **20-80%** der Tumorzellen

+ Positivität: nukleäre Anfärbung von **10-19%** der Tumorzellen

Die nukleäre Anfärbung von <10 % der Tumorzellen oder rein cytoplasmatische Färbung der Tumorzellen wurde als negativ betrachtet. Als Positivkontrolle wurden angefertigte Schnittpräparate eines Lymphknotens mit Infiltraten eines CyD1+Mantelzell Lymphoms in jedem Färbvorgang mitgeführt. Darüber hinaus dienen die CyD1+Gefäßendothelien des Knochenmarkstromas als interne Positivkontrolle.

Ki67 (MIB 1):

Es wurde der Antikörper Ki67 (Klon MIB 1) der Fa. Dako (Kopenhagen, Dänemark) verwendet. Die immunhistochemische Anfärbung des Ki-67 Proteins wurde vorgenommen, um die Proliferationsaktivität der Tumorzellen zu untersuchen. Das proliferationsassoziierte Kernprotein Ki-67 ist in allen Phasen des Zellzyklus, außer in der G0 Phase, exprimiert. Eine deutliche nukleäre Anfärbung der Tumorzellen wurde als positive Färbereaktion definiert. Es wurden je Fall mindestens 300 Tumorzellen ausgezählt und der Proliferationsindex (MIB 1 positive Zellen/100 Tumorzellen) ermittelt. Als Färbekontrolle dienten Schnittpräparate von normalen Tonsillen.

3.3.3 Mikrodissektion

3.3.3.1 Laser gestützte Mikrodissektion

Mit der Laser Capture Mikrodissektion (LCM) steht eine elegante Methode zur Gewinnung von ausgewählten Zellpopulationen aus histopathologischen Schnittpräparaten zur Verfügung. Bei der LCM wird eine thermoplastische Membran, die mit einem Reaktionsgefäß verbunden sein kann, von einem Infrarot-Laser geschmolzen. Dabei verschmilzt die Membran mit der ausgewählten Zellpopulation. Aufgrund der niedrigen Energie des Infrarot-Lasers und der kaum für das Material schädlicher photochemischer Effekte, bleiben biologische Makromoleküle wie die RNA und DNA weitgehend intakt und stehen für anschließende Untersuchungen zur

Verfügung (Fend et al 2000; Fend, et al 2003; Fend and Raffeld 2000). Die Mikrodissektion wurde nach bereits publizierten Protokollen (Specht et al 2002) durchgeführt.

3.3.3.2 Manuelle Mikrodissektion

Bei Knochenmarksbiopsien mit soliden Tumordinfiltraten („packed marrow“) und bei den osteolytischen Läsionen genügte zur Anreicherung der Tumorzellen die manuelle Isolierung vom Objektträger mittels Skalpell oder Kanüle.

3.3.4 Molekularbiologische Methoden

3.3.4.1 Methoden zur RNA-Analyse

3.3.4.1.1 Arbeiten mit RNA

Zur Rehydrierung der Schnittpräparate wurde ausschließlich DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Hierzu wurde 1 ml DEPC in ein Liter destilliertes Wasser pipettiert, gemischt, für 12 Stunden inkubiert und anschließend autoklaviert. Extrahierte RNA wurde in RNase freiem Wasser aufgenommen. Es wurden ausschließlich RNase freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet.

3.3.4.1.2 Isolierung von RNA aus humanen Zelllinien

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte direkt aus kultivierten Zellen mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Es wurden für die RNA Extraktion jeweils 10^6 - 10^7 Zellen verwendet. Die RNA wurde anschließend in 22,5 μ l RNase freiem Wasser eluiert. Alle RNA-Präparationen wurden einem DNase-Verdau (RQ1 RNase-free DNase) unterzogen. Dazu wurden max. 10 μ g RNA in 16 μ l Volumen mit 2 μ l DNase Puffer und 2 μ l DNase I (1 U/ μ l) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l DNase-Stop Solution zugegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit RNase freiem Wasser auf 200 μ l aufgefüllt und zur Entfernung der Proteine einer Phenol-Chloroformextraktion unterzogen. Eine Quantitäts- und Qualitätsabschätzung der isolierten RNA erfolgte am Spektralphotometer.

3.3.4.1.3 Isolierung von RNA aus Paraffinmaterial

Zur Isolierung der RNA wurden die auf Objektträger (OT) aufgezogenen Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden die 4 bis 5 μ m dicken Schnittpräparate für 2x10 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 70%) und in DEPC Wasser für je 4 Minuten rehydriert. Die Schnitte wurden anschließend in DEPC Wasser

gewaschen. Das gewonnene Material wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200µl Lysepuffer überführt und mit 25 µl Proteinase K (20 mg/µl) bei 55° für 16h verdaut. Die RNA wurde nach bereits etabliertem und publizierten Protokollen mit Phenol/ Chloroform/Isoamylalkohol,- und anschließender Chloroform /Isoamylalkohol-Extraktion isoliert (Specht et al 2002).

Die RNA wurde mit 220 µl Isopropanol gefällt, wobei 20µg Glykogen als Träger verwendet wurde. Nach Sedimentation der Nukleinsäuren durch Zentrifugation (300 x g, 45 min, 4°C) wurde das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und einem DNase Verdau unterzogen.

3.3.4.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit der UV Spektroskopie

Die Spektroskopie wurde als Standardmethode für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren verwendet. Die RNA-Konzentration wurde durch Messen der Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) und 280 nm (A₂₈₀) mit dem Spektrophotometer Nanodrop ND-1000 bestimmt. Als Referenz diente Wasser. Die Reinheit der gemessenen Nukleinsäuren wurde durch das Verhältnis von A₂₆₀ zu A₂₈₀ abgeschätzt, da Verunreinigungen durch Proteine in der Probe bei 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen. Von einer reinen RNA kann man bei einem Verhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ von 1,8-2,0 ausgehen. Bei den meisten in der Studie analysierten RNA-Präparationen war das Verhältnis >1,8, bei einigen wenigen war das Verhältnis <1,8, aber nie unter 1,5.

3.3.4.1.5 Reverse Transkription

Von jeder Probe wurde 1 µg RNA mittels SuperScript II reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf 17,5 µl aufgefüllt und mit 250 ng Random Hexameren bei 70°C für 5 Minuten inkubiert und bei 25°C für 5 Minuten abgekühlt. Anschließend wurden 6 µl 5x RT-Puffer, 1,65µl 10mM dNTP, 3µl 0,1M DTT, 0,5µl RNase Out (10 U/µl) und 1µl SuperScript II (100 U/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 42 °C für 60 Minuten inkubiert. Die cDNA wurde anschließend mit Aqua p.a. auf 100 µl aufgefüllt und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

3.3.4.2 Methoden zur DNA-Analyse

3.3.4.2.1 Aufbereitung von Paraffinmaterial

Zur Aufbereitung des Paraffingewebes für DNA-Analysen wurden die Schnittpräparate wie unter Kapitel 3.3.3.1 beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Im Falle einer notwendigen Mikrodissektion von Tumorzellen wurde der Gewebeschnitt nach Entparaffinierung mit Hämalaun für 30 Sekunden gefärbt. Das mittels steriler Kanüle vom Objektträger gewonnene Gewebematerial wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl Proteinase K Puffer überführt und mit 5 µl Proteinase K (20 mg/µl) bei 55°C über Nacht verdaut. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 100°C gestoppt. Diese Roh-Lysate wurden direkt in die PCR Analysen eingesetzt.

3.3.4.2.2 Die Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen enthielten 1x PCR-Puffer, je 10 mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 0,2 µM Primer, 1,25 U Taq-Polymerase, 1 µl DNA-Lysat und wurden mit Wasser auf 25 µl aufgefüllt. In jeder PCR-Reaktion wurde eine Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne DNA Probe) mitgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte am Thermocycler mit beheiztem Deckel mit jeweils für das PCR-Protokoll typischen Schritten (siehe Tabellen 3 und 4).

Tabelle 3: PCR-Bedingungen für die Amplifikation des beta Globin Gens

PCR-Programm			
Zyklen	Zeit (sec)	Temperatur (°C)	Programm
1	300	94	Denaturierung
	60	94	Denaturierung
40	60	55	Hybridisierung
	60	72	Extension
1	420	72	Extension
		10	Kühlung

Sec: Sekunden, °C: Grad Celsius.

Tabelle 4: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Exon 4/Intron 4 und des 3'UTR von Cyclin D1

PCR-Programm			
Zyklen	Zeit (sec)	Temperatur (°C)	Programm
1	120	95	Denaturierung
	60	95	Denaturierung
40	30	60	Hybridisierung
	60	72	Extension
1	300	72	Extension
		10	Kühlung

Sec: Sekunden, °C: Grad Celsius.

3.3.4.2.3 Quantitative PCR (TaqMan)

3.3.4.2.3.1 Prinzip

Beim TaqMan-Verfahren wird die bei den einzelnen PCR-Zyklen entstandene Produktmenge mittels eines Fluoreszenz-Detektionssystems bestimmt, wodurch die Menge des ursprünglich eingesetzten Templates quantifiziert werden kann. Der PCR-Ansatz enthält zusätzlich zu den Primern eine Oligonukleotid-Sonde, die sich spezifisch an eine Zielsequenz zwischen den Primern anlagert. Die Sonde trägt am 5'-Ende den Reporterfarbstoff FAM und am 3'-Ende den Quencherfarbstoff TAMRA. Alternativ wurden mbg (Minor Groove Binder)-Sonden mit einem „dark quencher“ eingesetzt. Solange die Oligonukleotidsonde intakt ist, wird die

Fluoreszenzemissionsenergie des Reporterfarbstoffes auf den Quencher übertragen, wodurch eine Fluoreszenzemission unterdrückt wird.

Während der Elongationsphase eines jeden PCR-Zyklus spaltet die AmpliTaq Gold-Polymerase aufgrund ihrer 5' → 3'-Exonuklease-Aktivität die angelagerten Sondenmoleküle nahe dem 5'-Ende. Dadurch wird die Quenchung der Reporterfarbstoffes aufgehoben, so dass seine Fluoreszenz detektiert werden kann. Während jeder PCR-Runde werden weitere Sondenmoleküle gespalten. Die gemessene Zunahme der Fluoreszenz ist während der exponentiellen Phase der PCR Reaktion direkt proportional zur Menge des entstandenen Amplifikats, welches wiederum proportional zur eingesetzten Template-Menge ist. Zur Quantifizierung der Template-Konzentration in einer Probe wird die Zykluszahl bestimmt, bei der das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert, den sog. CT-Wert (**c**ycle **t**hreshold) überschreitet. Dieser Schwellenwert ist definiert als das Zehnfache der Standardabweichung der Fluoreszenzsignale in den PCR-Zyklen 3-15. Der CT-Wert ist umso niedriger, je höher die Template-Konzentration in der Probe ist. Für die Auswertung der qPCR können im Wesentlichen zwei Strategien unterschieden werden, die absolute Quantifizierung der Genexpression mit einer Standardkurve und die relative Quantifizierung mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Beide Methoden kamen in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung.

3.3.4.2.3.2 Absolute Quantifizierung mit Standardkurve

Die absolute Quantifizierung wurde zur Bestimmung der Expressionshöhe der CyD1 mRNA Varianten und der CyD1 Gesamtexpression eingesetzt. Bei der absoluten Quantifizierung werden Plasmidstandardreihen eingesetzt, die eine bekannte Kopienzahl des zu untersuchenden Gens enthalten. Anhand dieser Standardkurven kann die Kopienanzahl der zu analysierenden Proben aufgrund ihres CT-Wertes berechnet werden. Für die Erstellung der Plasmidstandardkurven wurden ausgehend von 10^6 Kopien fünf 1:10 Verdünnungen hergestellt und im 3-fachen Ansatz in die PCR-Reaktion eingesetzt. Auf diese Weise wurden für jeden Plasmidstandard drei voneinander unabhängige Standardkurven generiert, deren CT-Mittelwerte gegen den Logarithmus der Kopienanzahl aufgetragen und die Geradengleichung mittels linearer Regression erstellt (siehe Abbildung 10).

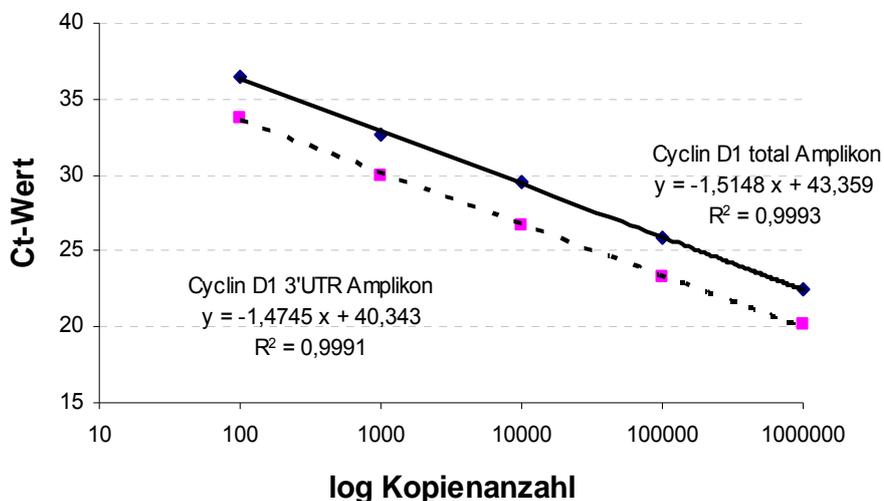


Abbildung 10: Standardkurven der Plasmidverdünnungsreihen D1 total und D1 3'UTR mit entsprechender Geradengleichung. Durchgezogene Linie: D1 total Assay; Gestrichelte Linie: D1 3'UTR Assay. Ordinate: Ct-Wert; X-Achse: log Kopienanzahl.

Möchte man nicht die kompletten Standardreihen in jeder PCR-Reaktion mitführen, ist es möglich, nur eine definierte Kopienanzahl des Standards als so genannten Kalibrator einzusetzen. Für die in dieser Studie vorgenommenen RT-PCR-Reaktionen wurden als Kalibratoren jeweils 10^6 Kopien des jeweiligen Plasmidstandards im Duplikat eingesetzt. Der Mittelwert der Ct-Werte wurde in die Geradengleichung der jeweiligen Plasmidstandardkurve eingesetzt und die Kopienanzahl berechnet. Die berechnete Kopienanzahl sollte bei gleich bleibender Effizienz der theoretisch eingesetzten Menge von 10^6 Kopien entsprechen. Abweichungen in der Effizienz der Reaktion können rechnerisch berücksichtigt werden, so dass die Kopienanzahl verschiedener PCR-Reaktionen miteinander vergleichbar blieben.

3.3.4.2.3.3 Relative Quantifizierung mit $\Delta\Delta$ CT-Methode

Die relative Quantifizierung wurde zur Bestimmung der Kopienanzahl des genomischen 3'UTR Locus des Cyclin D1 Genes verwendet. Dabei wird die Kopienanzahl eines zu untersuchenden Gens im Verhältnis zu einem internen Referenzgen und relativ zu einem Kontrollgewebe bestimmt. Referenzgene waren das SOCS Gen auf Chromosom 16 und das beta Globin Gen auf Chromosom 11, als Kontrollprobe diente eine Biopsie aus dem Magen-Darm-Trakt. Die

einzelnen PCR-Reaktionen wurden im fünffach-Ansatz durchgeführt und die entsprechenden CT-Mittelwerte in die Berechnungen eingesetzt.

Die relative Menge des Zielgens (3'UTR) im Tumormaterial in Bezug auf die Menge des Zielgens in der Kontrollprobe berechnet sich wie folgt:

$$X = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta CT (\text{Tumor}) = \text{CT-Wert Zielgen} - \text{CT-Wert Referenzgen}$$

$$\Delta CT (\text{Kontrolle}) = \text{CT-Wert Zielgen} - \text{CT-Wert Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Tumor}) - \Delta CT (\text{Kontrolle})$$

Voraussetzung für eine verlässliche Quantifizierung der Genexpression mit der $\Delta\Delta$ -CT Methode ist eine nahezu identische Effizienz der PCR-Reaktionen des Ziel-, und Referenzgens. Die Effizienz der Reaktionen kann mittels Standardverdünnungsreihen verglichen werden, indem man die Δ CT-Werte (CT Zielgen- CT Referenzgen) des Standards gegen den log der Kopienanzahl aufträgt. Ist die Steigung dieser Geraden $<0,1$, kann man von der gleichen Effizienz der PCR-Reaktionen ausgehen.

3.3.4.2.3.4 PCR Bedingungen

Die qPCR wurde mit dem qPCR core Reagents-Kit der Fa. Eurogentec in einem Reaktionsvolumen von 21-25 μ l durchgeführt. Je nach zu erwartender Expressionshöhe des untersuchten Gens wurden je 10-40 ng cDNA bzw. 10 ng DNA in die qRT-PCR eingesetzt (Tabelle 5). Nach Phenolisierung der DNA-Lysate wurde die DNA Konzentration bestimmt.

Tabelle 5: Konzentration der Primer und Sonden im Reaktionsansatz

	cDNA/ DNA (ng)	F- Primer (nM)	R- Primer (nM)	Sonde (nM)
qRT-PCR				
D1 3'UTR	10	900	900	100
D1 alpha	10	300	900	150
D1 beta	40	300	900	150
D1 total	10	900	300	200
TBP	40	900	900	200
genomische qPCR				
SOCS 1	10	900	900	200
beta Globin	10	300	300	200

F: forward, R: reverse, nM:nanoMolar

Neben den zu quantifizierenden cDNA-Proben wurden in jedem Lauf der Kalibrator (10^6 Kopien des entsprechenden Plasmids) und eine Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne cDNA Probe) mitgeführt. In allen qRT-PCR Experimenten wurden die cDNA-Proben in Duplikaten, in den genomischen qPCR Experimenten die DNA-Proben in fünf Replikaten eingesetzt. Es wurde eine 2-Schritt PCR mit der Polymerase-Aktivierung bei 95°C für 10 Minuten, 40 Zyklen Hybridisierung/Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden und Extension bei 60°C für 1 Minute, durchgeführt.

3.3.4.2.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Für die Bestimmung des Cyclin D1 Polymorphismus A870G wurde zunächst der entsprechende Genabschnitt mit der Standard-PCR amplifiziert. Die verwendeten Primersequenzen und die PCR-Bedingungen sind unter Kapitel 8.1.9 und 3.3.4.2.3.4 beschrieben. Das Amplifikationsprodukt wurde mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Zur Durchführung des Restriktionsverdauens wurden 10 µl PCR-Amplifikat mit 1µl NE II Puffer und 1,2 µl des Restriktionsenzym Nci I (20 U/µl) versetzt und 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Restriktionsenzym NCI I schneidet an der Stelle CC/GGG, so dass Fragmente mit einer Länge von 145 bp und 22 bp für das G-Allel entstehen. Ist hingegen an Position 870 ein Adenin vorhanden, kann das Restriktionsenzym nicht schneiden. Die verdauten Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV- Licht sichtbar gemacht. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes und der entsprechend hohen

3. Materialien und Methoden

Wandergeschwindigkeit des kleinsten Fragmentes (22bp) sind im gelelektrophoretischen Bild lediglich die beiden größeren Banden sichtbar.

3.3.4.2.5 Sequenzierung von PCR Produkten

Zum Nachweis von Mutationen der 3'UTR des Cyclin D1 Genes wurden zwei Genabschnitte der 3'UTR sequenziert. Zunächst wurden die entsprechenden Genabschnitte in einer Standard-PCR amplifiziert (PCR-Bedingungen und Primersequenzen siehe Kapitel 3.3.4.2.3.4 und 8.1.9). Zur Entfernung überschüssiger Primer und Verunreinigungen wurden die PCR-Produkte mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt, in 20-50 µl Elutionspuffer aufgenommen und in der nachfolgenden Sequenzierreaktion mit dem Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.1 (ABI PRISM Big Dye™ Terminator, Applied Biosystems) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 4 µl sog. „Premix“, 2,0 µl Big Dye Sequenzierpuffer, 0,25 µl (5 pmol) Primer und 7-14 µl PCR-Produkt und wurde auf 20 µl mit Aqua p.a. aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler mit folgenden Schritten durchgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6: PCR-Bedingungen für den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide in PCR Produkte

PCR-Programm			
Zyklen	Zeit (sec)	Temperatur (°C)	Programm
25	60	96	Denaturierung
	240	60	Hybridisierung u. Extension

Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden anschließend zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide über das DyeEx Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt, mit 6 µl „Hi Di Formamid“ Ladepuffer vermischt und auf der automatischen Sequenzieranlage ABI 377 mit der „ABI-PRISM 3700“ Kapillar-Sequenzierereinheit analysiert. Die Laufzeit betrug 2,5 Stunden. Die Auswertung wurde mit Hilfe des „Sequencer-Software-Pakets“ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan, USA) durchgeführt. Als Referenzsequenz diente die humane Cyclin D1 Gensequenz (Genbank NM_053056).

3.3.4.2.6 Interphase-FISH auf Paraffinschnitten

Die Technik der Interphase-Fluorescence In Situ Hybridisierung (Interphase-FISH) erlaubt den Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen und strukturellen Chromosomenveränderungen wie Translokationen, Deletionen oder Amplifikationen in histologischen Schnittpräparaten. In der vorliegenden Arbeit wurde zum Nachweis der Translokation t(11; 14) die Sonde „LSI IgH/CCND1 Dual Color Dual Fusion Translocation Probe“ und zum Nachweis einer Polysomie von Chromosom 11 die Sonde „LSI Cyclin D1/CEP 11 Dual Color Probe“ verwendet. Die FISH-Analysen wurden nach bereits publizierten Protokollen (Specht et al 2004) durchgeführt. 5 µm dünne Paraffingewebeschnitte wurden in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und anschließend für eine 20-minütige Mikrowellenbehandlung bei 750 Watt in Citratpuffer (pH=6) inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und für 3 Minuten bei 37°C mit Pronase E (0,05 % in PBS, pH 7,0) angedaut. Anschließend wurde die DNA für 15 min in 70% Formamid / 2xSSC bei 75°C denaturiert, in Ethanol rehydriert und bei 37°C getrocknet. Die Sonden wurden nach den Abgaben des Herstellers verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 gegengefärbt und eingedeckt. Zur Auswertung wurde ein LSM-510 NLO Lasermikroskop (Zeiss, Jena, Germany) und zur Bildverarbeitung die Zeiss Computer Software (AIM 3.2) verwendet. Die Schwellenwerte (Cut-off's) für das Vorhandensein von Alterationen wurden am FFPE Gewebe von fünf Kontrollen (2 KM, 2 LK, Tonsille) bestimmt. Die Cut-off's berechneten sich aus dem Mittelwert der vorhandenen positiven Signale/100 Zellen plus deren dreifache Standardabweichung. Eine Translokation t(11; 14) lag vor, wenn in mindestens 18,95 % der Tumorzellkerne eindeutige Fusionssignale vorhanden waren. Als Positivkontrolle wurde in jedem Hybridisierungs-Vorgang ein LK-Gewebeschnitte mit der Zellen eines Mantelzell-Lymphoms mitgeführt. Die Polysomie 11 lag vor, wenn in mindestens 10,25 % der Tumorzellen mind. je drei D1/CEP 11 Signale vorhanden waren. Es wurden je Fall mindestens 100 Tumorzellen ausgezählt.

3.3.4.3 Proteinchemische Methoden-Western Blot

Das Westernblot Verfahren wurde nach bereits veröffentlichten Protokollen durchgeführt (Quintanilla-Martinez et al 2003).

3.3.5 Statistische Analysen

Die ermittelten Daten weisen grundsätzlich eine nicht normale, positiv schiefe Verteilung auf. Zur statistischen Deskription wurden daher durchwegs robuste Kennwerte, zur Durchführung statistischer Vergleiche nicht parametrische Testverfahren verwendet.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte primär deskriptiv unter Angabe von prozentualen Häufigkeiten und Medianen. Als Test zum Vergleich von Merkmalen zwischen verschiedenen Gruppen von Patienten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney- (bei zwei Gruppen) bzw. der Kruskal- Wallis-Test (bei mehr als zwei Gruppen) angewendet. Alle angegebenen p-Werte sind zweiseitig. P-Werte $< 0,5$ wurden als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeines

4.1.1 Design variantenspezifischer Cyclin D1 qRT-PCR Assays

Ziel dieser Studie war die Quantifizierung der bekannten Cyclin D1 mRNA Varianten mittels qRT-PCR (TaqMan RT-PCR) an einer Serie primärer multipler Myelome und Lymphomzelllinien. Dazu wurden vier verschiedene Cyclin D1 TaqMan Assays verwendet, mit denen jeweils die variantenspezifischen Sequenzen der Cyclin D1 mRNA amplifiziert werden konnten. Eine schematische Darstellung der Lage der verschiedenen Cyclin D1 TaqMan Assays auf den zu analysierenden Cyclin D1 mRNA Varianten ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt. Der Assay CyD1 total wurde von Frau Dr. Katja Specht für eine vorangehende Studie entworfen (Specht et al 2002).

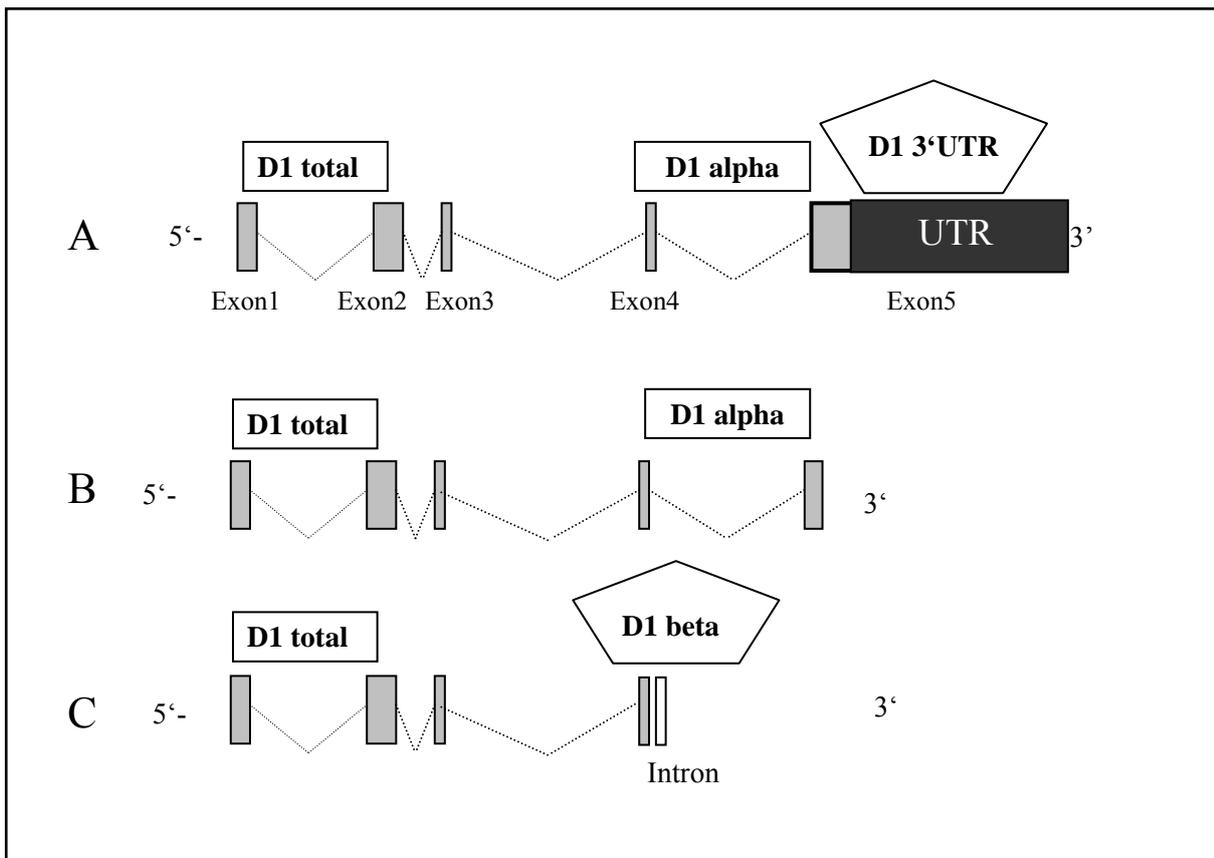


Abbildung 11: Schematische Darstellung der CyD1 mRNA Varianten und Lage der Assays (A: lange CyD1a mRNA, B: kurze CyD1a mRNA, C: CyD1b mRNA). Assays in Rauten amplifizieren spezifisch eine CyD1 mRNA Variante, Assays in Rechtecken amplifizieren mehrere mRNA Varianten. Graue Rechtecke stellen Exons, Striche stellen Introns dar.

Quantifizierung der Cyclin D1 mRNA Gesamtexpression

Der Taqman Assay „CyD1 total“ erstreckt sich über Exon 1 und 2. Da das Exon 1 und das Exon 2 bei allen bisher bekannten Cyclin D1 mRNA Varianten vorhanden sind, werden mit diesem TaqMan-Assay unspezifisch alle Cyclin D1 mRNA Varianten amplifiziert. Die absoluten Kopienzahlen werden anhand externer Plasmidstandardkurven berechnet. Somit erhält man ein Maß, wie viele Cyclin D1 Transkripte insgesamt in der Probe vorliegen, unabhängig vom Vorhandensein spezifischer mRNA Varianten. Wegen der möglicherweise schwankenden Effektivität der reversen Transkription ist es jedoch nicht möglich, die ermittelte Kopienanzahl verschiedener Proben direkt miteinander zu vergleichen. Es ist daher notwendig, stets mindestens ein im Gewebe konstant exprimiertes Gen (Housekeeping-Gen) zu quantifizieren und die Expressionsrate des gefragten Gens zu der Expressionsrate eines Housekeeping-Gens in Relation

4. Ergebnisse

zu setzen. In der vorliegenden Studie wurde dazu die Expression des Housekeeping-Gens TBP (TATA-Box bindendes Protein) quantifiziert.

Quantifizierung der kurzen Cyclin D1 alpha mRNA

Der „CyD1 3'UTR“ Assay liegt in dem Bereich der 3'untranslatierten Region (3'UTR), in welchem die für den Abbau der mRNA wichtigen Sequenzen vermutet werden. Mit diesem „CyD1 3'UTR“ Assay werden in der PCR lediglich lange Cyclin D1 alpha mRNA Varianten amplifiziert. Möchte man den Anteil der langen und kurzen Cyclin D1 alpha mRNA Varianten an den gesamten Cyclin D1 Transkripten darstellen, so setzt man die Kopienanzahl des „CyD1 3'UTR“ Assay in Relation zur Kopienzahl des „CyD1 total“ Assays.

$$\begin{aligned} \% \text{ lange Cyclin D1 alpha mRNA} &= \frac{\text{Kopienanzahl „CyD1 3'UTR“}}{\text{Kopienanzahl „CyD1 total“}} \times 100 \\ \% \text{ kurze Cyclin D1 alpha mRNA} &= 100\% - \% \text{ lange Cyclin D1 alpha mRNA} \end{aligned}$$

Es ist anzumerken, dass die so berechnete Expressionshöhe der kurzen Cyclin D1 alpha mRNA auch die kurze Cyclin D1 beta Variante miteinschließt, da mit dem „CyD1 total“ Assay unspezifisch alle Cyclin D1 mRNA Varianten amplifiziert werden.

Quantifizierung der Cyclin D1 beta mRNA

Der „D1 beta“ Assay erstreckt sich über Exon 4 und Intron 4 und amplifiziert spezifisch Cyclin D1 beta mRNA. Der „CyD1 alpha“ Assay hingegen, der zwischen Exon 4 und Exon 5 liegt, amplifiziert lange und kurze Cyclin D1 alpha mRNA. Möchte man den Anteil der Cyclin D1 beta mRNA Variante an den gesamten Cyclin D1 Transkripten ermitteln, so setzt man die Kopienanzahl „D1 beta“ Assay in Bezug zur Summe der Kopienzahlen des „CyD1 alpha“ und „CyD1 beta“ Assays:

$$\% \text{ Cyclin D1 beta mRNA} = \frac{\text{Kopienanzahl „CyD1 beta“}}{\text{Kopienanzahl „CyD1 alpha“} + \text{Kopienanzahl „CyD1 beta“}}$$

4.1.1.1 Spezifität und Sensitivität

Grundsätzlich werden bei der qRT-PCR Reaktion alle zum Taqman Assay komplementären Nukleotidsequenzen amplifiziert. Somit kann bei der Position der Primer innerhalb eines einzigen Exons neben cDNA auch genomische DNA amplifiziert werden. Da dies bei der Analyse von Genexpressionsraten nicht erwünscht ist, wurde beim Design der Taqman Assays versucht, die Position der Primer exonüberspannend zu wählen. Aufgrund des fehlenden Exon/Exon-Übergangs im zu analysierenden Transkriptbereich war dies beim „CyD1 3'UTR“ und „CyD1 beta“ Assay nicht möglich. Um hier eine Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden, wurden alle RNA-Extrakte einer DNase Behandlung unterzogen. Die DNA-Freiheit der DNase behandelten RNA wurde stichprobenartig überprüft, indem RNA ohne vorherige reverse Transkription in die qRT-PCR eingesetzt wurde. Es fand dabei in keinem Fall eine Amplifikation statt. Eine Positivkontrolle (Plasmidstandard) und Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne Template) wurden mitgeführt und zeigten die regelrechte PCR Reaktion. Alle in dieser Studie verwendeten Assays zeigten eine verlässliche Amplifikation von Plasmidstandardverdünnungsreihen über mindestens 5 logarithmische Stufen, bis zu einer Verdünnungsstufe von 100 Kopien im Reaktionsansatz (siehe Tabelle 7). Somit ist eine hohe Sensitivität und Präzision der Daten auch bei nur geringen Mengen der Zielsequenz in der Probe gegeben.

Tabelle 7: Sensitivität der qRT-PCR

Kopienanzahl	CyD1 total		CyD1 alpha		CyD1 beta		CyD1 3'UTR	
	CT-Wert							
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
10 ⁶	22,5	0,3	22,4	0,7	23,4	0,5	20,1	0,2
10 ⁵	25,9	0,6	25,9	0,9	26,8	0,5	23,3	0,1
10 ⁴	29,5	0,4	29,4	0,9	30,2	0,6	26,6	0,3
10 ³	32,7	0,6	32,8	1,1	33,5	0,6	30	0,1
10 ²	36,5	0,9	35,2	0,8	36,2	0,7	33,8	0,5

MW: arithmetische Mittel dreier voneinander unabhängiger Reaktionen, SD: Standardabweichung

4.1.1.2 Effizienz

Bei der Etablierung von TaqMan Assays muss überprüft werden, ob diese mit ähnlicher Effizienz amplifizieren. Einen Einfluss darauf haben u.a. Primer,-und Sondenlänge, der GC-Gehalt der Primer und Sonden und die Länge des zu bildenden Amplifikats. Da bei zunehmender Länge des Amplifikats die Effizienz der RT-PCR stetig abnimmt, sollen Amplikonlängen < 90 Bp sein (Specht et al 2002). Dies wurde beim Design der Taqman Assays berücksichtigt: alle bis auf den „CyD1 beta“ Assay haben eine Amplikonlänge <90 Bp, aufgrund der gewünschten Isoform-Spezifität hat der „D1 beta“ Assay eine Amplikonlänge von 122 Bp.

Die Effizienz der Taqman Assays wurde mittels Amplifikation von Plasmidstandardverdünnungsreihen überprüft. Dazu wurden die ermittelten CT-Werte gegen den Logarithmus der entsprechenden Kopienanzahl des Plasmidstandards aufgetragen und die Geradengleichung mittels linearer Regression erstellt. Der lineare Korrelationskoeffizient R war für alle Geraden >0,98, was einer hohen Amplifikationseffizienz entspricht. In Abbildung 12 sind exemplarisch die Amplifikationskurven der Plasmidstandardverdünnungsreihen des Taqman Assays Cyclin D1 total (A) und entsprechende Regressionsgerade und Geradengleichung (B) dargestellt.

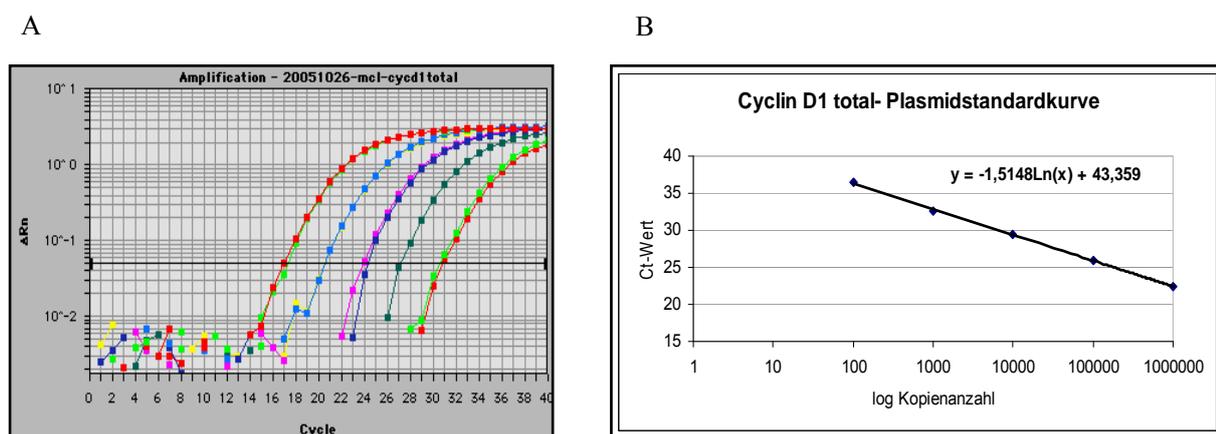


Abbildung 12: Amplifikationskurven und Regressionsgerade der Plasmidstandardverdünnungsreihe für den Taqman Assay CyD1 total.

A: Ausgehend von der Kopienanzahl von 10^6 Kopien wurden 4 Verdünnungstufen (je 1:10) angefertigt und jeweils im Duplikat in die PCR-Reaktion eingesetzt. Ordinate: ΔRn (Differenz von Reporter,-und Hintergrundsignal); X-Achse: Cycle(Zyklenzahl).

B: Im Excel-Programm erstellte Regressionsgerade mit entsprechender Geradengleichung. Ordinate: Ct-Wert, X-Achse: log Kopienanzahl. Die Eichgerade wurde mittels linearer Regression berechnet

4.1.2 Etablierung der genomischen qPCR

Mittels genomischer qPCR wurde an Zelllinien und Primärtumoren untersucht, ob eine Deletion des 3'UTR des Cyclin D1 Gens vorlag. Zur Quantifizierung des Zielgen-Lokus wurde der auch in der qRT-PCR verwendete CyD1 3'UTR Taqman Assay verwendet. Als Referenzgene wurden SOCS1 (Chromosom 16) und beta Globin (Chromosom 11) ausgewählt. Für diese beiden Gene standen bereits in Labor etablierte genomische TaqMan Assays zur Verfügung. Eine ausführliche Meta-Datenbankanalyse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) ergab keinen Hinweis auf eine bekannte Alteration dieser beiden Gene beim multiplen Myelom.

Zur Etablierung der genomischen qPCR wurde FFPE-DNA zweier gut charakterisierter Mantelzell-Lymphomzelllinien (Jeko-1 und Granta 519) verwendet. Bei der Zelllinie Jeko-1 ist eine monoallelische Deletion der 3'untranslatierten Region des CyD1 Gens bekannt (Wiestner et al 2007), sie wurde daher als Positivkontrolle verwendet. Da die Zelllinie Granta 519 überwiegend normale CyD1a mRNA (mit erhaltener 3'untranslatierter Region) exprimiert, ist eine Deletion der CyD1 3'UTR nicht anzunehmen. DNA der Zelllinie Granta 519 wurde daher als Negativkontrolle verwendet. Als Referenz diente FFPE-DNA aus normalem Kolonepithel. Die DNA-Proben wurden im 5-fach-Ansatz in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Abbildung 13 zeigt die Amplifikationskurven des CyD1 3'UTR-Lokus, SOCS 1,-und beta Globin-Lokus der Zelllinien Granta 519 und Jeko-1.

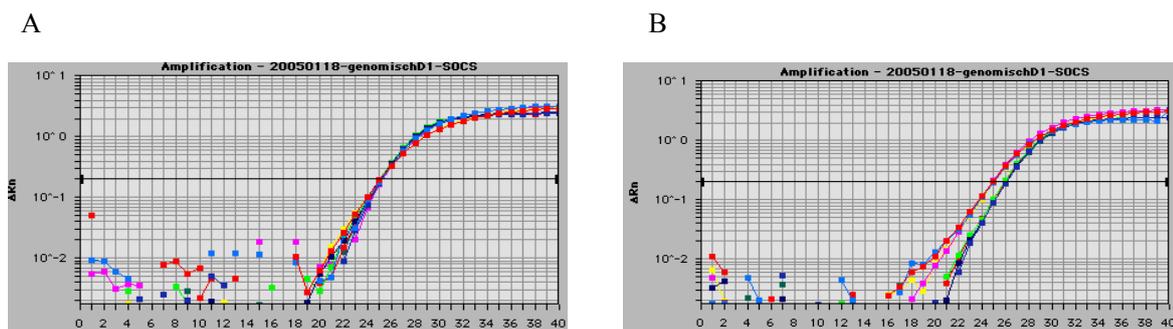


Abbildung 13: Original Screenshot:

Amplifikationskurven des CyD1 3'UTR-Lokus (dunkelblau und grün), SOCS 1-Lokus (hellblau und rot) und beta Globin-Lokus (gelb und rosa) der Zelllinien Granta 519 (A) und Jeko-1 (B).

4. Ergebnisse

Die Amplifikationskurven des CyD1 3'UTR-Lokus (Zielgen) und der SOCS 1,- und beta-Globin –Loki (Referenzgene) liegen bei der Zelllinie Granta 519 annähernd aufeinander. Bei gleicher in die Reaktionen eingesetzter DNA-Menge bedeutet dies, dass die Startkopienanzahl der Ziel-, -und Referenzgenregionen annähernd gleich ist. Bei der Zelllinie Jeko-1 ist die Amplifikationskurve des CyD1 3'UTR-Lokus um einen CT-Wert nach rechts verschoben. Dies bedeutet, dass die Startkopienanzahl des Zielgens (CyD1 3'UTR) nur halb so hoch ist wie die der Referenzgene. Unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode erhält man folgende Ergebnisse (Tabelle 8).

Tabelle 8: Verhältnis zwischen Startkopienanzahl des Ziel-, -und der Referenzgene

	CyD1 3'UTR/ beta Globin	CyD1 3'UTR/ SOCS 1	beta Globin/ SOCS 1
Normalgewebe	1	1	1
Jeko-1	0,5	0,5	0,9
Granta 519	1,2	1,1	0,9

Bei der Zelllinie Jeko-1 war das Verhältnis des Zielgens zu den Referenzgenen (CyD1 3'UTR/beta Globin und CyD1 3'UTR/SOCS 1) jeweils 0,5, was einer monoallelischen Deletion des CyD1 3'UTR-Lokus entspricht. Das Verhältnis beta Globin/SOCS 1 war 0,9, was darauf hindeutet, dass die Chromosome 11 (beta-Globin Locus) und 16 (SOCS 1-Locus) in gleicher Menge vorliegen. Bei der Zelllinie Granta 519 waren die entsprechenden Verhältnisse 1,2, 1,1 und 0,9. Dies bedeutet, dass die untersuchten Loci in gleicher Menge vorliegen (Disomie). DNA der Zelllinien Jeko-1 und Granta 519 wurden in jeder der qPCR-Analysen als Kontrollen mitgeführt.

4.2 Besonderheiten bei der Etablierung von Taqman Assays im formalinfixierten paraffineingebetteten Material

Werden Genexpressionsanalysen im formalinfixierten paraffin-eingebetteten Material (FFPE) durchgeführt, muss beachtet werden, dass die Formalinfixierung eine starke Fragmentierung und Degradierung der Nukleinsäuren (DNA und RNA) bewirkt, so dass die Effizienz der Amplifikation vermindert ist. Zusätzlich kommt es aufgrund der variablen Sekundärstruktur von Nukleinsäuren zu einer mehr oder weniger starken Quervernetzung der Nukleinsäurefragmente mit denaturierten Proteinen, so dass verschiedenen Nukleinsäurefragmente möglicherweise nicht in gleichem Maße der qRT-PCR Analyse zur Verfügung stehen. Dies bedeutet, dass die im FFPE-Gewebematerial ermittelten Genexpressionsraten verschiedener mRNA Spezies möglicherweise nicht denen des nativen Gewebemateriales entsprechen. Da für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen ausschließlich FFPE-Gewebe zur Verfügung stand, wurden vorerst in einem standardisierten Zellkulturversuch mögliche Effizienzunterschiede der verwendeten Taqman Assays im FFPE Material untersucht. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 14 zu sehen.

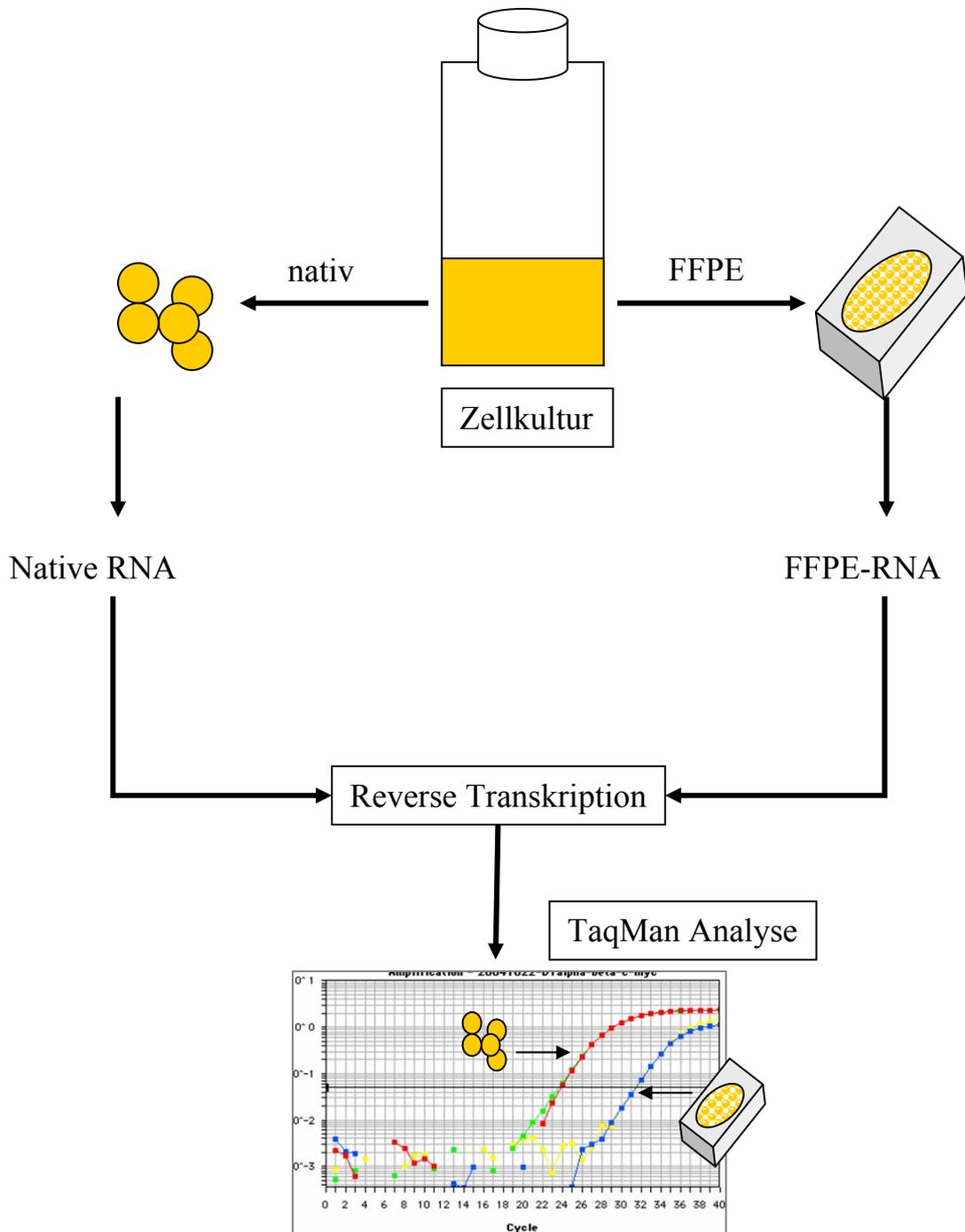


Abbildung 14: Zelllinienbasierter Versuchsaufbau

Nach Auftauen der Kryokulturen wurden die Zellen unter standardisierten Bedingungen zwei bis drei Wochen kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase für die TaqMan-Analysen geerntet. Am Tag der Ernte wurden die Zellen einer Zellkulturflasche in zwei Aliquots geteilt. Aus einem Zell-Aliquot wurde im nativen Zustand sofort RNA isoliert, während das andere Zell-Aliquot vorerst formalinfixiert und in Paraffin eingebettet wurde. Aus diesem FFPE-Zellblock wurde anschließend RNA isoliert. Die RNA-Extrakte wurden einem DNase-Verdau unterzogen, spektrophotometrisch vermessen und je 1 µg mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Pärchen (nativ/FFPE) wurden in die TaqMan Analysen eingesetzt und die CT-Werte für die verschiedenen Taqman Assays ermittelt. Die CT-Differenz ist dabei ein Maß für den Effizienzunterschied der qRT-PCR Reaktion im nativen und FFPE-Material. Vergleicht man die so ermittelten CT-Differenzen verschiedener Taqman Assays, ergibt sich ein Hinweis auf einen eventuell unterschiedlich starken Effizienzverlust der qRT-PCR-Reaktion im FFPE Material.

Es wurden auf diese Weise drei voneinander unabhängige Versuche mit verschiedenen humanen Zelllinien (Granta, U266, KMS-12, HT-29, A431, JVM-2, NCEB-1) durchgeführt.

4.2.1 CT-Differenzen in nativem und FFPE Material

Es wurden neben den vier variantenspezifischen Cyclin D1 TaqMan Assays (D1 alpha, D1 beta, D1 3'UTR, D1 total) neun weitere im Labor etablierte TaqMan Assays (BclXL, BCL-1, c-myc, Cyclin D3, Grim-19, MCL-1, SOCS-1, STAT-3, TBP) auf mögliche Effizienzunterschiede im nativen und FFPE-Zelllinienmaterial untersucht.

Drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente lieferten konsistente Ergebnisse. So waren die CT-Werte der cDNA's aus nativem Material für alle untersuchten Taqman Assays konstant niedriger als die CT-Werte der cDNA's aus FFPE Material. Der durchschnittliche CT-Unterschied der 13 untersuchten TaqMan Assays war 3,2 CT's. Dabei war der CT-Unterschied für die verschiedenen TaqMan Assays nicht gleich hoch. Während die Assays D1 beta und Grim-19 den niedrigsten CT-Unterschied mit 1,8 CT's zeigten, wies der STAT-3 Assay einen deutlich höheren CT-Unterschied mit 5,1 CT's auf. Die Höhe des CT-Unterschiedes war dabei unabhängig von der verwendeten Zelllinie und dem jeweiligen Experiment.

Neben dem unmittelbaren Vergleich der CT-Unterschiede, können die Effizienzunterschiede auch in Form der Ausbeute („Recovery“) verschiedener mRNA Spezies bei den TaqMan Analysen im FFPE Material dargestellt werden. Die „Recovery“ wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Recovery (FFPE)} = \frac{\text{Kopienanzahl}/\mu\text{l cDNA im FFPE Material}}{\text{Kopienanzahl}/\mu\text{l cDNA im nativen Material}} \times 100$$

Im FFPE-Material standen bestenfalls 28,9% (D1 beta und Grim-19) und schlechtestenfalls 2,7 % der mRNA Moleküle (STAT-3) den TaqMan qRT-PCR Analysen zur Verfügung (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: CT-Unterschiede zwischen FFPE,- und nativem Zelllinienmaterial (CT-Differenz FFPE-nativ) und mRNA Ausbeute im FFPE Material in Bezug auf natives Material (%Kopien)

TaqMan Assays	CT-Differenz (FFPE-nativ)	% messbare Kopien im FFPE
BCLxL	4,2	6,6
BLC-2	3,1	16
c-myc	3,8	7,9
D1 3'UTR	3,6	9
D1 alpha	3,4	9
D1 beta	1,8	28,9
D1 total	3,3	9,3
D3	2,9	16,4
Grim-19	1,8	28,9
MCL-1	2,3	21,7
SOCS-1	3,2	12,4
STAT-3	5,2	2,7
TBP	2,7	18,4

Angegeben sind jeweils die arithmetischen Mittel dreier voneinander unabhängiger Experimente.

Statistische Analyse

In der statistischen Analyse wurde auf der Basis der ermittelten CT-Unterschiede untersucht, ob die Schwankungen zwischen den 13 TaqMan Assays (Inter-Assay-Varianz) größer waren als die Schwankungen zwischen den Zelllinienpärchen innerhalb eines TaqMan Assays (Intra-Assay-Varianz). Falls die Intra-Assay-Varianz gegenüber der Inter-Assay-Varianz aus statistischer Sicht zu vernachlässigen wäre, sollten solche Assays identifiziert werden, deren mittlere CT-Differenzen sich signifikant voneinander unterschieden.

Die Varianzanalyse zeigte, dass 92,3 % der signifikanten Varianzen auf CT-Differenzen zwischen Assays zurückgeführt werden konnten und nur 7,7 % auf CT-Differenzen zwischen Zelllinien innerhalb eines Assays. Die Inter-Assays-Varianz war demnach wesentlich größer als die Intra-Assay-Varianz.

Mit dem Ziel der Identifizierung von TaqMan Assays mit signifikantem Effizienzunterschied in FFPE Material, wurden in einer Post-hoc Analyse die CT-Differenzen aller 156 möglichen Assay Kombinationen miteinander verglichen. 55 der 156 (35,3%) Assay-Kombinationen zeigten signifikant unterschiedlich hohe CT-Differenzen ($p < 0,05$) (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: p-Werte zwischen Assays mit signifikant unterschiedlicher qRT-PCR Effizienz im FFPE Material.

	BCL-2	BCLxL	c-myc	CyD1 total	CyD1 3'UTR	CyD1 alpha	CyD1 beta	Cyclin D3	Grim 19	MCL 1	SOCS 1	STAT 3	TBP
BCL-2		(0,096)										0,000	
BCLxL	(0,096)				0,047		0,000	0,047	0,000	0,000			0,007
c-myc							0,000		0,000	0,005		0,002	
D1 total							0,009		0,018			0,000	
D1 3'UTR		0,047					0,000		0,001	(0,075)		0,001	
D1 alpha							0,002		0,005			0,000	
D1 beta		0,000	0,000	0,009	0,000	0,002					0,013	0,000	
D3												0,000	
GRIM19		0,000	0,000	0,018	0,001	0,005					0,027	0,000	
MCL1		0,000	0,005		(0,075)							0,000	
SOCS1							0,013		0,027			0,000	
STAT3	0,000		0,002	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000
TBP		0,007										0,000	

Am wenigsten häufig zeigten sich Effizienzunterschiede zwischen Assays, die eine CT-Differenz nahe der durchschnittlichen CT-Differenz von 3,2 aufwiesen. So zeigte der Assay BCL-2 (CT-Differenz=3,2) einen ähnlich hohen Effizienzverlust im FFPE Material wie 10 der 11 weiteren Taqman Assays. Lediglich der Assay STAT-3 wies einen signifikant höheren Effizienzverlust im FFPE Material auf (CT-Differenz=5,2). Am häufigsten zeigten sich signifikante Effizienzunterschiede zwischen Assays mit besonders hohen bzw. besonders niedrigen CT-Differenzen. So unterschied sich die Effizienz des Assay STAT-3 signifikant von 11 der 12 anderen Assays.

Zur Quantifizierung der Cyclin D1 mRNA Varianten wurden vier verschiedenen D1 Assays verwendet (D1 alpha, D1 beta, D1 3'UTR und D1 total). Während die Assays D1 alpha und D1 beta signifikant unterschiedlich hohe CT-Differenzen aufwiesen (CT-Differenz 3,4 vs 1,8, $p=0,002$), unterschieden sich die CT-Differenzen zwischen den Assays D1 total und D1 3'UTR nicht signifikant.

Die in der Real-Time PCR ermittelten Kopienanzahlen von Assays, deren CT-Differenzen sich signifikant unterscheiden, dürfen nicht direkt miteinander verglichen werden. Es käme sonst zu einer Über-, -oder Unterschätzung der einen oder anderen mRNA Kopienanzahl. Um die Expressionsspiegel (Kopienanzahl) von mRNA's mit unterschiedlichem Verhalten in FFPE Material trotzdem direkt vergleichen zu können, müssen die im FFPE Material ermittelten Kopienanzahlen für jede mRNA rechnerisch auf die Kopienanzahl, wie sie im nativen Material vorläge, korrigiert werden.

4.2.2 Berechnung von Korrekturfaktoren

Die Korrekturfaktoren für die einzelnen TaqMan Assays (mRNA's) wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{Korrekturfaktor TaqMan Assay X} = \frac{\text{Anzahl an Kopien X /}\mu\text{l im nativen Material}}{\text{Anzahl an Kopien X /}\mu\text{l im FFPE Material}}$$

Die Anzahl an Kopien errechnete sich aus dem Mittelwert der drei unabhängigen Versuche. In Tabelle 11 sind die Korrekturfaktoren für die untersuchten TaqMan Assays dargestellt.

Tabelle 11: Korrekturfaktoren

TaqMan Assay	Korrekturfaktor
BCL-2	6,3
BCL-xL	15,2
c-myc	12,6
D1 3'UTR	11,1
D1 alpha	11,1
D1 beta	4,3
D1 total	8,0
D3	6,3
GRIM-19	3,5
MCL-1	4,6
SOCS-1	10,8
STAT-3	37,6
TBP	5,4

Die Reproduzierbarkeit der ermittelten Korrekturfaktoren wurde mit der leave-one-out Kreuzvalidierung gesichert.

Wird die im FFPE Material ermittelte Kopienanzahl einer mRNA X mit dem entsprechenden Korrekturfaktor multipliziert und zu der ebenfalls korrigierten Kopienanzahl einer anderen mRNA Y in Bezug gesetzt, so repräsentiert die Ratio mRNA X /mRNA Y das Verhältnis, wie es im nativen Material vorläge. Somit können auch im FFPE Material die Expressionspiegel von mRNA's mit signifikant unterschiedlichem Effizienzverlust miteinander verglichen werden. Die Berücksichtigung und Korrektur des formalininduzierten Sensitivitätsverlustes ist vor allem beim Vergleich der Expressionsspiegel von mRNA Varianten eines Genes wichtig (Koch et al 2006).

Anwendungsbeispiele

Zur Bestimmung des Anteils der Cyclin D1 beta mRNA Variante, werden die Kopienanzahlen der CyD1 beta mRNA dividiert durch die Summe der Kopienanzahlen der CyD1 beta,- und CyD1 alpha mRNA. Da sich die CT-Differenzen des D1 alpha und D1 beta Assays signifikant unterscheiden (CT-Differenz D1 alpha = 3,4, D1 beta=1,8, p=0,002) müssen die im FFPE Material ermittelten Kopienanzahlen korrigiert werden, da es sonst zu einer Überschätzung der Menge an CyD1b Transkripten kommen würde. In Tabelle 12 sind die in der qRT-PCR ermittelten Kopienanzahlen der D1 alpha und D1 beta Assays im nativen und formalinfixierten Material der Zelllinie KMS 12 dargestellt. Der Anteil an CyD1b mRNA betrug im nativen Material 17,8%, im entsprechenden FFPE-Material 37,4%. Werden die im FFPE-Material ermittelten Kopienanzahlen mit den jeweiligen Korrekturfaktoren multipliziert (11,1 bzw. 4,3), ist der korrigierte Anteil an CyD1b mRNA im FFPE Material 18,8%, und entspricht damit annähernd dem im nativen Material gemessenen Wert.

Tabelle 12: Anwendungsbeispiel für Korrekturfaktoren

	D1 alpha (Kopienanzahl/μl cDNA)	D1 beta (Kopienanzahl/μl cDNA)	% CyD1b mRNA
KMS 12 nativ	36223	7826	17,8%
KMS-12 FFPE	2797	1669	37,4%
KMS-12 FFPE mit Korrektur	31042	7175	18,8%

Abbildung 15 stellt grafisch die jeweils berechneten Anteile der CyD1b mRNA in allen untersuchten Zelllinienpärchen (nativ und FFPE) mit den entsprechenden korrigierten FFPE-Werten dar.

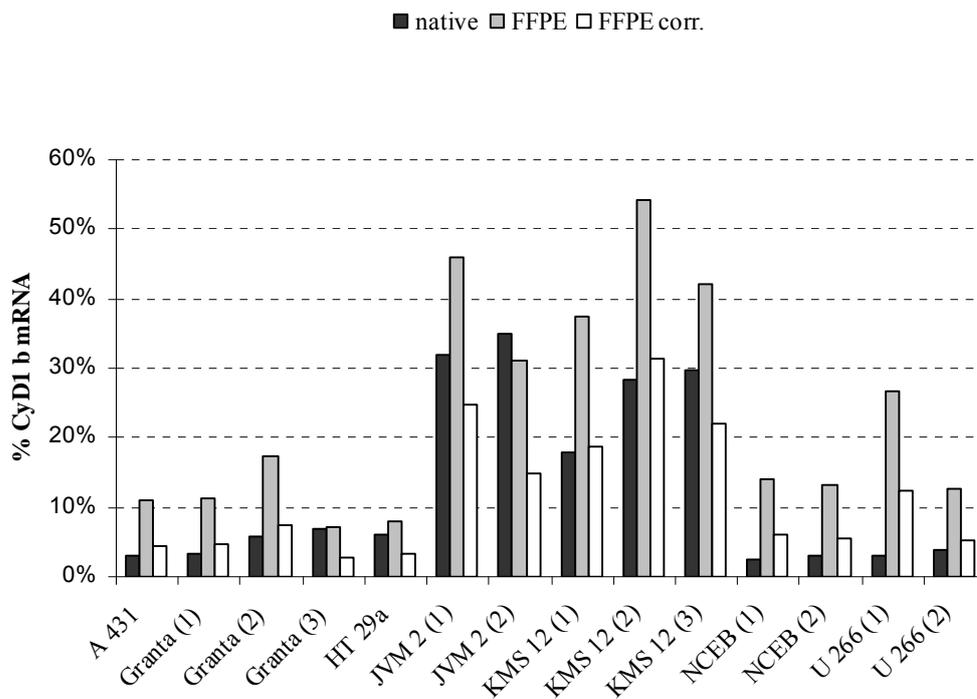


Abbildung 15: % CyD1b mRNA im nativen und FFPE Zellmaterial ohne und mit Verwendung des Korrekturfaktors. Schwarze Säulen repräsentieren die berechneten Werte im nativen Zellmaterial, graue Säulen im FFPE-Zellmaterial. Die weißen Säulen repräsentieren die Expressionsraten im FFPE Material unter Anwendung der Korrekturfaktoren. X-Achse: Name der Zelllinie (Nummer des Experiments).

4.2.3 Weitere untersuchte mögliche Einflussfaktoren

Es wurde überprüft, ob die Zugänglichkeit von FFPE-mRNA's für TaqMan Analysen von der Startkopienanzahl der mRNA (Genexpressionsstärke), der RNA-Extraktionsmethode, von Assay-spezifischen Faktoren wie Länge bzw. Adenosingehalt des Amplifikats oder der Zeitdauer bis zur Fixierung des Materiales und der Zeitdauer des Proteinase K Verdaus abhängig ist. Bei beiden letzteren sollte festgestellt werden, ob Verluste sowohl an Gesamt-RNA oder an spezifischen mRNA-Sequenzen durch diese Variablen einkalkuliert werden müssen und wie die einzelnen einwirkenden Faktoren zu gewichten sind. Zusätzlich wurde ein möglicher Einfluss einer EDTA-Entkalkung, wie sie routinemäßig z.B. bei Knochenmarkbiopsien vorgenommen wird, auf die Zugänglichkeit von FFPE-mRNA's für TaqMan Analysen, untersucht.

4.2.3.1 Expressionshöhe eines Gens

Es wurde untersucht, ob die Expressionshöhe einer bestimmten mRNA bzw. die Anzahl an Start-Transkripten, einen Einfluss auf den CT-Unterschied zwischen nativen und FFPE Material hat. Dazu wurde bei den sieben Zelllinien zunächst die relative Expressionshöhe eines Gens (Ratio Kopienanzahl Gen X/ Kopienanzahl TBP) in nativer RNA bestimmt und mit den entsprechenden CT-Differenzen (FFPE-nativ) korreliert. Diese Analyse war nur für solche Gene bzw. mRNA's sinnvoll, die bei den untersuchten Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert waren (mindestens um den Faktor 3). Dies traf für vier der 13 untersuchten Gene zu: Cyclin D1 (D1 total und D1 alpha Assay), c-myc und STAT-3. Während beim STAT-3 Assay bei geringer Startkopienanzahl der Trend zu höheren CT-Differenzen bestand, war insgesamt gesehen kein Einfluss der Startkopienanzahl auf die CT-Differenz zu beobachten (siehe Abbildung 16).

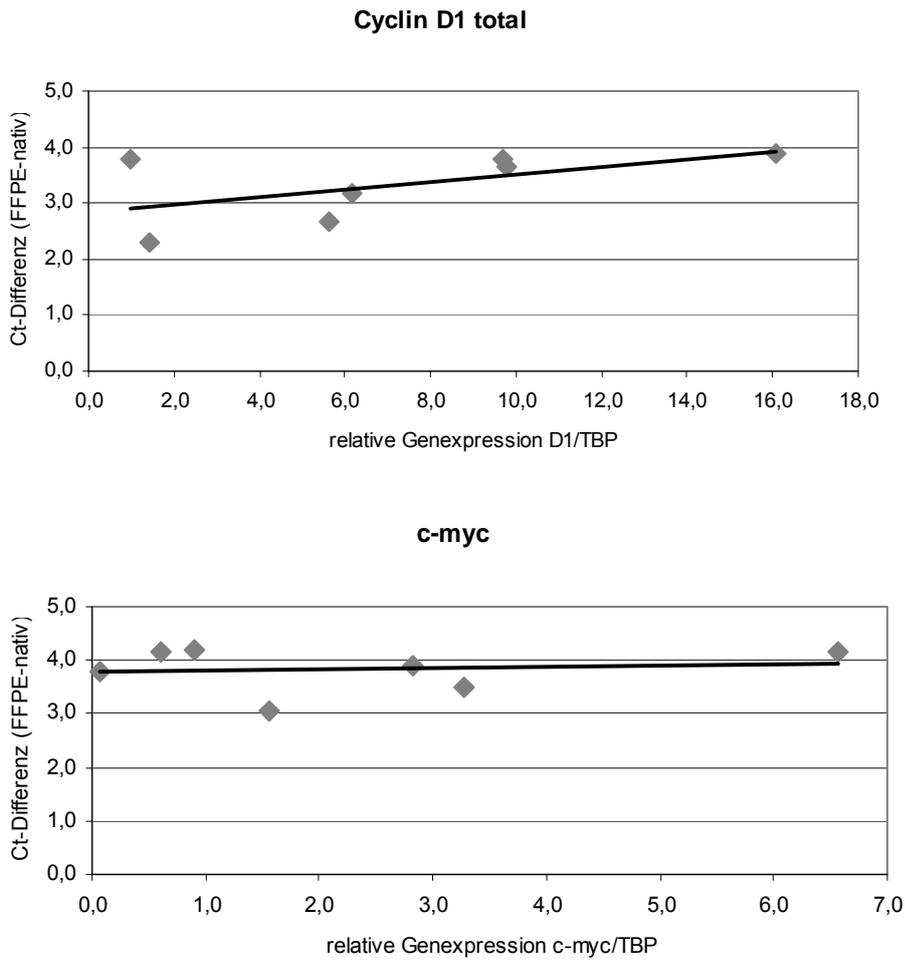


Abbildung 16a: Einfluss der Expressionshöhe eines Gens auf CT-Werte

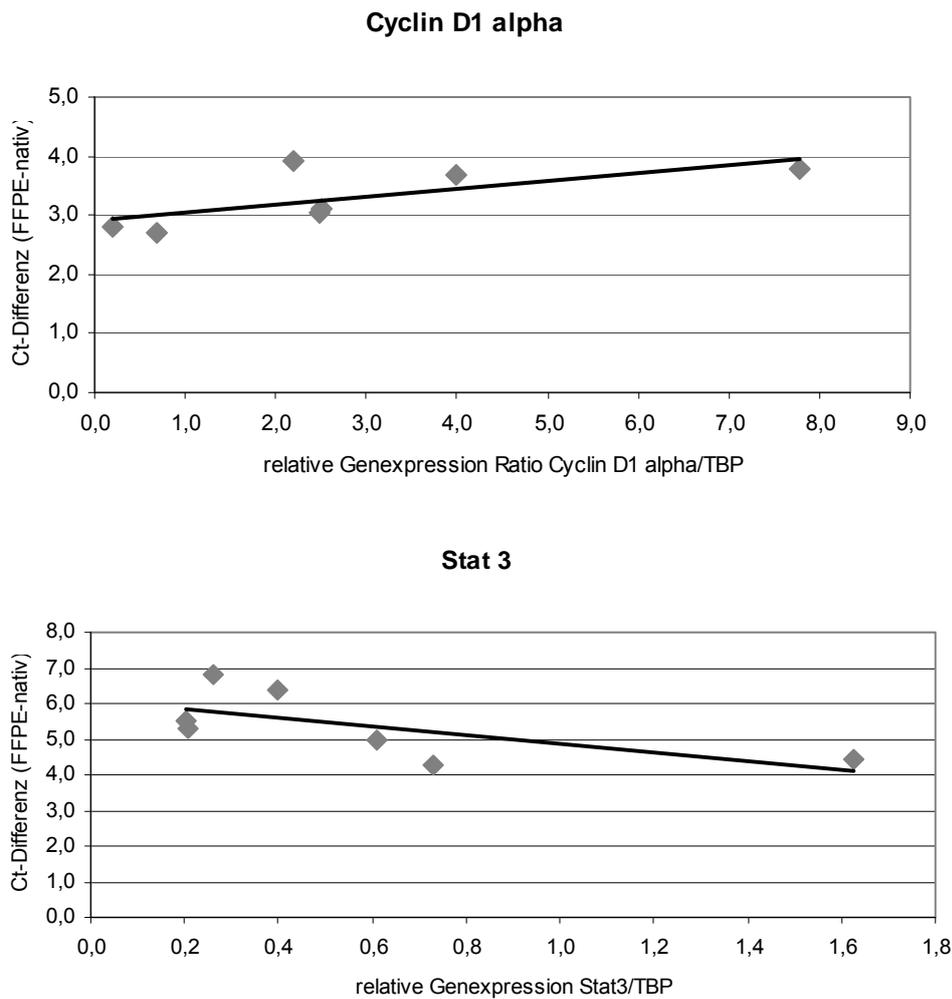


Abbildung 16b: Einfluss der Expressionshöhe eines Gens auf CT-Werte

4.2.3.2 Einfluss der RNA-Isolierungsmethode

Die CT-Unterschiede zwischen nativen und FFPE Material resultieren von der unterschiedlichen Behandlung ab Zellpellet-Herstellung bis zur bis zur cDNA-Synthese. Insbesondere ist auch ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen RNA Isolierungsmethoden auf die CT-Shifts in Betracht zu ziehen. Aus diesem Grund wurde ein „Cross-over- Experiment“ durchgeführt, bei dem native RNA mittels Proteinase K Verdau /Phenol/Chloroform-Extraktion und FFPE-RNA mittels RNeasy Kit isoliert wurde. Wie erwartet, gelang mittels RNeasy keine Isolation von RNA aus FFPE Material, möglicherweise weil RNA-Moleküle mit einer Länge von weniger als 200 Bp nicht von den RNeasy-Säulen absorbiert werden können. Andererseits zeigten sich bei der nativen RNA, die mittels Proteinase K Verdau /Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert wurde, deutlich höhere CT-Werte bei vier untersuchten TaqMan Assays (BCLxL, STAT-3, GRIM-19

und TBP) als bei nativer RNA, die mit dem RNeasy Kit isoliert wurde (CT-Shift Erhöhung von 40 bis 80%).

4.2.3.3 Länge und Adenosingehalt des Amplifikats

Während der Formalinfixierung kommt es zu einer starken Fragmentierung der RNA und zu chemischen Reaktionen zwischen Nukleinsäuren und Formaldehyd, wobei insbesondere Monomethylgruppen vorzugsweise mit Adenosin, in schwächerer Form auch mit den anderen Basen, reagieren. Es wurde daher ein möglicher Einfluss der Amplikonlänge und des Adenosingehaltes auf die Effizienz der qRT-PCR bzw. auf die „Recovery“ von mRNA's im formalinfixierten Material untersucht. Dazu wurde die Länge der Amplikons (Anzahl der Nukleotide) und der Adenosingehalt mit den jeweiligen CT-Differenzen (FFPE-nativ) der TaqMan Assays korreliert. Der Assay STAT-3 mit der höchsten Anzahl an Nukleotiden (n=142), hatte von allen untersuchten TaqMan Assays die höchste mittlere CT-Differenz mit 5,1 CT's, andererseits zeigte der Cyclin D1 beta Assay mit der zweithöchsten Anzahl an Nukleotiden (n=122) die geringste mittlere CT-Differenz mit 1,8 CT's. Der Adenosingehalt variierte bei den 13 Assays von minimal 12 bis maximal 28 Adeninnukleotide (Mittelwert =19), auch hier zeigte sich keine Korrelation mit den jeweiligen CT-Differenzen (siehe Abbildung 17).

Insgesamt zeigte sich also weder ein Einfluss der Amplikonlänge noch des Adenosin-Gehalts auf die CT-Differenzen bzw die „recovery“ der mRNA im FFPE Material.

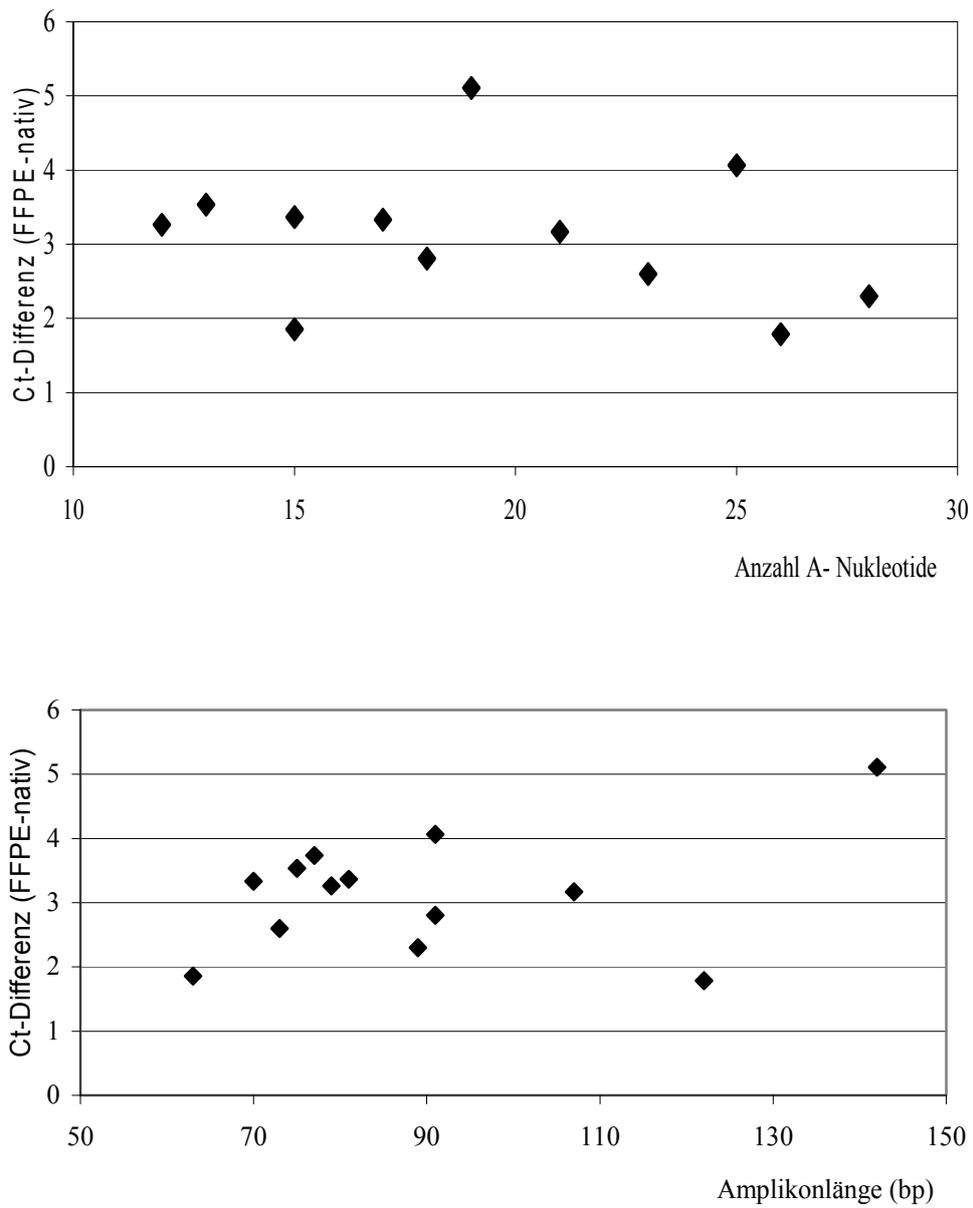


Abbildung 17: Einfluss von Adenosingehalt (oben) und Amplikonlänge (unten) auf CT-Werte.

4.2.3.4 Zeitdauer bis zur Fixierung des Gewebes

Gewebeproben unterliegen unter Praxisbedingungen vor ihrer Fixierung und Einbettung häufig der Autolyse über unterschiedliche Zeiträume. Dabei kann es zur Freisetzung von RNasen aus den Lysosomen und der Degradation der mRNA kommen. Da verschiedene mRNA's möglicherweise nicht im gleichen Maße empfindlich reagieren, würden „stabilere“ mRNA's in quantitativen Genexpressionsstudien in Vergleich zu empfindlicheren mRNA's überschätzt werden. Um einen möglicherweise unterschiedlich hohen Verlust an mRNA's unter Autolysebedingungen zu analysieren, wurde eine standardisierte Autolyse der Zelllinien KMS-12 und Granta 519 mit einer Autolysezeit von jeweils 3 und 6 Stunden imitiert und die Kopienzahlen verschiedener mRNA's nach Autolyse ermittelt und miteinander verglichen.

Nach der Ernte wurden für beide Zelllinien jeweils 3 Zellpellets bestehend aus je 1×10^8 hergestellt. Während aus je einem Zellpellet sofort native RNA isoliert wurde (Zeitpunkt 0), wurden die anderen Zellpellets zur „Autolyse“ für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur unter Luftzutritt gelagert und erst anschließend native RNA isoliert. Die gemessene RNA-Ausbeute war zu den verschiedenen Zeitpunkten ähnlich hoch (Beispiel KMS 12: Zeitpunkt 0 Stunden=15,2µg RNA, Zeitpunkt 3 Stunden=13,3µg RNA, Zeitpunkt 6 Stunden =14,1µg RNA). Anschließend wurden je 1µg RNA in cDNA umgeschrieben und je 10ng cDNA in die TaqMan Analyse (D1 total, D1 alpha, D1 3'UTR, TBP, MCL 1 und BCLxL) eingesetzt. Bei allen Taqman Assay waren die CT-Werte nach 3 bzw. 6 Stunden Autolyse im Bereich des CT-Wert ohne Autolyse (Zeitpunkt 0). Die Ergebnisse der Zelllinien Granta 519 und KMS-12 unterschieden sich nicht. In Abbildung 18 sind exemplarisch die Ergebnisse der Zelllinie Granta 519 dargestellt.

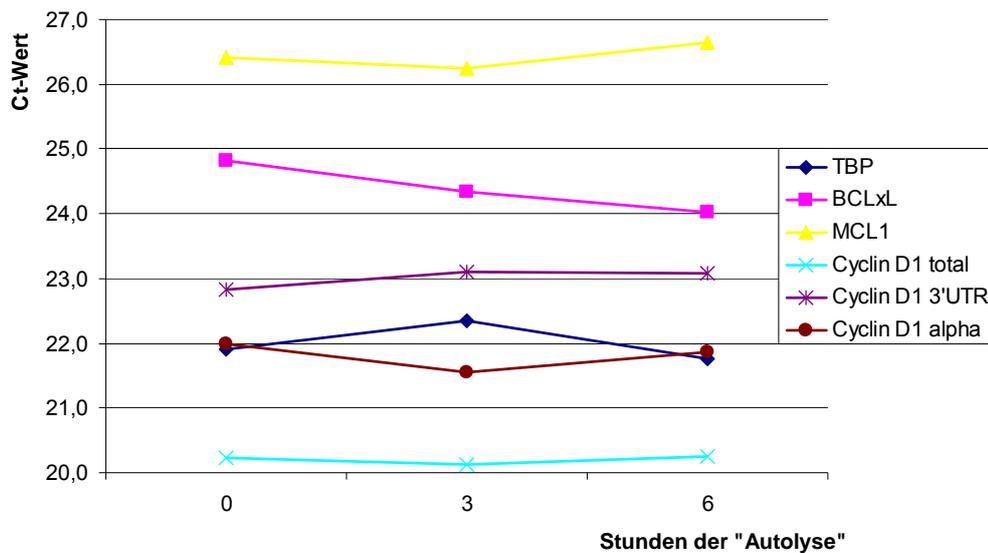


Abbildung 18: Einfluss der „Autolysezeit“ auf CT-Werte.

Obwohl sich im Zellkulturmodell kein Einfluss der Autolysezeit auf die Zugänglichkeit von mRNA's zeigen ließ, ist eine Übertragung der Ergebnisse auf Gewebematerial nur mit Vorsicht vorzunehmen, da sich mit einem Zelllinienmodell wohl nicht gänzlich der komplexe Prozess der Gewebeatolyse imitieren lässt.

4.2.3.5 Zeitdauer des Proteinase K Verdau

Während der Formalinfixierung wird die im Gewebe enthaltene RNA mit Proteinen unter Ausbildung Schiffischer Basen kreuzvernetzt (Stanta et al 1991, Krafft et al 1997). Quervernetzte Proteine werden durch einen Verdau mittels Proteinase K von der RNA entfernt. Die mRNA kann dann der folgenden cDNA Synthese zur Verfügung stehen. Nicht verdaute quervernetzte Proteine können möglicherweise die cDNA Synthese stören. Einen Einfluss auf den Verdau der quervernetzten Proteine hat zum einen die Konzentration der Proteinase K in der Gewebepräparation sowie die zeitliche Dauer der Inkubation mit Proteinase K. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass die Sekundärstruktur der mRNA Moleküle einen Einfluss auf die Effizienz des Proteinase K Verdau hat. Es wurde eine definierte Menge an FFPE-Material (je 3x 8µm dicke Schnitte eines FFPE-Zellblocks) der Zelllinie U266 einem zwei, sechs bzw. sechzehnständigen Proteinase K Verdau unter optimaler Proteinase K Konzentration unterzogen. Die RNA dieser drei Präparationen (PK-2h, PK-6h, PK-16h) wurde anschließend extrahiert und photometrisch vermessen. Die gemessenen RNA Ausbeute war bei den drei Präparationen ähnlich und damit

4. Ergebnisse

unabhängig von der Dauer des PK-Verdau. Je 1 µg RNA wurde anschließend in die cDNA Synthese eingesetzt. Um zu untersuchen, ob die Dauer des Proteinase K Verdau die „recovery“ verschiedener mRNAs unterschiedlich stark beeinträchtigt, wurden die CT Werte der drei cDNA Präparationen (PK-2h, PK-6h, PK-16h) bei gleicher cDNA Menge, für sechs Taqman Assays (TBP, BCLxL, mcl-1, D1 total, D1 3'UTR, D1 alpha) bestimmt. Wie in Abbildung 19 zu sehen, waren die CT-Werte aller sechs TaqMan Assays bei zweistündigem Proteinase K Verdau eindeutig höher als bei 6 bzw. 16-stündigem Proteinase K Verdau, wobei die höheren CT-Werte mit einer geringeren Amplifikationseffizienz gleichzusetzen sind. Die CT-Werte der cDNA Präparationen mit 6,-und 16-stündigem Proteinase K-Verdau waren, im Gegensatz dazu, annähernd gleich. Lediglich für den D1 alpha Assay war die Effizienz der qRT-PCR Reaktion bei 16-stündigem PK Verdau besser als bei sechsstündigem Verdau.

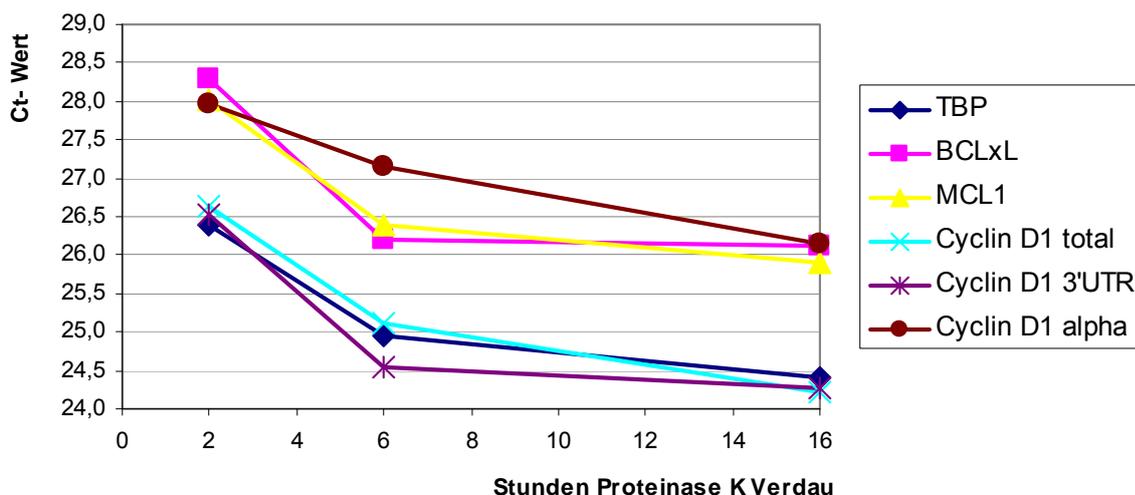


Abbildung 19: Einfluss der Dauer des Proteinase K Verdau auf CT-Werte.

Für einen effizienten Verdau der quervernetzten Proteine reicht daher in den meisten Fällen ein 6-stündiger Proteinase K-Verdau aus. Ein 16-stündiger Verdau ist bei manchen mRNAs allerdings notwendig, um wahrscheinlich komplexere bzw. schlechter zugängliche mRNA-Protein-Komplexe zu lösen. Das in dieser Studie eingesetzte Tumormaterial wurde daher immer einem mindestens 16-stündigen Proteinase K Verdau unterzogen.

4.2.3.6 EDTA-Entkalkung

Während der Aufarbeitung und Einbettung von Knochengewebe (und der in dieser Studie verwendeten Knochenmarksbiopsien) wird der Knochen mit einer EDTA Behandlung entkalkt. Um einen möglichen Einfluss der EDTA-Entkalkung auf die „Recovery“ von mRNAs zu untersuchen, wurde das formalinfixierte Zellkulturmaterial in einem zusätzlichen Experiment einer 24-stündigen EDTA Entkalkung unterzogen. Anschließend wurden die CT-Differenzen (nativ-FFPE) des Experimentes mit EDTA-Entkalkung mit den drei Experimenten ohne EDTA-Entkalkung für die 13 untersuchten TaqMan Assays verglichen. Die durchschnittliche CT-Differenz des Experimentes mit EDTA-Entkalkung war um 0,9 CT's höher als die durchschnittliche CT-Differenz der drei Experimente ohne EDTA-Entkalkung, der Unterschied erwies jedoch als nicht signifikant (4,1 vs. 3,2, $p=0,2$). Dabei zeigten nicht alle TaqMan Assays eine gleichmäßig höhere CT-Differenz. Die deutlichste Zunahme der CT-Differenz bei EDTA-Entkalkung zeigte der Stat-3 Assay mit 2,2 CT's, andere Assays, wie z.B. die verschiedenen variantenspezifischen D1-Assay zeigten hingegen keine wesentliche Abweichung der CT-Differenzen bei zusätzlicher EDTA-Entkalkung. Obwohl sich die „Recovery“ einzelner FFPE-mRNAs unter EDTA-Behandlung verringern kann, scheint die EDTA-Entkalkung kein zu berücksichtigender Faktor bei der Quantifizierung von mRNA's zu sein.

4.3 Expression von Cyclin D1 mRNA Varianten

4.3.1 Auswahl der Primärtumoren

Es wurde das Tumor-Material von 60 multiplen Myelomen, davon 42 Fälle mit und 18 Fälle ohne CyD1mRNA Überexpression in der Studie untersucht. 42 CyD1+Gewebeblöcke von 40 Patienten mit multiplem Myelom wurde für die Quantifizierung der Cyclin D1mRNA Varianten herangezogen. Es handelte sich dabei um 18 Knochenmarksbiopsien und 24 osteolytische Läsionen, die entweder zu diagnostischen Zwecken oder bei pathologischer Fraktur entnommen wurden. Knochenmarksbiopsien mit ausschließlich interstitiellem Infiltrationsmuster der Tumorzellen wurden wegen der technischen Schwierigkeiten bei der Tumorisolierung aus der Studie ausgeschlossen. Die Cyclin D1 Expressionshöhe wurde in mikrodisezierten Tumorzellen mittels quantitativer reverser Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ermittelt. Achtzehn der CyD1+Tumorproben waren bereits Gegenstand einer anderen Studie (Specht et al 2004). Die anderen 24 CyD1+Myelome wurden aus einem Kollektiv von 85 Paraffinblöcken mit unbekanntem Cyclin D1 Status identifiziert. Das Tumormaterial von 18 Paraffinblöcken ohne Cyclin D1 Überexpression wurde, wo sinnvoll, als Kontrolle verwendet. Siebzehn der Patienten mit multiplen Myelom und Cyclin D1 Überexpression waren weiblich und 23 männlich. Der Altersmedian lag bei 61,5 Jahren (37-84 Jahre). Für zwei Patienten mit CyD1+Myelom lagen jeweils zwei Tumorproben vor, die innerhalb eines Zeitraumes von zwei Jahren entnommen wurden (MM 01 bzw. MM17 und MM 26 bzw. MM 35).

4.3.2 Bestimmung eines Schwellenwertes

Zur Bestimmung eines Schwellenwertes für die CyD1mRNA Überexpression wurde die CyD1mRNA Expressionshöhe in acht FFPE-Kontrollgeweben (zwei Tonsillen, ein Lymphknoten, und fünf Knochenmarksbiopsien) mittels qRT-PCR untersucht. Die ermittelte Ratio CyD1/TBP war min. 0,4 bis max. 3,6 (Mittelwert CyD1/TBP= 1,6), der Schwellenwert (Cut-off) betrug 4,9 (MW+3x Standardabweichung). Myelome mit einer Ratio CyD1/TBP über dem Schwellenwert von 4,9 wurden als CyD1+Myelome definiert.

4.3.3 CyD1 mRNA Expressionshöhe der Myelome

Die CyD1mRNA Expressionshöhe wurde für 60 formalinfixierte paraffineingebettete (FFPE) Tumorproben bestimmt. In den Knochenmarksbiopsien wurden die Myelomzellen dazu durch eine laserassistierte Mikrodisektionsmethode isoliert, um eine Kontamination mit Knochenmarkstromazellen zu verhindern. In den osteolytischen Läsionen lagen die Tumorzellen in solider Form vor und mussten daher nicht durch Mikrodisektion angereichert werden. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, lagen die CyD1mRNA Expressionswerte (Ratio D1/TBP) der Tumorproben zwischen minimal 0,6 und maximal 2731,0 und zeigten eine kontinuierliche Verteilung. Bei 42 Tumorproben war die Ratio D1/TBP über dem Cut-off von 4,9, diese wiesen damit definitionsgemäß eine CyD1mRNA Überexpression auf. Bei 18 Tumorproben war die Ratio D1/TBP unter dem Cut-off. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CyD1mRNA Expressionshöhe im Tumorgewebe das aus dem Knochenmark bzw. aus Osteolysen gewonnen wurde (Mittelwert Ratio D1/TBP= 289,9 vs. 180,0, $p=0,9$).

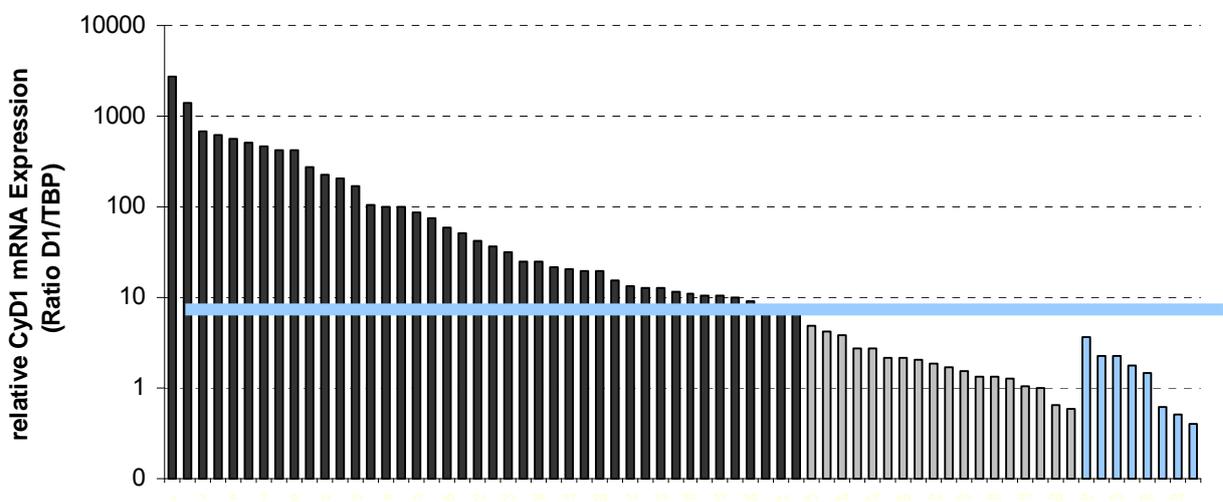


Abbildung 20: Relative CyD1mRNA Expressionshöhe von 60 Tumorproben (MM) und acht Normalgewebekontrollen.

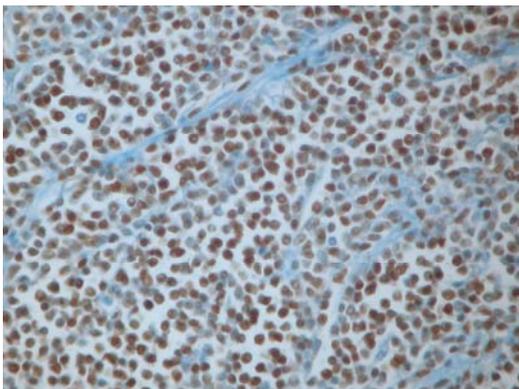
Schwarze Säulen: CyD1+Myelome, grau Säulen: Myelome ohne CyD1mRNA Überexpression, blaue Säulen: Normalgewebekontrollen. Y-Achse: Ratio D1/TBP, logarithmische Skalierung.

4.3.4 Immunhistochemische Ergebnisse

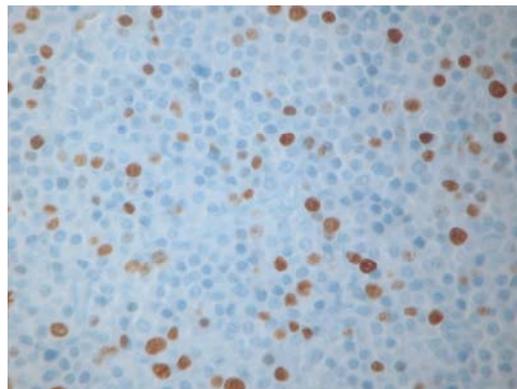
Zum Nachweis der Cyclin D1 Proteinexpression und zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden Schnittpräparate von 41 der 42 CyD1+Myelome und von 18 Myelomen ohne CyD1mRNA Überexpression immunhistochemisch mit dem Cyclin D1 und Ki67 Antikörper angefärbt. In einen Fall (MM 30) war nicht ausreichend Material vorhanden.

4.3.4.1 Cyclin D1 Expression

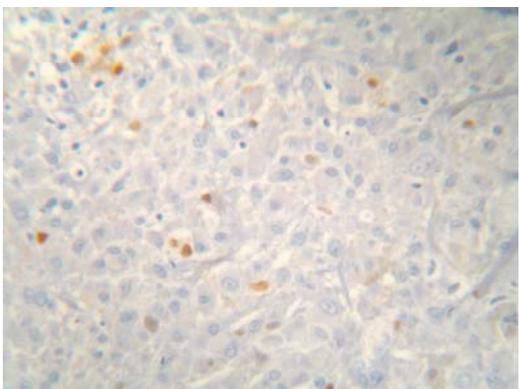
Die Graduierung der Cyclin D1 Proteinexpression wurde wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben vorgenommen. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die unterschiedliche immunhistochemische Färbeintensität von drei CyD1+ Myelomen und einem Myelom ohne CyD1-Expression.



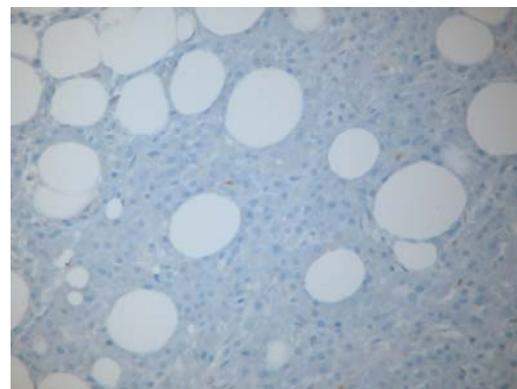
CyD1 +++ (2731)



CyD1 ++ (37)



CyD1 + (25)



CyD1 negativ (7,8)

Abbildung 21: CyD1-Immunhistochemie (in Klammern CyD1mRNA Expressionshöhe)
Oben links: MM01, oben rechts MM22, unten links: MM25, unten rechts: MM40

4. Ergebnisse

Insgesamt 37 der 41 CyD1+Myelome (90,2%) waren immunhistochemisch positiv. Nur drei Myelome zeigten eine nukleäre Anfärbung des CyD1 Proteins in weniger als 10 % der Tumorzellen, und waren somit definitionsgemäß negativ. Insgesamt bestand eine hervorragende Korrelation des immunhistochemischen CyD1 Scores mit der CyD1mRNA- Expressionshöhe ($p < 0,001$) (siehe Tabelle 13). Die Mehrzahl der Myelome ohne CyD1mRNA Überexpression (16/18=89%) wiesen einen CyD1 Score 0 auf, lediglich zwei Fälle hatten einen Score 1+.

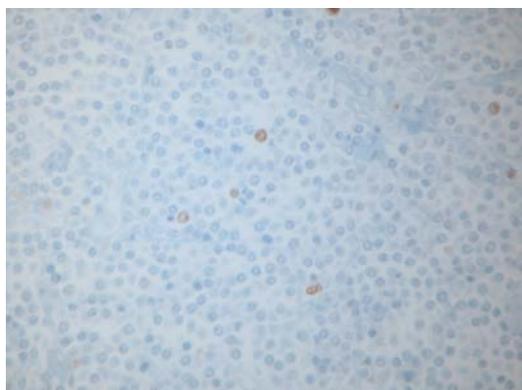
Tabelle 13: Ergebnisse der Immunhistochemie (Score) und der qRT-PCR Analyse (D1/TBP)

	Score 3+	Score 2+	Score 1+	Score 0
CyD1+Myelome (Anzahl)	19	8	12	3
(MW CyD1/TBP)	(504,2)	(37,1)	(17,0)	(12,4)
CyD1 negative Myelome			2	16

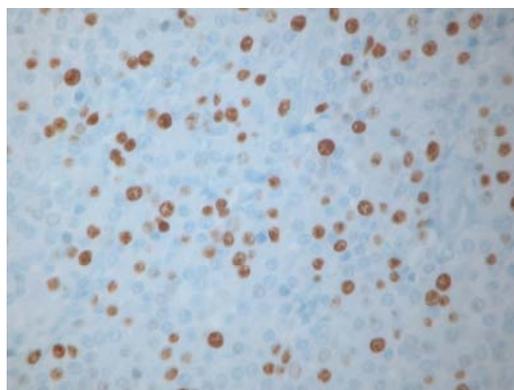
MW= Mittelwert

4.3.4.2 Proliferationsaktivität

Die immunhistochemische Anfärbung der Ki-67 Proteine mit dem MIB 1 Antikörper wurde vorgenommen, um die Proliferationsaktivität der Tumorzellen zu untersuchen. Die Ermittlung des Proliferationsindex erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben. Abbildung 22 zeigt beispielhaft die gefärbten Schnittpräparate von zwei Myelomen mit unterschiedlich hoher Proliferationsaktivität.



3% MIB1 pos.



40% MIB1 pos.

Abbildung 22: MIB-1-Immunhistochemie (links MM26, rechts MM17)

4. Ergebnisse

Die immunhistochemischen Ergebnisse sind im Einzelnen in Tabelle 15 (Seite 83) dargestellt. Die Proliferationsrate zeigte bei den 42 CyD1+Myelomen und bei den 18 Myelomen ohne CyD1mRNA Expression jeweils ein breites Spektrum (%MIB1 pos: 85%-1% bzw. 81%-1%). Die mittlere Proliferationsaktivität war bei den CyD1+Myelomen mit 19,9% geringfügig niedriger als bei den Myelomen ohne CyD1mRNA Überexpression mit 25,8%, der Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant ($p=0,07$). Bei den CyD1+Myelomen bestand keine Korrelation zwischen der CyD1 mRNA Expressionshöhe und der Proliferationsrate ($p=0,48$)

(Abbildung 23). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Proliferationsrate zwischen Tumorgewebe aus Knochenmark und Osteolysen (Mittelwert %MIB1 pos. = 13,7% vs. 24,7% $p=0,2$).

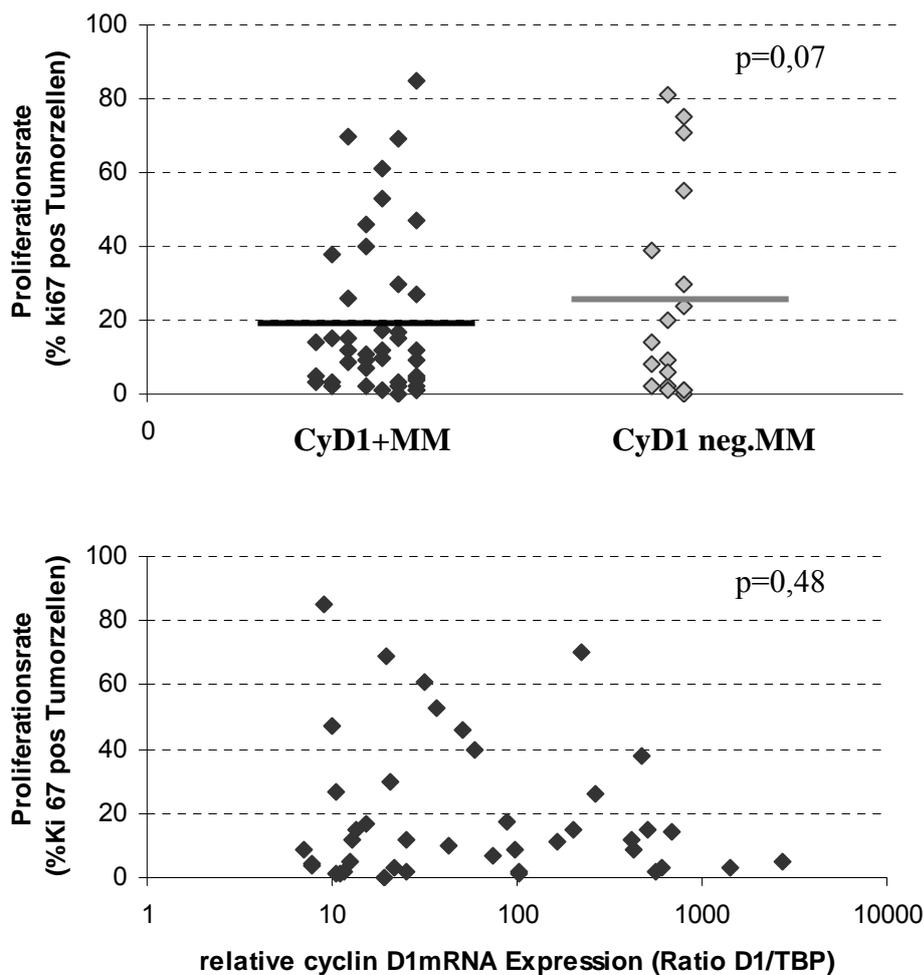


Abbildung 23: Korrelation zwischen der Proliferationsrate und der CyD1mRNA Expressionshöhe
Oben: 42 CyD1+Myelome (links) und 18 CyD1 negative Myelome (rechts). Unten: 42 CyD1+Myelome.

4.3.5 Zytogenetische Alterationen

Im Zusammenhang mit der Überexpression von Cyclin D1 wurden zwei zytogenetische Alterationen des Cyclin D1 Lokus beschrieben, die Translokation t(11; 14)(q13; q32) und die Polysomie von Chromosom 11 (Specht et al 2004).

Es wurden insgesamt 41 der 42 CyD1+Myelome auf das Vorliegen der Translokation t(11; 14) und der Polysomie 11 untersucht. In einem Fall (MM30) war für die FISH Analyse nicht ausreichend Material vorhanden. Für 18 osteolytische Läsionen waren die FISH-Ergebnisse bereits aus der vorhergehenden Studie bekannt (Specht et al 2004). Bei 18 der 42 CyD1+Myelome (43%) konnte die Translokation t(11; 14) nachgewiesen werden. Neun dieser 18 Fälle wiesen neben der Translokation zusätzlich eine Polysomie von Chromosom 11 auf. 20 der 23 CyD1+Myelome ohne Translokation zeigten eine Polysomie von Chromosom 11. Bei drei Fällen konnte weder die Translokation t(11; 14) noch eine Polysomie 11 nachgewiesen werden. Die 18 Kontrollfälle ohne Cyclin D1 Expression wiesen weder eine Translokation noch eine Polysomie 11 auf.

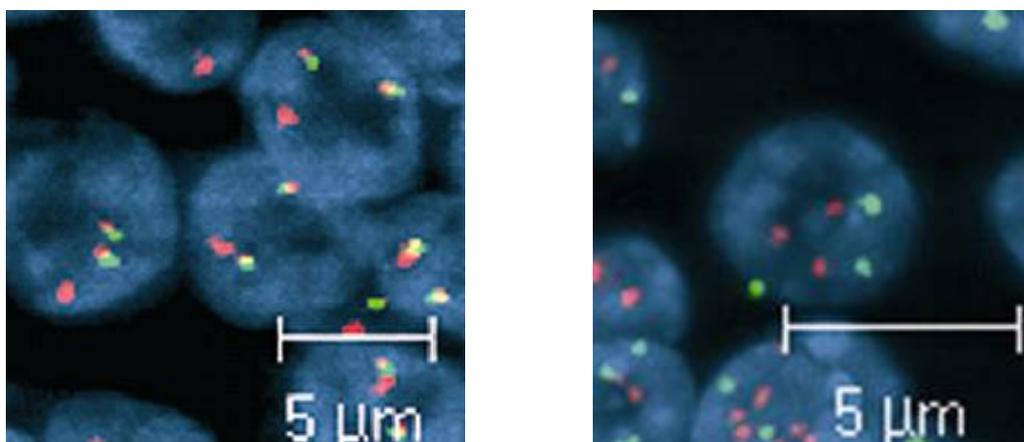


Abbildung 24: FISH: links Translokation t(11;14), rechts Polysomie 11

In

Tabelle 15 sind die die Ergebnisse der FISH, der qRT-PCR und der Immunhistochemie im Einzelnen dargestellt. Die Ergebnisse der sequentiellen Gewebeproben von zwei Patienten (MM 01 bzw. MM 26) entsprachen im Wesentlichen denen der ersten Gewebeproben.

CyD1+Myelome mit Translokation t(11;14) haben hohe CyD1mRNA- Expressionsspiegel

Man geht momentan davon aus, dass es sich bei CyD1+Myelomen mit Translokation t(11; 14) und solchen ohne Translokation um zwei Myelom-Typen handelt, die möglicherweise unterschiedliche biologische und klinische Charakteristiken aufweisen. So war bei den 17 CyD1+Myelomen mit Translokation t(11; 14) (so genannte Gruppe 1) die mittlere CyD1mRNA Expressionshöhe mit 373,2 (Mittelwert Ratio D1/TBP, range 1405,7 bis 51,4) statistisch signifikant höher ($p < 0,001$) als bei den 23 CyD1+Myelomen ohne Translokation (so genannte Gruppe 2) mit 23,8 (Mittelwert Ratio D1/TBP, range 101,8-7,1).

Ebenso bestand eine Assoziation zwischen Vorhandensein einer Translokation t(11; 14) und starker immunhistochemischer Positivität für Cyclin D1. Alle CyD1+Myelome mit Translokation hatten einen immunhistochemischen CyD1-Score 3+, hingegen keines der CyD1+Myelome ohne Translokation ($p < 0,001$). Obwohl sich die mittleren CyD1mRNA Expressionswerte zwischen den Myelomen mit und ohne Translokation t(11;14) hochsignifikant unterschieden, konnte man im Gegensatz zur Immunhistochemie, keinen eindeutigen Trennwert (Ration D1/TBP) definieren, der eine sichere Zuordnung zu den Gruppen 1 bzw. 2 erlaubte (Abbildung 25).

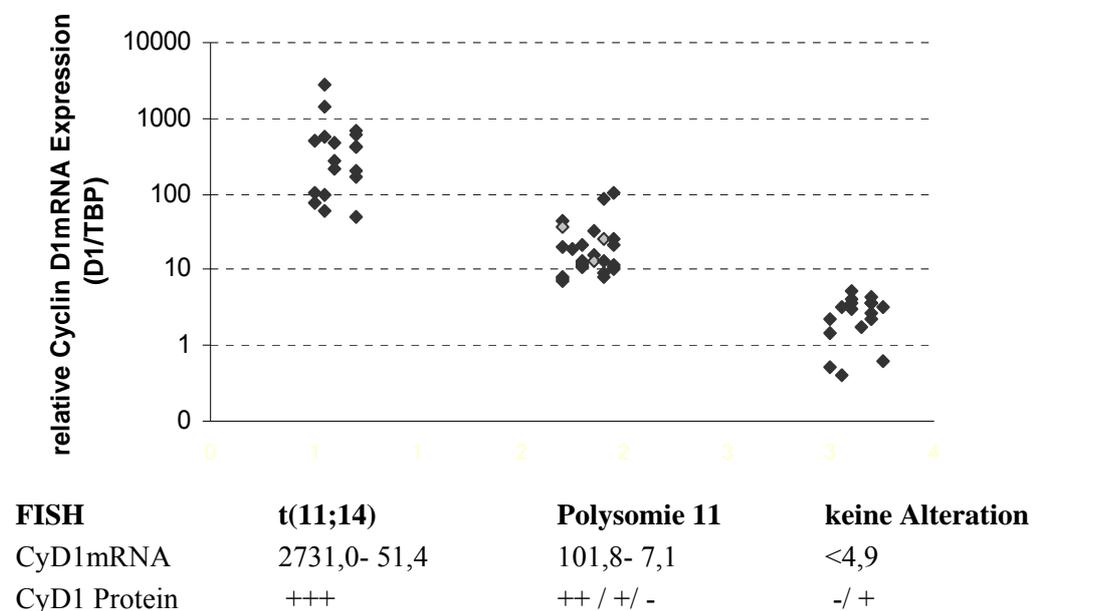


Abbildung 25: Ergebnisse der FISH-Analyse, der qRT-PCR und Immunhistochemie

4.3.6 Expression der 3'UTR defizienten CyD1a mRNA

Es sollte untersucht werden, ob und in welcher Höhe CyD1+Myelome die trunkierte CyD1a mRNA Variante exprimieren. Weiterhin sollte analysiert werden, ob die Expressionshöhe bzw. der prozentuale Anteil der kurzen 3'UTR defizienten CyD1a mRNA einen Einfluss auf die CyD1 Gesamtexpressionshöhe (Ratio D1/TBP), auf die Proliferationsrate (%MIB1 pos) und die Überlebenszeit der Patienten hat.

4.3.6.1 Lymphomzelllinien

Die Expression der Cyclin D1 mRNA Varianten wurde vorerst an einer Serie bereits gut charakterisierter CyD1+B-Lymphom-Zelllinien, zwei CyD1+ MM Zelllinien (KMS-12 und U266) und vier MCL-Zelllinien (Jeko-1, Rec-1, Granta 519 und JVM-2) untersucht.

Dazu wurde vorerst die CyD1 mRNA, -und Proteinexpressionshöhe im nativen Zelllinienmaterial bestimmt. Die CyD1 mRNA Expressionshöhe (Ratio CyD1/TBP) wurde relativ zu der Basisexpressionshöhe der zwei Myelomzelllinien KMS-11 und OPM-2 bestimmt, welche keine 11q13 Alteration aufweisen. Diese Basisexpressionshöhe wurde auf den Wert 1 gesetzt.

Während die beiden MCL-Zelllinien Jeko-1 und Rec-1 ausschließlich 3'UTR defiziente CyD1a mRNA Transkripte exprimierten, zeigten die anderen MCL,-und CyD1+Myelom Zelllinien einen unterschiedlich hohen Anteil an 3'UTR defizienter CyD1a mRNA. Ein hoher Anteil an 3'UTR defizienter CyD1a mRNA korrelierte dabei mit hoher CyD1 mRNA Expression (Ratio CyD1/TBP) (Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,53$) und hoher CyD1 Proteinexpression (siehe Tabelle 14 und Abbildung 26).

Tabelle 14: qRT-PCR Ergebnisse

	Zelllinie	D1/TBP	% 3'UTR defiziente CyD1a mRNA
CyD1+Myelom-Zelllinien	KMS-12	193	74
	U266	327	56
CyD1+MCL-Zelllinien	Jeko-1	365	100
	Rec-1	647	100
	Granta 519	465	97
	JVM-2	49	69
CyD1 negative Myelom-Zelllinien (KMS-11, OPM-2)		1	

Basis- CyD1 mRNA Expressionshöhe (Ratio D1/TBP) der beiden Zelllinien KMS 11 und OPM 1, welche keine 11q13 Alterationen und keine CyD1 Überexpression aufweisen wurde auf den Wert 1 gesetzt.

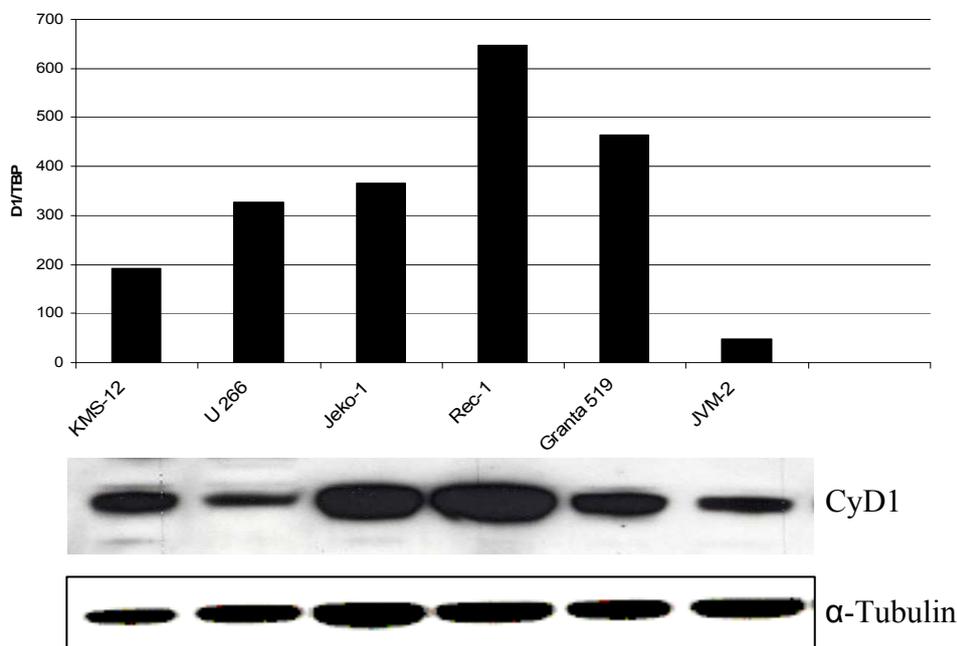


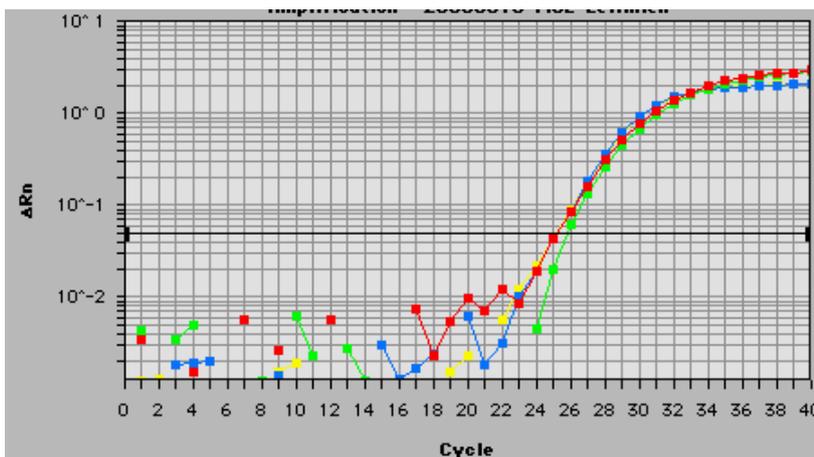
Abbildung 26: Cyclin D1 mRNA,- (oben) und Proteinexpressionshöhe (unten) von CyD1+ Myelom,- und MCL-Zelllinien. Ladekontrolle (α -Tubulin).

4.3.6.2 CyD1+Kontrollgewebe

Die Expressionshöhe der kurzen CyD1a mRNA wurde an 18 Darmepithel-Kontrollen bestimmt. Die CyD1mRNA Expressionshöhe (Ratio D1/TBP) lag zwischen minimal 4,7 und maximal 12,9 (Mittelwert=7,5). Während vier Kontrollgewebe ausschließlich lange CyD1a mRNA exprimierten, zeigte die Mehrzahl der Fälle zu einem variablen Anteil auch kurze CyD1a mRNA (range 0,3%- 58,4%, Mittelwert 23,5%). Dies zeigt, dass kurze 3'UTR defiziente CyD1a mRNA Transkripte auch unter physiologischen Bedingungen exprimiert werden.

4.3.6.3 CyD1+Myelome (Primärtumore)

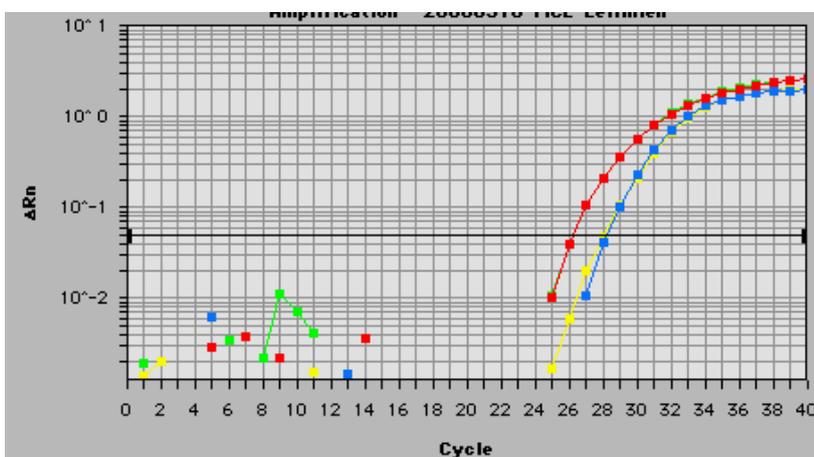
In Abbildung 27 sind exemplarisch die Amplifikationskurven und die berechnete Kopienanzahl des D1 3'UTR,- und D1 total Assays für zwei CyD1+Myelome mit hohem bzw. geringem Anteil an kurzer 3'UTR defizienter CyD1a mRNA Variante dargestellt.



MM 38:

Kopienzahl D1 total: 47.365
D1 3'UTR: 56.984

lange CyD1a mRNA: 100%
kurze CyD1a mRNA: 0 %



MM 17:

Kopienzahl D1 total: 113.965
D1 3'UTR: 18.234

lange CyD1a mRNA: 16%
kurze CyD1a mRNA: 84 %

Abbildung 27: Amplifikationskurven des CyD1 total und CyD1 3'UTR-Assays
Rote und grüne Kurven (CyD1 total), blaue und gelbe Kurven (CyD1 3'UTR)

4. Ergebnisse

Während 6 der 40 CyD1+Myelome (15%) ausschließlich normale, lange CyD1a mRNA Transkripte exprimierten, konnten in 34 Fällen (85%) neben den normalen CyD1a Transkripten kurze 3'UTR defiziente CyD1a Transkripte detektiert werden. Der Anteil der kurzen CyD1a mRNA lag zwischen minimal 3,6% und maximal 97% und war im Mittel 65,6% (siehe Tabelle 15 und 16). Auffallend war, dass mehrere CyD1+Myelome zu einem sehr hohen Anteil 3'UTR defiziente CyD1a Transkripte exprimierten (Anteil max. 97%). So lag bei neun Fällen der Anteil bei mehr als 80%. Ein kompletter Verlust der 3'UTR, wie bei den beiden MCL-Zelllinien Jeko-1 und Rec-1, war bei den untersuchten Myelomen nicht zu beobachten.

Im Mittel war der Anteil an kurzer CyD1a mRNA bei den Myelom-Fällen signifikant höher als bei den Darmepithel-Normalkontrollen. (65,6% vs 23,5%, $p=0,002$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe des Anteils an kurzer CyD1a zwischen Tumorgewebe aus Knochenmark und Osteolysen (% kurze CyD1a mRNA (MW)= 60,5 vs. 52,6, $p=0,1$).

Tabelle 15: Patientendaten und Ergebnisse der qRT-PCR und Immunhistologie von CyD1+Myelomen mit Translokation t(11; 14) (Gruppe 1)

Patientendaten		FISH	Histologie	qRT-PCR		Immunhistologie				
Alter	Geschlecht	Gewebe	t(11,14)	Poly 11	Bartl	DI/TBP	kurze CyD1a mRNA	% MIB 1 pos		
CyD1+ Myelome (Gruppe 1)										
MM 01*	78	m	KM	+	-	I-LP	2731	94	+++	5
MM 02	62	w	OL	+	-	I-LP	1405,7	70	+++	3
MM 03	83	m	KM	+	+	I	695,6	90	+++	14
MM 04	60	w	KM	+	-	I-LP	612,7	89	+++	3
MM 05	61	m	OL	+	-	I-LP	565,6	44	+++	2
MM 06	84	w	KM	+	+	I	510,6	72	+++	15
MM 07	78	w	OL	+	-	I	471	84	+++	38
MM 08	67	w	KM	+	+	II	421,9	92	+++	9
MM 09	61	w	OL	+	+	II	416,5	68	+++	12
MM 10	78	m	OL	+	+	II	267,8	58	+++	26
MM 11	59	m	OL	+	+	II	221,3	71	+++	70
MM 12	50	m	OL	+	-	I-LP	204	61	+++	15
MM 13	37	m	OL	+	+	I-LP	165,9	57	+++	11
MM 14	76	w	OL	+	-	I	103,5	64	+++	2
MM 15	55	m	KM	+	+	I	97,7	60	+++	9
MM 16	66	m	KM	+	-	I	74,3	0	+++	7
MM 17*	77	m	OL	+	-	II	58,9	84	+++	40
MM 18	65	w	KM	+	+	II	51,4	0	+++	46

Abkürzungen: W:weiblich, M: männlich, KM:Knochenmark, OL:osteolytische Läsion, ND:nicht durchgeführt, KA:keine Alteration,** sequentielle Proben von einem Patienten (*Patient X, "Patient Y)

Tabelle 16: Patientendaten und Ergebnisse der qRT-PCR und Immunhistologie von CyD1+Myelomen ohne Translokation t(11;14) (Gruppe 2)

Patientendaten			FISH	Histologie	TaqMan	Immunhistologie			
Alter	Geschlecht	Gewebe	t(11,14)	Poly 11	Bartl	DI/TBP	% kurze CyD1a mRNA	CyD1	% MIB 1 pos
CyD1+ Myelome (Gruppe 2)									
MM 19	m	KM	-	+	I	101,8	79	++	1
MM 20	m	KM	-	+	II	88,1	35	++	18
MM 21	w	OL	-	+	II	43	76	+	10
MM 22	m	OL	-	-	II	36,5	12	++	53
MM 23	m	OL	-	+	II	31,7	0	++	61
MM 24	w	OL	-	-	I	25,4	58	++	12
MM 25	m	OL	-	+	II	25	64	+	2
MM 26"	w	KM	-	+	II	21,8	80	+	3
MM 27	m	OL	-	+	I	20,7	73	++	30
MM 28	m	KM	-	+	II	19,8	63	+	69
MM 29	m	KM	ND	ND	I	19,3	97	NA	NA
MM 30	w	KM	-	+	II	15,3	45	+	17
MM 31	m	OL	-	+	II	13,3	61	+	15
MM 32	w	KM	-	-	II	12,7	4	+	12
MM 33	w	OL	-	+	I	12,5	76	-	5
MM 34	m	OL	-	+	II	11,5	46	+	2
MM 35"	w	KM	-	+	II	11,1	0	++	1
MM 36	w	OL	-	+	I	10,6	0	+	1
MM 37	m	OL	-	+	I	10,6	37	+	27
MM 38	w	OL	-	+	II	10	0	++	47
MM 39	w	OL	-	+	II	9	47	++	85
MM 40	m	KM	-	+	II	7,8	93	-	4
MM 41	m	KM	-	+	I	7,7	92	-	5
MM 42	m	KM	-	+	II	7,1	65	+	9

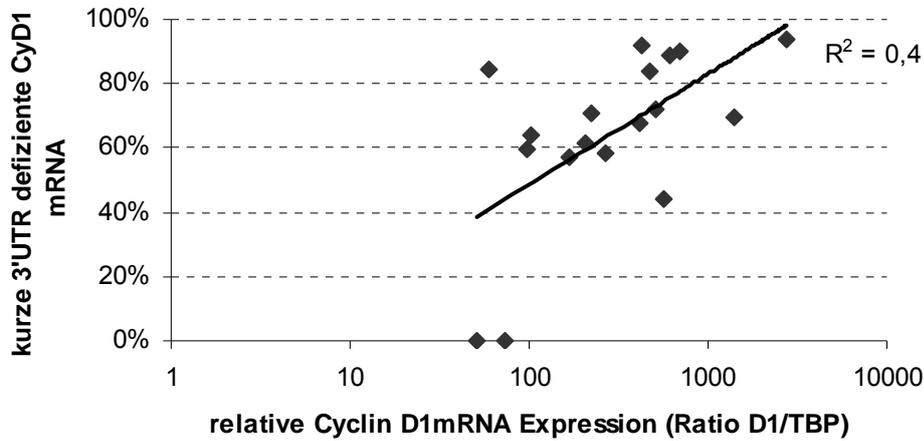
Abkürzungen: W:weiblich, M: männlich, KM:Knochenmark, OL:osteolytische Läsion, ND:nicht durchgeführt, KA:keine Alteration,*" sequentielle Proben von einem Patienten (*Patient X, "Patient Y)

4.3.6.4 Korrelation mit genomischen Alterationen und der CyD1mRNA Gesamtexpression

Der mittlere Anteil an kurzer CyD1a mRNA bei 17 CyD1+Myelom-Patienten mit Translokation t(11;14) unterschied sich nicht signifikant von den 23 CyD1+Myelom-Patienten ohne Translokation (64,3% vs. 50,14%, $p=0,26$). Dies deutet darauf hin, dass der Verlust der 3'untranslatierten Region der CyD1 mRNA nicht im direkten Zusammenhang mit der Translokation t(11;14) steht. Ein möglicher Einfluss des Anteils an kurzer CyD1a mRNA auf die CyD1 Expressionshöhe (Ratio D1/TBP) wurde getrennt in Myelomen mit und ohne Translokation t(11; 14) analysiert.

Bei den 17 CyD1+ Myelomen mit Translokation t(11;14) zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen einem hohen Anteil an kurzer CyD1a mRNA und hoher CyD1mRNA Expression ($p=0,03$). Hingegen konnte bei den 23 CyD1+Myelomen ohne Translokation t(11;14) keine Korrelation zwischen der Höhe des Anteils an kurzer CyD1a mRNA mit der CyD1mRNA Expressionshöhe nachgewiesen werden ($p=0,9$) (siehe Abbildung 28).

CyD1+Myelome mit Translokation t(11;14)



CyD1+Myelome ohne Translokation t(11;14)

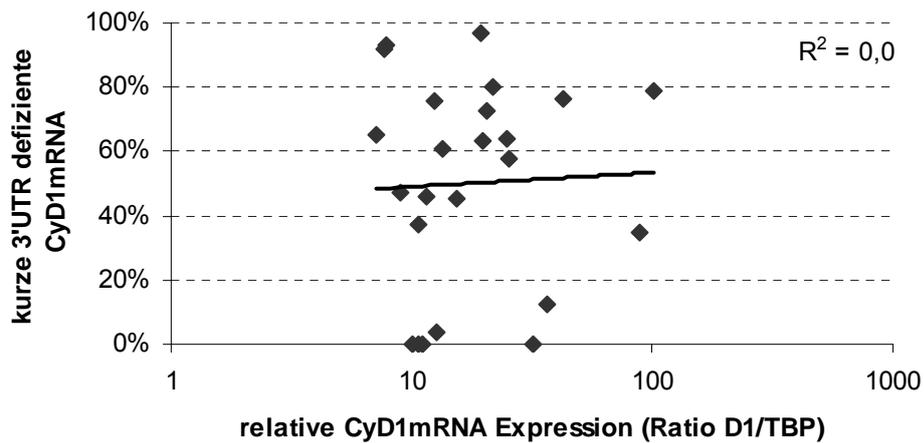


Abbildung 28: Korrelation zwischen dem Anteil an kurzer CyD1a mRNA und der CyD1mRNA Expressionshöhe oben: Myelome mit Translokation t(11;14), unten: Myelome ohne t(11;14)

4.3.6.5 Korrelation mit der Proliferationsrate

Weder bei den CyD1+Myelomen mit Translokation t(11;14) noch bei den CyD1+Myelomen ohne Translokation t(11;14) zeigte sich eine Korrelation zwischen der Höhe des Anteils an kurzer CyD1a mRNA oder der CyD1mRNA Expressionshöhe mit der Proliferationsrate (Abbildung 29).

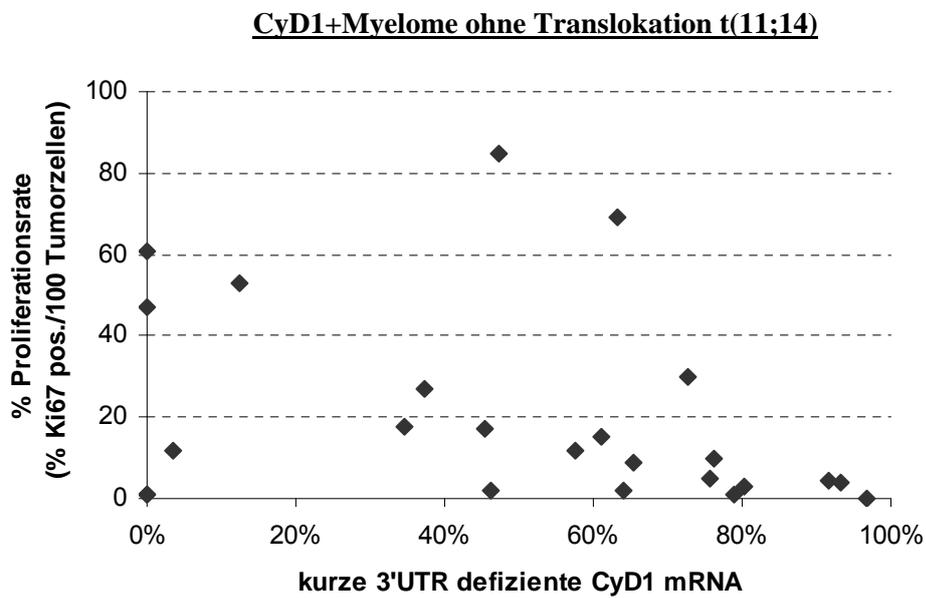
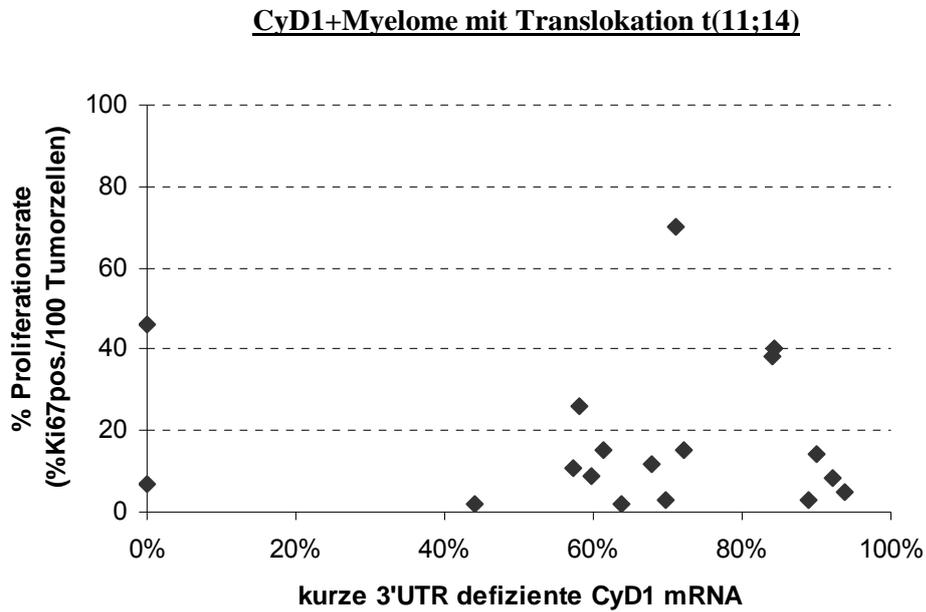


Abbildung 29: Korrelation zwischen dem Anteil an kurzer CyD1a mRNA und der Proliferationsrate bei 17 CyD1+ Melomen mit Translokation t(11;14) (oben) und 23 CyD1+Myelomen ohne t(11;14) (unten).

4.3.6.6 Korrelation mit der Überlebenszeit

Obwohl die Expressionshöhe an kurzer CyD1a mRNA scheinbar keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Tumorzellen hat, sollte ein möglicher Einfluss auf die Überlebenszeit untersucht werden. Dazu wurden die klinischen Daten von 16 der 17 CyD1+Myelompatienten mit t(11; 14)+ Myelom ausgewertet. Bei einem Patienten (MM 06) standen die klinischen Daten nicht zur Verfügung. Je acht der 16 Patienten waren Frauen bzw. Männer, bei Erstdiagnose war das Erkrankungsalter 65,5 Jahre (Median, range 37 bis 84 Jahre). Die mittlere retrospektive Beobachtungszeit betrug 40,8 Monate (Median 27 Monate, range 0-180 Monate). Zwölf der 16 Patienten (75%) waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung (Mai 2006) aufgrund Ihrer Erkrankung verstorben. Mittels Kaplan-Meier-Überlebensanalyse wurde die Überlebenszeit von 6 Patienten mit einem hohen Anteil an 3'UTR defizienter CyD1mRNA ($\geq 78\%$) verglichen mit 10 Patienten mit geringem Anteil an 3'UTR defizienter CyD1 mRNA ($<78\%$). Der Schwellenwert von 78% wurde mittels ROC-Analyse ermittelt und diskriminierte Patienten mit „langer“ Überlebenszeit (>27 Monate) von solchen mit „kurzer“ Überlebenszeit am besten. Patienten, deren Tumore $\geq 78\%$ kurze CyD1a mRNA zeigten, wurden als „3'UTR low“-Patienten und solche mit $<78\%$ als „3'UTR high“-Patienten definiert. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, konnte kein Einfluss des Anteils an kurzer CyD1a mRNA auf die Überlebensdauer bei 16 Patienten ermittelt werden ($p=0,40$).

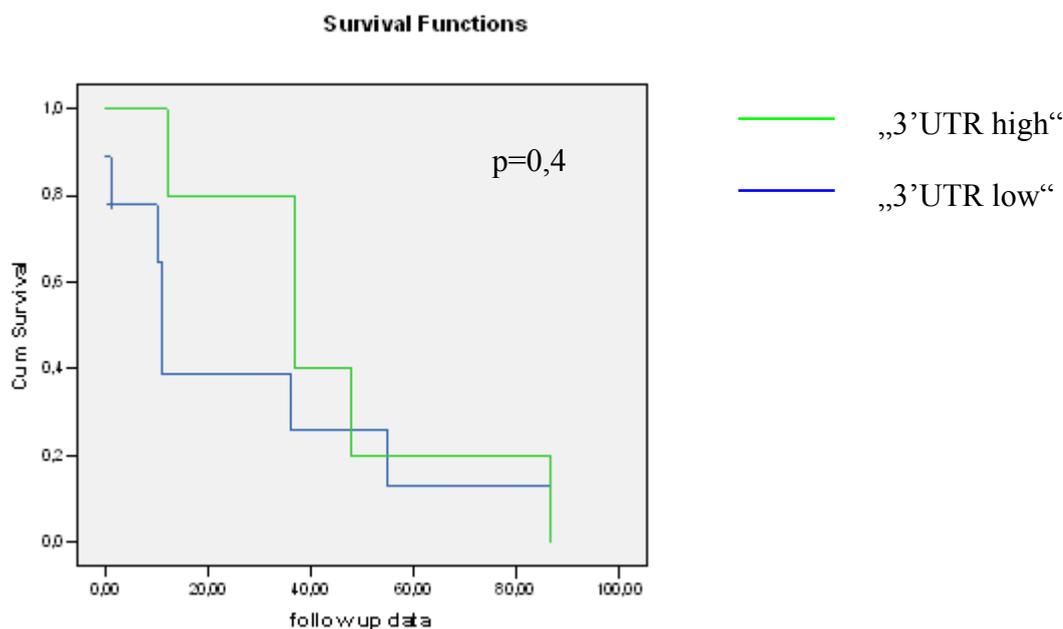


Abbildung 30: Kaplan-Meier Überlebensanalyse. X-Achse: Zeit in Monaten

4.3.7 Genomische Alterationen des CyD1-3'UTR Lokus

Die Ursache des Verlustes der 3'untranslatierten Region der CyD1 mRNA ist beim Myelom bisher unbekannt. Der Verlust der 3'UTR kann, wie beim Mantelzell-Lymphom beschrieben, durch eine genomische Deletion des 3'UTR Lokus oder durch eine Mutation, welche mit einer alternativen Polyadenylierung einhergeht, verursacht werden (Wiestner et al 2007). Daher wurden alle Lymphomzelllinien und CyD1+Myelome mit hohem Anteil an 3'UTR defizienter CyD1a mRNA (>70%) auf das Vorliegen einer 3'UTR Deletion bzw. Mutation untersucht.

4.3.7.1 Genomische qRT-PCR

Zum Nachweis einer Deletion des 3'UTR Lokus wurde die quantitative (q)-PCR eingesetzt. Es wurden insgesamt 19 CyD1+Myelome untersucht. Dreizehn der 19 CyD1+Myelome exprimierten prädominant kurze CyD1a mRNA, 6 zeigten keine bzw. nur geringe Expression der kurzen CyD1a mRNA, letztere dienten als Kontrollen. Daneben wurden die Zelllinien KMS-12, Rec-1, Jeko-1 und Granta 519 untersucht, DNA von letzteren beiden Zelllinien wurden als Kontrolle in jeder Analyse mitgeführt.

Eine Deletion des genomischen 3'UTR Lokus wurde bei der MCL-Zelllinie Jeko-1 beobachtet, eine der beiden MCL-Zelllinien, die ausschließlich kurze 3'UTR defiziente CyD1a mRNA exprimiert. Hingegen ergab sich für die anderen Zelllinien und auch keines der untersuchten primären CyD1+Myelome ein Hinweis auf einen genomischen 3'UTR Verlust (siehe Tabellen 18 und 19). Erwähnenswert ist, dass mit den qPCR Ergebnissen überwiegend sehr gut die FISH Ergebnisse bestätigt werden konnten. So zeigte die Mehrzahl der CyD1+Myelome mit Polysomie 11 einen Zugewinn des CyD1 3'UTR Lokus bzw. des beta Globin Lokus (jeweils auf Chromosom 11) im Vergleich zum SOCS 1 Lokus (Chromosom 16). Lediglich bei drei Fällen (MM 03, MM 41 und MM 34) bestand eine scheinbare Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der qPCR und der FISH-Analyse.

Tabelle 17: Ergebnisse der quantitativen genomischen PCR-Analyse bei CyD1+Myelomen mit Translokation t(11;14)

	FISH		qRT-PCR		Genomische qPCR				Interpretation
	t(11,14)	11	% kurze CyD1a	CyD1 3'UTR/ beta globin	CyD1 3'UTR/ SOCS 1	CyD1 3'UTR/ SOCS 1	β-Globin/ SOCS 1		
Normalgewebe	-	-	36%	1	1	1	1	1	Nein
CyD1+MM (Gruppe 1)									
MM 08	+	+	92%	1	2,3	2,3	2,3	2,3	Nein
MM 03	+	+	90%	1,1	0,9	0,8	0,8	0,8	?
MM 04	+	-	89%	0,8	0,9	1,1	1,1	1,1	Nein
MM 07	+	-	84%	1,8	1,4	0,8	0,8	0,8	Nein
MM 17	+	-	84%	1,2	1,7	1,5	1,5	1,5	Nein
MM 06	+	+	72%	1,6	1,7	1,1	1,1	1,1	Nein
MM 11	+	+	71%	1,8	1,2	0,7	0,7	0,7	Nein
MM 16	+	-	0%	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	Nein

? nicht informativ

Tabelle 18: Ergebnisse der quantitativen genomischen PCR-Analyse bei CyD1+Myelomen ohne Translokation t(11;14), Myelom,-und MCL-Zelllinien

	FISH		qRT-PCR		Genomische qPCR				Interpretation	
	t(11,14)	Poly 11	% kurze CyD1a	CyD1 3'UTR/ beta globin	CyD1 3'UTR/ SOCS 1	β- Globin/ SOCS 1				
CyD1+MM (Gruppe 2)										
MM 41	-	+	92%	1,1	0,7	0,7	0,7	?		
MM 19	-	+	79%	1,1	1,3	1,1	1,1	Nein		
MM 21	-	+	76%	1	1,5	1,4	1,4	Nein		
MM 27	-	+	73%	1,2	1,7	1,4	1,4	Nein		
MM 42	-	+	65%	0,9	1,5	1,5	1,5	Nein		
MM 28	-	+	63%	1,2	1,7	1,4	1,4	Nein		
MM 34	-	+	46%	1,1	1	0,9	0,9	?		
MM 20	-	+	35%	1,1	1,3	1,1	1,1	Nein		
MM 22	-	+	12%	1	1,5	1,4	1,4	Nein		
MM 38	-	+	0%	1	1,3	1,4	1,4	Nein		
MM 23	-	+	0%	1,3	1	0,8	0,8	Nein		
Zelllinien										
KMS-12	+	-	74%	1,1	1	1,1	1,1	Nein		
Rec-1	+	-	100%	1,1	0,9	1,2	1,2	Nein		
Jeko-1	+	-	100%	0,5	0,5	1	1	Ja		
Granta 519	+	-	90%	1	0,9	0,9	0,9	Nein		

? nicht informativ

4.3.7.2 Sequenzierung des CyD1 3'UTR-Lokus

Es wurden jeweils zwei Abschnitte des 3'UTR von insgesamt 12 CyD1+Myelomen, welche prädominant kurze CyD1a mRNA exprimierten und von den Zelllinien Granta 519, Rec-1 und KMS- 12 sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der humanen Cyclin D1 Sequenz verglichen. Weder bei den CyD1+Myelomen noch bei den Myelom,-oder MCL-Zelllinien zeigte sich eine Abweichung von der publizierten Cyclin D1 Sequenz (Genbank NM_053056).

4.3.8 Expression der Spleißvariante CyD1b mRNA

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die Bestimmung der Expressionshöhe der Spleißvariante CyD1b mRNA in Lymphomzelllinien und CyD1+Myelomen. Es sollte untersucht werden, ob die Expression dieser mRNA Variante eine pathogenetische Rolle beim CyD1+Myelom hat und insbesondere, ob die Höhe des CyD1 beta Anteils (%) einen Einfluss auf die Proliferationsaktivität der Myelomzellen hat. Weiterhin sollte die Möglichkeit eines Einflusses des A870G Polymorphismus auf die Höhe der CyD1b mRNA Expression untersucht werden.

4.3.8.1 Lymphomzelllinien

Die Spleißvariante CyD1b mRNA wurde von den meisten untersuchten Zelllinien nur zu einem sehr geringen, z.T kaum messbaren Anteil exprimiert. Die beiden Lymphomzelllinien KMS-12 und Jeko-1 mit dem höchsten Anteil an CyD1b mRNA waren an Position A870G des CyD1 Gens homozygot für das A-Allel (Tabelle 19).

Tabelle 19: qRT-PCR Ergebnisse in Zelllinien

	Zelllinie	D1/TBP	% CyD1b mRNA	A870G
CyD1+Myelom-Zelllinien				
	KMS-12	193	7,4	AA
	U266	327	1,6	AG
CyD1+MCL-Zelllinien				
	Jeko-1	365	4,7	AA
	Rec-1	647	0,2	AG
	Granta 519	465	1,2	AA
	JVM-2	49	7	AG
CyD1 neg. Myelom-Zelllinien (KMS-11, OPM-2)				
		1		

Die Basis-CyD1 mRNA Expressionshöhe (Ratio D1/TBP) der beiden Zelllinien KMS 11 und OPM 1, welche keine 11q13 Alterationen und keine CyD1 Überexpression aufweisen, wurde auf den Wert 1 gesetzt.

4.3.8.2 CyD1+ Kontrollgewebe

Die Expression der Spleißvariante CyD1b mRNA wurde an 18 Darmepithel-Kontrollen untersucht. In 9 Kontrollfällen waren die CT-Werte für den Cyclin D1 beta Assay jeweils >35 und nicht reproduzierbar. Hingegen zeigten neun der 18 Kontrollfälle (50%) reproduzierbare Ct-Werte zwischen 30 und 35, der entsprechende Anteil an CyD1 beta mRNA an den gesamten CyD1mRNA Transkripten war jedoch auch relativ gering und betrug maximal 4,6% (Mittelwert 1,5%, range 0,2-4,6%).

4.3.8.3 CyD1+Myelome (Primärtumore)

29 der 40 CyD1+Myelome (73%) exprimierten neben der CyD1a mRNA zu einem meist geringen Anteil die Spleißvariante CyD1b mRNA (Mittelwert: 6,8%, range 1,4-43,6%). Bei 6 dieser 29 Fälle war der Anteil an CyD1b mRNA >10%. Elf der 40 CyD1+Myelome (28%) exprimierten ausschließlich CyD1a mRNA, der Anteil an CyD1b mRNA betrug jeweils weniger als 1%. Der mittlere Anteil an CyD1b mRNA war im Kontrollgewebe geringfügig niedriger als im Tumorgewebe, der Unterschied erwies sich jedoch als nicht statistisch signifikant (1,5% vs. 6,8%, $p=0,07$).

4.3.8.4 Korrelation mit dem Genotyp A870G

Der Genotyp A870G wurde für 42 CyD1+Myelome, die Lymphomzelllinien und 18 CyD1+Normalgewebekontrollen mittels RFLP bestimmt. Abbildung 31 zeigt exemplarisch die Gelbilder der unverdauten (links) und mit dem Restriktionsenzym NCI I verdauten (rechts) PCR Produkte.

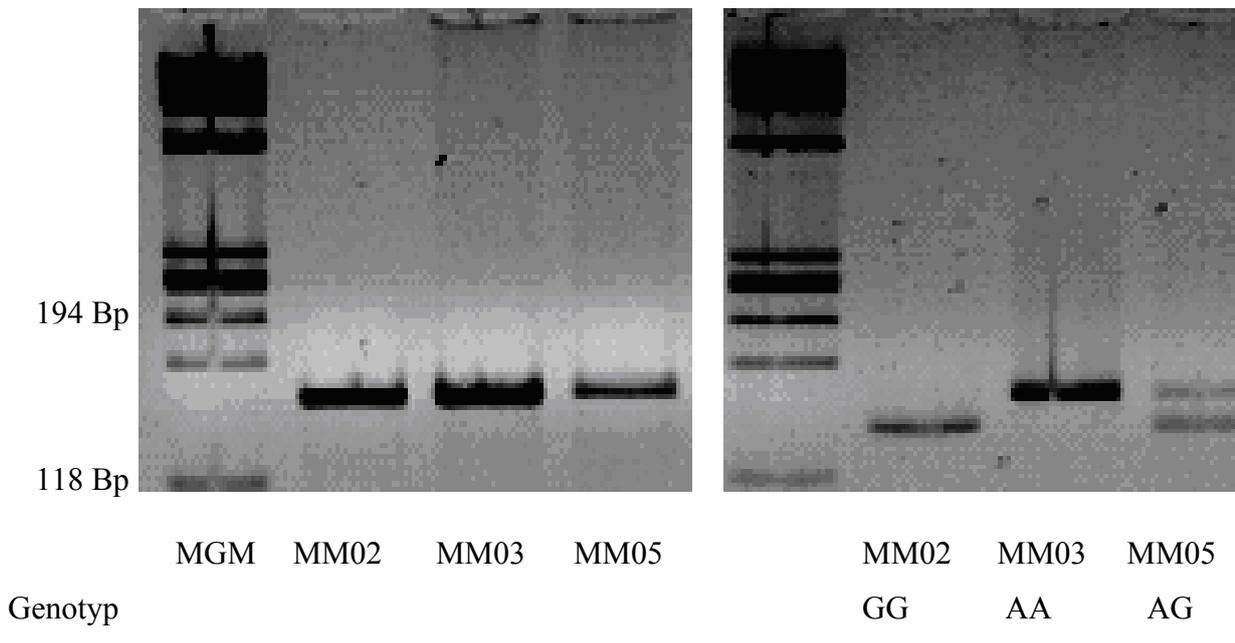


Abbildung 31: Gelelektrophoresebilder vor (links) und nach NCI I Verdau (rechts)
 MGM: Molekulargewichtsmarker

Elf der 40 CyD1+Myelompatienten (28%) waren homozygot für das A-Allel, 15 Patienten (38%) waren homozygot für das G-Allel und 14 Patienten (35%) waren heterozygot. CyD1+Myelome mit homozygotem A-, bzw. G-Allel oder Heterozygotie unterschieden sich weder bezüglich der CyD1mRNA Expressionshöhe (D1/TBP) noch bezüglich der Proliferationsrate (D1/TBP: 178,9 vs. 214,9, vs 127,8, $p=0,7$, %MIB 1 pos: 19% vs 19% vs 23%, $p=0,9$).

Eine Korrelation des Anteils an CyD1b mRNA mit dem Genotyp (A870G) wurde für die 29 CyD1+Myelome vorgenommen, die einen Anteil an CyD1b mRNA >1% aufwiesen.

Acht der 29 CyD1+Myelome (28%) waren homozygot für das A-Allel, 12 Fälle (41%) waren heterozygot und 9 Fälle (31%) waren homozygot für das G-Allel. Der mittlere CyD1b mRNA Anteil war bei den homozygoten AA-Myelomen 15,3%, bei den heterozygoten Myelomen 3,9% und bei den homozygoten GG-Myelomen 3,3% (siehe Abbildung 32). Somit war der CyD1b Anteil bei homozygotem A-Allel um das 3,9 fache höher ($p=0,04$) als bei Heterozygotie bzw. um das 4,6 fache höher ($p=0,08$) als bei homozygotem G-Allel.

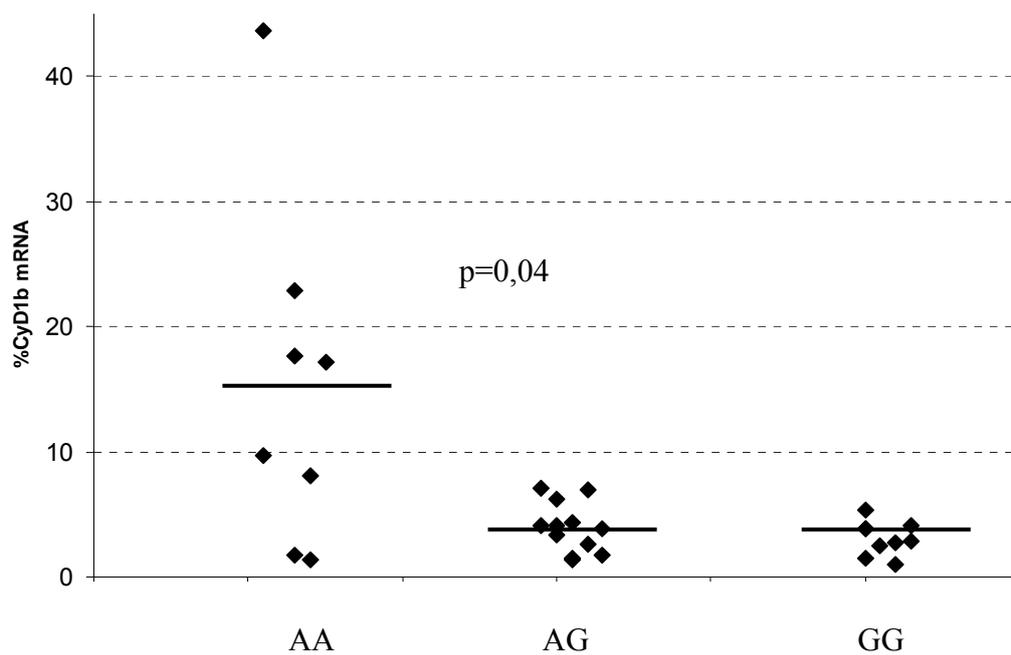


Abbildung 32: Korrelation zwischen der Höhe des CyD1beta mRNA Anteils (%) und dem Genotyp A870G. Balken: Mittelwert % CyD1b mRNA

4.3.8.5 Korrelation mit der Proliferationsrate

Es zeigte sich bei den 29 Myelomen mit einem Anteil CyD1b mRNA >1% keine Korrelation der Höhe des Anteils an CyD1b mRNA mit der Proliferationsrate (Korrelationskoeffizient $R^2=0,0$). ($R^2=0,1$) (siehe Abbildung 33). Auch zeigten sich keine Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen Myelomen mit CyD1b mRNA Expression (>1%) und Myelomen ohne (messbare) CyD1b mRNA Expression (<1%) (%MIB1: 17,7% vs. 21,8%)

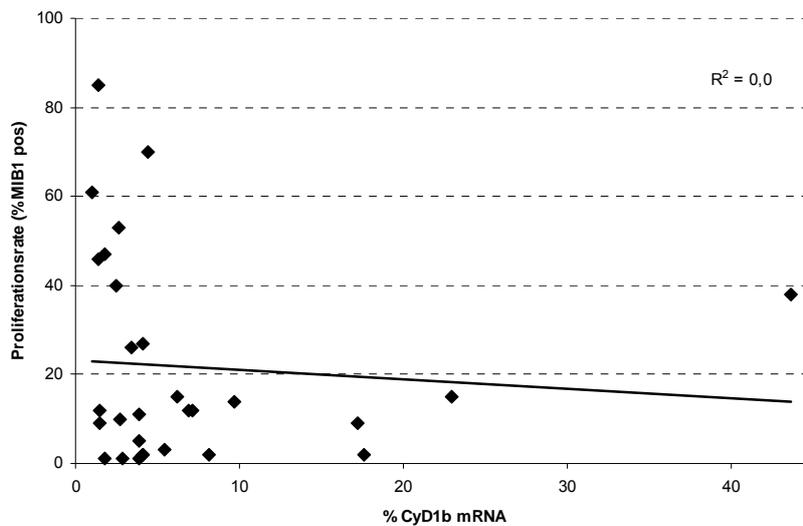


Abbildung 33: Korrelation zwischen CyD1 b mRNA Expression und Proliferationsrate.

4.3.9 Morphologie (Bartl-Klassifikation)

Die 42 CyD1+Myelome und 18 Myelome ohne CyD1 mRNA Überexpression wurden von drei Fachärzten für Pathologie (Prof.Dr.F.Fend, Dr.M.Kremer und Dr.L.Quintanilla-Fend) nach der histologischen Klassifikation nach Bartl evaluiert (Bartl et al 1987). Die Grade I und II wurden in etwa gleicher Häufigkeit, Bartl Grad III wurde nicht diagnostiziert (siehe Tabelle 20).

Myelome mit Bartl-Grad I-Morphologie haben nach Angaben der Literatur eine günstigere Prognose als Myelome mit Bartl Grad II-Morphologie (Fonseca et al 2007). In Übereinstimmung damit war die Proliferationsrate bei den Myelomen mit Bartl Grad I-Morphologie signifikant geringer als bei denen mit Grad-II-Morphologie (%MIB1 pos: 15% vs 27%, $p=0,03$). Die Proliferationsrate des lymphoplasmazytoiden Subtyps unterschied sich nicht von der des Marschalko-Subtyps (6,5% vs 12,8%, $p=0,42$).

Tabelle 20: Häufigkeit der Bartl Grade I, II und III

	Bartl Grad I	Bartl Grad II	Bartl Grad III	Gesamt
CyD1+Myelome	20 (48%)	22 (52%)	0	42
Myelome ohne CyD1 mRNA Überexpression	7 (39%)	11 (61%)	0	18
Gesamt	27	33	0	60

Korrelation mit der Expressionshöhe von *CylinD1* und *CyD1mRNA* Varianten

Die 20 Bartl Grad I-Myelome hatten signifikant höhere *CyD1mRNA* Expressionswerte als Bartl Grad II-Myelome (Mittelwert D1/TBP= 392,3 vs. 81.8, $p=0,03$), wobei auffallend war, dass der kleinzellige Subtyp (small/ lymphoplasmozytoid) signifikant höhere *CyD1mRNA* Expressionspiegel zeigte als der Marschalko-Subtyp (Mittelwert Ratio D1 /TBP= 947,5 vs. 154,4, $p=0,003$) (siehe Abbildung 34).

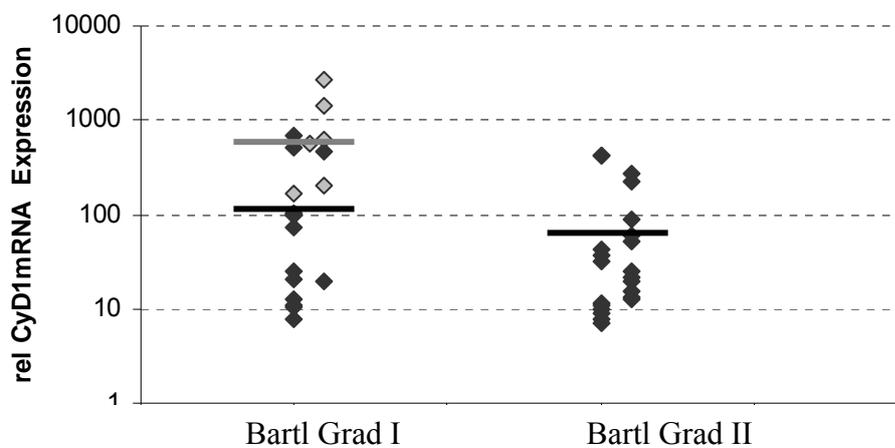


Abbildung 34: *CyD1* mRNA Expressionshöhe bei Grad I- und Grad II-Morphologie nach Bartl.
Graue Rauten: Grad I Myelome mit kleinzelligem Subtyp (Typ 2). Balken: mittlere Ratio D1/TBP

Die Höhe des Anteils an 3'UTR defizienter *CyD1a* mRNA war bei den Grad I-Myelomen mit 64,8% geringgradig höher als bei den Grad II-Myelomen mit 48,5%, der Unterschied erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant ($p=0,2$). Hingegen war der der mittlere Anteil an *CyD1b* mRNA bei den Myelomen mit Grad I-Morphologie signifikant höher als bei Myelomen mit Grad II-Morphologie (9,6% vs 4,2%, $p=0,04$). Die lymphoplasmozytoide Morphologie war weder mit der Expression der kurzen *CyD1a* mRNA noch mit Expression der *CyD1b* mRNA assoziiert.

5. Diskussion

5.1 Besonderheiten bei der Etablierung von TaqMan Assays zur mRNA Quantifizierung im FFPE Material

In den vergangenen Jahren hat die Untersuchung von Genexpressionsraten in der biomedizinischen Forschung mehr und mehr an Bedeutung gewonnen. Die Quantifizierung der Genexpression konnte dabei durch die Entwicklung hochsensitiver molekularbiologischer Verfahren, wie der quantitativen **Real-Time(RT)-Polymerasekettenreaktion (PCR)**, in zahlreichen Labors routinemäßig etabliert werden. Viele eigene Erfahrungen und Untersuchungen anderer haben gezeigt, dass mittels qRT-PCR neben unfixierten frischen Gewebematerialien auch archivierte formalinfixierte in **Paraffin eingebettete (FFPE)** Gewebe untersucht und entsprechende Genexpressionsraten ermittelt werden können (Godfrey et al 2000, Specht et al 2001, Cronin et al 2004). Werden interindividuelle Vergleiche unternommen, ist eine relative Quantifizierung von Genexpressionsraten eines oder mehrerer Gene in Bezug zu einem oder mehrerer „Housekeeping-Gene“ meist ausreichend. Eine absolute Quantifizierung und eine Ermittlung der Kopienzahl der entsprechenden mRNA ist jedoch notwendig, wenn die Genexpressionsraten verschiedener mRNA Spezies, wie z.B. von Cyclin D1 mRNA Varianten in FFPE Material untersucht werden sollen.

Voraussetzung für eine verlässliche Quantifizierung von mRNA- Varianten im FFPE Material ist, dass sich die unterschiedlichen Zielsequenzen in der qPCR Reaktion mit gleicher Effizienz amplifizieren lassen. Dies wurde in einem standardisierten Zellkulturversuch überprüft, in dem RNA aus nativen Zellpellets („native RNA“) sowie aus entsprechenden formalinfixierten und Paraffin eingebetteten Zellpellets („FFPE-RNA“) isoliert, in cDNA umgeschrieben und in äquimolaren Mengen in den qRT-PCR Analysen eingesetzt wurde. Bei gleicher Effizienz der PCR-Reaktion sollte die native und FFPE-cDNA vergleichbare Cycle Threshold (CT)-Werte in der qRT-PCR- Reaktion liefern. Eine Effizienzminderung hingegen macht sich mit einem steigenden CT-Wert bemerkbar.

Die vorliegenden Ergebnisse am Zellkulturmaterial zeigen, dass die Fixierung, -und Einbettung von Zellkulturmaterial immer mit einer Abnahme der Amplifikationseffizienz einhergeht. Diese Abnahme der Amplifikationseffizienz ließ sich für alle untersuchten TaqMan Assays in wiederholten Untersuchungen reproduzieren, entsprechend erwiesen sich die ermittelten „CT-Shifts“ zwischen nativem und entsprechendem FFPE Material als hochgradig konstant. Während

die „CT-Shifts“ bei der Mehrzahl der verschiedenen TaqMan Assays vergleichbar waren, zeigte ein Drittel der TaqMan Assays deutlich abweichende geringere oder höhere „CT-Shifts“. Bei Unkenntnis dieser abweichenden Amplifikationseffizienzen käme es zur Ermittlung falscher Genexpressionsraten. Auf der Basis der „CT-Shifts“ wurden mathematische Korrekturfaktoren ermittelt, die eine genaue Quantifizierung der Genexpressionsraten, insbesondere einen für diese Arbeit direkten Vergleich der Genexpressionsraten der verschiedenen Cyclin D1 mRNA Varianten im formalinfixierten Gewebe erlaubten.

Die Quantifizierung von Genexpressionsraten im FFPE Gewebematerial ist in aller Regel schwieriger als in frischem Material, das es durch Fixierung, Einbettung und Lagerung zu einem Qualitäts,- und Quantitätsverlust an mRNA kommt. Im Durchschnitt sind im FFPE Material nur ca. 3% der mRNA wegen Degradierung, chemischer Modifikationen und Quervernetzungen mit Proteinen der reversen Transkription zugänglich (Godfrey et al 2000). Die aus FFPE-Material isolierte RNA hat eine mittlere Fragmentlänge von 100 bis 250 Bp. Auch wenn die Amplikonlängen gezielt kurz gehalten werden, ist davon auszugehen, dass aufgrund der kurzen PCR-Fragmente lediglich ein Bruchteil der vorhandenen RNA-Moleküle amplifizierbar ist. Die Fragmentierung der RNA ist wohl eine (Haupt-)Ursache für die beobachtete Effizienzminderung der qRT-PCR im FFPE-Material. So zeigten Untersuchungen, dass ein niedriger pH-Wert, der als Indikator für eine Gewebehypoxie angesehen werden kann, mit einer Fragmentierung der RNA einhergeht (Kingsbury et al 1995). Auch Andere zeigten, dass es zwischen der Gewebeprobeentnahme und der Gewebefixierung zu einer Gewebehypoxie kommt, die mit einem ausgeprägten zeitabhängigen Verlust der isolierbaren mRNA einhergeht (Srinivasan et al 2002, Abrahamsen et al 2003). Daher scheint es sinnvoll, die Zeit zwischen Probenentnahme und,-fixierung möglichst kurz zu halten. Unter Routinebedingungen sind Verzögerungen jedoch fast unvermeidbar, da praktisch immer eine gewisse Zeit vergeht, bis das Gewebematerial nach Entnahme z.B. im Operationsaal in das Fixans gegeben wird. Mit den in dieser Arbeit untersuchten „Prefixation times“ von 3 bzw. 6 Stunden konnte kein messbarer Einfluss einer Verzögerung zwischen Zellisolierung und,-fixierung auf die Menge isolierbarer RNA oder auf die qRT-PCR Effizienz nachgewiesen werden. Möglicherweise waren die untersuchten Zeitspannen von 3 und 6h zu kurz, um einen relevanten pH-Abfall oder andere entsprechende biochemische Veränderungen herbeizuführen. Andererseits sind unterschiedliche mRNA Spezies möglicherweise nicht in gleicher Weise sensitiv auf einen pH-Wert Abfall. Basierend auf den eigenen Untersuchungen kann man annehmen, dass die unter Routinebedingungen auftretende „Prefixation time“ wohl keinen Einfluss auf die ermittelten Genexpressionsraten hat. Allerdings können die im Zellkulturmaterial gewonnenen Ergebnisse nur eingeschränkt auf Gewebematerial

übertragen werden, da biochemische und zellbiologische Veränderungen in Zellkultur sicherlich nicht vollständig den Veränderungen im Gewebe entsprechen.

Antonov et al haben anhand eines 96-Gen-TaqMan Arrays gezeigt, dass eine standardisierte pH-induzierte RNA-Degradierung mit einer vergleichbaren reproduzierbaren Effizienzminderung der qRT-PCR bei allen untersuchten Assays einhergeht (Antonov et al 2005). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine formalin-induzierte RNA-Degradierung bei ca. 2/3 der untersuchten Assays mit einer vergleichbar hohen Effizienzminderung einhergeht, jedoch 1/3 der Assays eine davon statistisch signifikant geringere oder stärkere Effizienzminderung aufwiesen. Die z.T. abweichenden Ergebnisse der eigenen Untersuchungen von der zitierten Studie sind möglicherweise auf die unterschiedliche Methode der RNA-Degradierung zurückzuführen, da bekannt ist, dass bei Formalinbehandlung neben der RNA Degradierung zusätzlich chemische Modifikationen und Quervernetzungen von Proteinen auftreten (Godfrey et al 2000).

Wie die eigenen Ergebnisse und auch Untersuchungen Anderer zeigten (von Smolinski et al. 2005), variieren die CT-Shifts zwischen nativem und FFPE-Material bei verschiedenen Taqman Assays. Die Ursache für den in dieser Arbeit erkannten variablen Effizienzverlust verschiedener Assays im FFPE Material wurde bisher nicht untersucht. Um dieser Frage nachzugehen, wurden verschiedene Assay-spezifische Einflussfaktoren bzw. methodische Aspekte genauer untersucht.

Es ist bekannt, dass bei der Gewebefixierung mit Formalin chemische Reaktionen zwischen Nucleinsäuren und Formaldehyd entstehen, wobei Monomethylgruppen vorzugsweise mit Adenosin, in schwächerer Form auch mit den anderen Basen, reagieren. In synthetisch hergestellter RNA sind ca. 40% der Adenin-Nucleotide chemischen Modifikationen ausgesetzt; auch der Poly-Adenin Schwanz von mRNA's erfährt in ähnlicher Weise Veränderungen und Modifikation (Masuda et al 1999). Daher könnte man davon ausgehen, dass Adenin-reiche Assays eine geringere Amplifikationseffizienz im FFPE Material aufweisen als Adenin-arme Assays. Bei den in dieser Arbeit untersuchten 13 TaqMan Assays zeigte sich jedoch kein Einfluss des Adenin-Gehalts auf die Amplifikationseffizienz.

Eine weitere mögliche Assays-spezifische Ursache für den variablen Effizienzverlust, könnte die unterschiedliche Länge der zu amplifizierenden Amplikons sein. Es ist bekannt, dass die Formalinfixierung nicht nur eine RNA,-und Protein-Degradierung bewirkt, sondern auch mit der Ausbildung von Quervernetzungen zwischen Proteinen und Nucleinsäuren, einhergeht. Man könnte daher davon ausgehen, dass Assays mit höherer Nucleotidanzahl häufiger Quervernetzungen ausbilden als Assays mit geringer Nucleotidanzahl. Da Quervernetzungen bei der RNA-Isolierung mit der hier verwendeten Guanidinsäure/Phenol/Chloroform-Methode nur teilweise aufgebrochen werden, könnte bei bestehenden Quervernetzungen eine geringere

Amplifikationseffizienz resultieren. Diese Annahme ließ sich teilweise bestätigen, da der STAT-3 Assay, welcher unter den untersuchten Assays die höchste Nukleotidanzahl hat, von allen Assays die höchste gemessene CT-Differenz aufwies. Andererseits zeigte der zweitlängste Taqman Assay D1 beta die geringste gemessene CT-Differenz. Insgesamt ergab sich somit in dem von uns untersuchten Größenbereich keine direkte Korrelation zwischen hoher Nukleotidanzahl und hohem CT-Shift bzw. geringer Amplifikationseffizienz. Trotzdem sollte v.a. wegen der formalininduzierten RNA-Fragmentierung versucht werden, die Amplikonlängen so kurz wie möglich zu halten, da es bei Amplikonlängen von mehr als 150 bp zu einer drastischen Abnahme der Amplifikationseffizienz kommt (Specht et al 2001).

Die Bildung von Quervernetzungen ist möglicherweise die (Haupt-)Ursache für die deutliche Effizienzabnahme bei Isolierung von RNA aus FFPE Material (Lewis et al 2001, Lehmann et al 2001, Masuda et al 1999). Dies würde auch erklären, warum die Dauer des Protein-K Verdau ein kritischer Schritt in der erfolgreichen Isolierung von RNA aus FFPE Material ist. So konnte in Bezug auf die Amplifikationseffizienz gezeigt werden, dass ein 6-stündiger Protein-Verdau dem 2-stündigen Verdau eindeutig überlegen war. Bei einzelnen Assays kam es bei 16-stündigen Protein-Verdau ggü. einem 6-stündigem Verdau zu einer weiteren Steigerung der Amplifikationseffizienz (D1 alpha Assay). Daher wurde bei der RNA-Isolierung des in der vorliegenden Arbeit verwendete FFPE-Gewebematerials immer ein 16-stündiger Proteinase-K Verdau vorgenommen. Zur Quantifizierung von Cyclin D1 mRNA Varianten an FFPE-Myelomen wurde neben Osteolysen auch Knochenmarksbiopsien verwendet, die zusätzlich mittels mehrstündiger EDTA-Inkubation entkalkt wurden. Ein möglicher Einfluss der EDTA-Entkalkung auf die Amplifikationseffizienz wurde daher im Zellkulturmaterial untersucht. Bei zusätzlicher EDTA-Behandlung des formalinfixierten Zellpellets kam es zu einer geringgradigen zusätzlichen Abnahme der Amplifikationseffizienz, die sich jedoch als nicht signifikant und vernachlässigbar herausstellte.

Die verwendeten unterschiedlichen Methoden zur Isolierung von nativer und FFPE-RNA (RNeasy bzw. Phenol-Chloroform-Aufreinigung) sind zusätzlich möglicherweise Mitursache für die beobachteten CT-Shifts. So konnte im nativen Zellkulturmaterial gezeigt werden, dass unter Verwendung der Proteinase K/Phenol/Chloroform-Extraktionsmethode wesentlich höhere CT-Werte resultieren als bei Verwendung der RNeasy-Methode (CT-Erhöhung um 40% bis 80%).

Im Durchschnitt lag die Ausbeute der FFPE-RNA bei den in der Arbeit untersuchten TaqMan Assays bei 14%, die beste Amplifikationseffizienz hatte der Assay GRIM-19 mit einer Ausbeute von 29%, die schlechteste der Assay STAT-3 mit 2,6%. Es zeigten sich dabei signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Genen und auch zwischen verschiedenen Loci gleicher

Gene. Von Smolinski et al zeigten, dass die Expressionshöhe von MDR-1 bei Verwendung unterschiedlicher „Housekeeping“-Gene um den Faktor 10 variierte (von Smolinski et al 2005). Diese Varianz beruhte wohl einerseits auf dem variablen Expressionsniveau der entsprechenden verwendeten Housekeeping-Gene, wohl aber auch auf der unterschiedlichen Amplifikationseffizienz der TaqMan Assays. Auch Godfrey et al zeigte im FFPE Material, dass die c-myc Expressionswerte bei Amplifikation unterschiedlicher Loci, stark voneinander abwichen (Godfrey et al 2000). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten vier Cyclin D1-Loci zeigten z.T ebenfalls deutliche Effizienzunterschiede, wobei die Unterschiede geringer waren als in der eben zitierten Arbeit. Sollen Cyclin D1mRNA Varianten im FFPE Material quantifiziert werden, käme es bei Unkenntnis dieses variablen Effizienzverlustes, z.T. zu gravierenden quantitativen Fehleinschätzungen der Genexpressionsraten. Insbesondere käme es wegen der höheren Effizienz des D1 beta Assays im Vergleich zum D1 alpha Assay zu einer deutlichen Überschätzung des Anteils an Cyclin D1 beta Transkripten im FFPE Material. Dies zeigt, dass für eine verlässliche Quantifizierung von Genexpressionsraten im FFPE Material mögliche Effizienzunterschiede der verwendeten Assays berücksichtigt werden müssen. Auf der Basis der unter standardisierten Bedingungen auftretenden stabilen CT-Shifts zwischen nativem und FFPE Material, können mathematische Korrekturfaktoren berechnet werden. Bei Anwendung der Korrekturfaktoren erhält man im FFPE Material Genexpressionswerte, die den entsprechenden Werten im nativen Material entsprechen.

Wann und wie sollten diese Erkenntnisse in die Praxis umgesetzt werden?

Die meisten Genexpressionsanalysen werden zur Ermittlung von interindividuellen Expressionsunterschieden durchgeführt. Wenn der verwendete Assay des Zielgens und des Housekeeping-Gens im FFPE Material eine einigermaßen ähnlich gute Amplifikationseffizienz aufweisen, ist eine Anwendung von Korrekturfaktoren nicht unbedingt notwendig. Wenn jedoch Genexpressionsunterschiede von verschiedenen mRNA Spezies eines Genes, wie z.B. Spleißvarianten im FFPE Material untersucht werden, müssen die Amplifikationseffizienzen der verwendeten TaqMan Assays ermittelt und ggf. Korrekturfaktoren angewendet werden. Die Anwendung dieser Korrekturfaktoren ist dann sinnvoll, wenn die entsprechenden Assays eine signifikant unterschiedliche Amplifikationseffizienz aufweisen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass formalinfixiertes Gewebe nicht nur für interindividuelle sondern auch für intraindividuelle Genexpressionsanalysen geeignet ist, insofern mögliche unterschiedliche Amplifikationseffizienzen der verwendeten Assays berücksichtigt werden.

5.2 Expression von Cyclin D1 mRNA Varianten im Multiplen Myelom

Zentrales Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Varianten der Cyclin D1 mRNA im multiplen Myelom (MM) mit aberranter Expression dieses Zellzyklusproteins. Obwohl Cyclin D1 (CyD1) wahrscheinlich eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielt, gibt es zur Bedeutung von seinen mRNA Varianten beim MM keine Daten, im Gegensatz zum Mantelzelllymphom. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Myelome mit CyD1-Überexpression neben der üblicherweise vorhandenen CyD1alpha(a)-Standard-mRNA häufig und regelmäßig kurze CyD1a mRNA Transkripte exprimieren, denen Anteile der 3'untranslatierten Region (UTR) fehlen. Bei Myelomen mit Translokation t(11;14) besteht dabei, wie auch beim Mantelzelllymphom (MCL), eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expressionshöhe der 3'UTR defizienten CyD1a mRNA und der CyD1mRNA-Gesamt-Expressionshöhe. Im Gegensatz zum MCL besteht beim MM jedoch weder ein Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe der kurzen CyD1a mRNA und der Proliferationsrate der Tumorzellen noch der Überlebenszeit der Patienten. In der vorliegenden Arbeit kann daher eine prognostische Bedeutung der 3'UTR defizienten CyD1 a an dem relativ kleinen Patientenkollektiv nicht belegt werden. Weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven sind erforderlich, um die mögliche klinische Bedeutung des 3'UTR defizienten CyD1a Transkriptes beim Myelom zu erhellen. Die Ursache für das teilweise Fehlen der 3'UTR ist beim MM bisher nicht geklärt. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass der 3'UTR Verlust der CyD1mRNA nicht auf einem genomischem Verlust der 3'UTR Region beruht und kein Zusammenhang mit der Translokation t(11;14) besteht.

Außerdem wurde demonstriert, dass die Spleißvariante CyD1 beta(b)-mRNA beim Myelom nicht bzw. auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wird und daher wohl keine bzw. eine untergeordnete tumorbiologische Rolle spielt.

Das Zellzyklusprotein Cyclin D1 wird physiologischerweise in den verschiedensten Geweben exprimiert, wobei normales lymphatisches Gewebe keine Expression dieses Proteins zeigt. Einige B-Zell-Neoplasien, und zwar das Mantelzelllymphom, ein Prozentsatz der Myelome und der Haarzelleukämie hingegen, zeichnen sich durch die aberrante Überexpression von CyD1 aus. Mittels quantitativer Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass ca. 50% der Myelome eine aberrante CyD1 Expression aufweisen (Bergsagel et al 2005, Specht et al 2004, Soverini et al 2003). Mit der Immunhistochemie liegt die Detektionsrate etwas niedriger bei ca. 20-30%

(Pruneri et al 2000), wie auch die eigenen Untersuchungen betätigten. Die Ursache dieser aberranten CyD1 Expression beruht bei den genannten CyD1+B-Zell-Neoplasien z.T. auf genomischen Veränderungen von Chromosom 11, wobei die genauen pathogenetischen Mechanismen nur teilweise untersucht und bekannt sind. Ursache für die aberrante Expression ist beim CyD+MM in der Hälfte der Fälle die Translokation t(11;14)(q13;q32), wodurch der Cyclin D1 Lokus unter die Kontrolle des Immunglobulin-Enhancers gerät. Im Gegensatz zum MCL ist die Ursache für die Translokation meist ein Fehler bei der Immunglobulin Switch-Rekombination. Obwohl bei der Mehrheit der CyD1+Myelome ohne Translokation eine Polysomie von Chromosom 11 vorliegt (Specht et al 2004), bleibt die Ursache der CyD1 Expression für einen kleinen Teil der MM, ebenso wie für die Haarzelleukämie, unbekannt. Die FISH-Analysen bestätigten auch in der vorliegenden Arbeit die hohe Frequenz einer Polysomie von Chromosom 11 bei Fehlen einer Translokation t(11;14). Der Anteil von CyD1+MM ohne erkennbare 11q13 Alteration war sehr gering und damit in dem Bereich der publizierten Daten (Agnelli et al 2005). Wie auch schon vorhergehende Untersuchungen des eigenen Labors zeigten, haben CyD1+MM mit Translokation t(11;14) signifikant, und zwar durchschnittlich um das 16fach höhere Cyclin D1 mRNA Expressionsspiegel als CyD1+MM ohne Translokation (Specht et al 2004).

Obwohl Cyclin D1 als klassisches Mitogen offensichtlich eine Deregulierung des Zellzyklus bewirkt, sprechen das breite klinische Spektrum und die unterschiedlich hohen Proliferationsraten der CyD1+B-Zell-Neoplasien gegen die Theorie, dass eine CyD1 Überexpression obligat die Zellteilung beeinflusst und mit einer klinischen Progression der Erkrankung einhergeht. Die biologische Wirkung der aberranten Cyclin D1 Expression ist bei verschiedenen Entitäten inkonstant und möglicherweise von der Art der zugrunde liegenden genomischen Alteration und dem Zelltyp abhängig. Die Analyse der Funktionen und Wirkungen von Cyclin D1 sind auch noch 24 Jahre nach seiner Entdeckung im Jahre 1984 (Tsujiimoto et al 1984) Gegenstand der Forschung. Neues Interesse haben dabei kürzlich trunkierte CyD1 mRNA Transkript-Varianten geweckt. Frühe Northern-Blot-Daten zeigten bereits, dass in manchen Glioblastom-Zelllinien und Zelllinien anderer solider Tumoren neben dem üblicherweise prädominant exprimierten 4,5 kB langen Cyclin D1 mRNA Transkript auch ein Transkript mit geringerem Molekulargewicht vorhanden sein kann (Xiong et al 1991, Withers et al 1991). Wenig später wurden aberrante CyD1 mRNA Varianten auch in Lymphomzelllinien und im Gewebematerial verschiedener lymphatischer Neoplasien beobachtet (Lebwohl et al. 1994, Seto et al. 1992, de Boer et al 1995; Rimokh et al 1994). Dabei dominiert sowohl in Neoplasien als auch unter physiologischen Bedingungen meist die „normale“ 4,5 kb schwere CyD1mRNA über trunkierte CyD1mRNA

Varianten, wie auch die eigenen Untersuchungen an lymphatischen Normalgewebekontrollen bestätigten. Die normale CyD1a mRNA besteht aus fünf Exons und einer am 3'Ende gelegenen 1,5 kB langen untranslatierten Region (UTR), welche Adenin (A),-und Uracil(U)-reiche Bereiche enthält, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der mRNA Stabilität spielen. Diese so genannten AU-reichen Bereiche werden vor allem bei Genen gefunden, die einer besonders raschen und strikten Regulation unterliegen, wie beispielsweise Zellzyklusgenen und Genen, die im Entzündungsprozess eine Rolle spielen (Lin et al 2000, Espel et al 2005). Es wurde gezeigt, dass 3'UTR defiziente CyD1 mRNA Transkripte ein normales voll funktionsfähiges Cyclin D1 Protein generieren, jedoch im Vergleich zu „normalen“ CyD1a Transkripten stabiler sind und entsprechend in der Zelle akkumulieren (Lebwohl et al 1994). Dies könnte höhere CyD1 mRNA,- und Protein-Expressionswerte zur Folge haben.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Mehrzahl der Myelome vorwiegend normale 4,5 kB schwere CyD1a mRNA exprimieren. Es konnte jedoch bei allen CyD1+MM neben der langen CyD1a mRNA auch kurze 3'UTR defiziente CyD1a mRNA nachgewiesen werden. Der Anteil an trunkierten 3'UTR defizienten CyD1a mRNA Transkripten zeigte dabei eine hohe Schwankungsbreite und war unabhängig vom Vorhandensein einer 11q13 Alteration. Obwohl der Anteil an kurzer 3'UTR defizienter CyD1 mRNA in einzelnen Myelomen sehr hoch war (max. 97%), konnte im Gegensatz zu den MCL-Zelllinien Jeko-1 und Rec-1 niemals ein vollständiger 3'UTR Verlust nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass bei den 40 primären MM und den beiden MM-Zelllinien KMS-12 und U266, neben der 3'UTR defizienten CyD1a mRNA immer auch normale lange CyD1a mRNA detektiert wurden, während beim MCL ein vollständiger 3'UTR Verlust zumindest in einem kleinen Teil der Fälle beschrieben wurde (Rosenwald et al 2003). Das Vorhandensein langer CyD1a mRNA Transkripte (bzw. das Fehlen eines vollständigen 3'UTR Verlustes) könnte theoretisch durch eine Kontamination der Tumorzellpopulation mit Knochenmarkstromazellen (z.B. Gefäßendothelien, monozytäre Zellen) bzw. genomischer DNA vorgetäuscht werden. Bei Betrachtung der Kopienanzahlen wird jedoch erkenntlich, dass die wohl nicht gänzlich vermeidbare Kontamination der Tumorzellpopulation mit CyD1+Knochenmarksstromazellen nicht das Vorhandensein langer Standardtranskripte vortäuschen konnte, da die gemessene Kopienanzahl an normalen CyD1a Transkripten in den Tumorgewebeproben, auch bei geringer CyD1-Expression, mindestens um den Faktor 1000 höher war als im Knochenmarksstroma. Auch eine Kontamination mit genomischer DNA konnte ausgeschlossen werden, da die RNA-Präparationen in dieser Arbeit einem DNase Verdau unterzogen wurden, dessen Wirksamkeit stichprobenartig überprüft wurde.

Eigene Daten beim MCL bestätigen im Gegensatz zu den Ergebnissen beim MM das Auftreten eines kompletten Verlustes des kanonischen Transkripts in einem kleinen Teil der Fälle (Slotta-Huspenina et al unveröffentlicht, Rimokh et al 1994, Bosch et al 1994).

Bei einem Teil dieser MCL-Primärfälle, wie auch bei den Zelllinien SP-49 und Jeko-1, die ausschließlich kurze 3'UTR defiziente CyD1a mRNA exprimieren, ist die Ursache dafür eine Deletion des genomischen Cyclin D1 3'UTR Locus, die möglicherweise im Zuge der Translokation t(11; 14) entsteht (Rimokh et al 1994, Seto et al 1992, Wiestner et al 2007). Die eigenen mittels genomischer quantitativer PCR gewonnenen Ergebnisse konnten eine Deletion des 3'UTR Locus bei der Zelllinie Jeko-1 bestätigen. Bei der MCL-Zelllinie Rec-1, welche ebenso ausschließlich kurze 3'UTR defiziente CyD1a mRNA exprimiert, konnte weder in der vorliegenden Arbeit noch in Arbeiten Anderer (Raynaud et al 1993, Wiestner et al 2007) eine Deletion bzw. Mutation des 3'UTR-Locus nachgewiesen werden. Bei keiner der untersuchten primären MM oder MM-Zelllinien konnte eine Deletion oder Mutation der 3'UTR gefunden werden. Dies steht im Einklang mit den gewonnenen Expressionsdaten, da eine biallelische bzw. monoallelische Deletion des translozierten Allels mit einem vollständigen 3'UTR auf mRNA Ebene einhergehen würde, der in keiner der MM-Fälle vorhanden war. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer 3'UTR-Deletion beim MM im Gegensatz zum MCL könnte die unterschiedliche Verteilung der Bruchpunkte der Translokation t(11; 14) sein. Während beim MM die Bruchpunkte auf Chromosom 11 weit entfernt vom Cyclin D1 Locus liegen (Ronchetti et al 1999), sind diese beim MCL nahe bzw. im Bereich des Cyclin D1 Gens, im so genannten „major translocation cluster“ (Raynaud et al 1993, Williams et al 1993).

In Übereinstimmung mit den publizierten Daten beim MCL (Rosenwald et al 2003, Sander et al 2005), korrelierte bei CyD1+MM mit Translokation t(11;14) ein hoher Anteil an 3'UTR defizienter CyD1a mRNA mit einer hohen CyD1 mRNA-Gesamtexpression. Diese Korrelation bestand nicht bei den CyD1+MM ohne Translokation t(11; 14). Bei CyD1+MM mit einer Polysomie 11 korrelierte hingegen ein hoher Anteil an Polysomie 11+Tumorzellen mit einer hohen CyD1 mRNA-Gesamtexpression (nicht gezeigte Daten). Dies deutet darauf hin, dass die CyD1 mRNA Expressionshöhe bei CyD1+MM mit Polysomie 11 möglicherweise stärker vom „Gendosiseffekt“ als von der Expression der 3'UTR defizienten CyD1a mRNA beeinflusst wird. Zusätzlich ist es möglich, dass epigenetische Faktoren den Einfluss der Expression der 3'UTR defizienten CyD1a mRNA auf die CyD1-Expressionshöhe überdecken.

Im Gegensatz zu den publizierten Daten beim MCL korrelierte bei den CyD1+MM weder die CyD1mRNA Gesamtexpressionshöhe noch der Anteil an 3'UTR defizienter mRNA mit der Proliferationsrate der Tumorzellen. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese fehlende Korrelation ist

möglicherweise eine unterschiedliche Funktion bzw. Wirkung der Cyclin D1 Überexpression bei diesen beiden Lymphom-Entitäten. Es wurde kürzlich gezeigt, dass beim multiplen Myelom eine alleinige Überexpression von Cyclin D1 ohne gleichzeitige Überexpression der cyclinabhängigen Kinase 4 (cdk-4) nicht ausreicht, das Retinoblastomprotein zu phosphorylieren und den Zellzyklus zu stimulieren (Ely et al 2005). Diese Erkenntnisse könnten auch die klinische Beobachtung erklären, dass Myelome mit Cyclin D1 Überexpression keine schlechtere, sondern paradoxerweise häufig eine bessere Prognose haben als Myelome ohne Cyclin D1 Expression (Soverini et al 2003, Moreau et al 2002, Fonseca et al 2003, Fonseca et al 2002). In Übereinstimmung damit wurde kürzlich auch im Zelllinienmodell gezeigt, dass eine ektope Cyclin D1 Überexpression bei der Myelomzelllinie RPMI8226 nicht mit einer höheren Proliferationsrate einhergeht (Kuroda et al 2008). Eine weitere, jedoch weniger wahrscheinliche Erklärungsmöglichkeit für das Fehlen einer Korrelation zwischen CyD1mRNA Expressionshöhe mit der Proliferationsrate könnte in der Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Ermittlung der Proliferationsrate liegen. Während in der bereits zitierten Arbeit beim MCL eine mittels Genexpressionsanalyse ermittelte sog. „Proliferationssignatur“ angewendet wurde (Rosenwald et al 2003), wurde die Proliferationsrate in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch bestimmt. Eine direkte Korrelation zwischen der sog. „Proliferationssignatur“ und dem MIB-1 Index wurde bislang nicht gezeigt. Die Verlässlichkeit und hohe Aussagekraft des immunhistochemisch ermittelten MIB-1 Index wurde jedoch in zahlreichen Studien belegt (Huang et al 1994, Ek et al 2004, Pich et al 1994, Determann et al 2008), so dass die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen beim MCL und den vorliegenden Daten beim MM wohl eher biologisch begründet sind.

Eine weitere Möglichkeit für die z.T. beachtliche Expressionshöhe einer 3'UTR defizienten CyD1 mRNA Variante beim MM könnte eine zusätzliche Expression der so genannten Spleißvariante Cyclin D1 beta sein, welcher ebenfalls die 3'UTR fehlt (Hosokawa et al 1997, (Hosokawa et al 1999, Hosokawa et al 1998, Betticher et al 1995). Diese Spleißvariante ist eine weitere kurze Cyclin D1 mRNA Variante, dessen Expressionshöhe möglicherweise von einem Polymorphismus des Cyclin D1 Genes (A870G) beeinflusst wird. In vitro Modelle deuten darauf hin, dass das trunkierte Cyclin D1 beta Protein eine vom normalen Cyclin D1 Protein abweichende Kinetik und Funktion haben könnte (Sawa et al 1998, Alt et al 2000, Solomon et al 2003). Obwohl es bisher keine direkten Hinweise für die Beteiligung von CyD1 beta an der Pathogenese von humanen Tumoren gibt, konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass der A870G Polymorphismus eine biologische bzw. prognostische Bedeutung bei verschiedenen soliden Tumoren hat (Ho-Pun-Cheung et al 2007, Rydzanicz et al 2006, Wang et al 2003, Yu et al 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass CyD1+Myelome und Myelom-Zelllinien

neben der normalen langen und 3'UTR defizienten CyD1a mRNA selten und meist nur auf niedrigem Niveau die Spleißvariante CyD1b exprimieren. Während mit der äußerst sensitiven Methode der qRT-PCR bei ca. einem Drittel der Fälle keine CyD1b mRNA detektiert werden konnten, betrug bei ca. 2/3 der Myelome der CyD1beta Anteil durchschnittlich nur 6,8%. Die CyD1b Expressionshöhe korrelierte weder mit der CyD1mRNA Gesamtexpressionshöhe noch mit der Proliferationsrate der Tumorzellen. Sowohl die eigenen Ergebnisse wie auch die Ergebnisse Anderer deuten daher darauf hin, dass die Spleißvariante CyD1 beta bei den CyD1+B-Zell-Neoplasien wohl eher keine bzw. eine untergeordnete klinische und prognostische Bedeutung haben (Sander et al 2005).

Obwohl das multiple Myelom zu den häufigsten Lymphomerkkrankungen in der westlichen Bevölkerung zählt und es in ca. 50% der Fälle eine aberrante Cyclin D1 Expression aufweist, was es zur häufigsten CyD1+B-Zellneoplasie macht, gab es bisher keine Untersuchungen bezüglich einer möglichen tumorbiologischen bzw. prognostischen Rolle der trunkierten Cyclin D1 mRNA Varianten.

In der vorliegenden Arbeit konnte an einer Serie primärer CyD1+Myelome und an MM-Zelllinien gezeigt werden, dass trunkierte CyD1 mRNA Varianten bei Myelom zwar exprimiert werden, jedoch keine Korrelation zwischen der Expressionshöhe dieser mRNA Varianten und der Proliferationsrate bzw. der Überlebenszeit der Patienten besteht.

Aus momentaner Sicht scheint daher die Kenntnis über die Expression der CyD1mRNA Varianten beim Myelom weder diagnostisch noch therapeutisch von Bedeutung zu sein, wobei weitere Studien an größeren Patientenkollektiven notwendig sind, um die immer noch nicht vollständig verstandene Rolle von Cyclin D1 beim multiplen Myelom zu erhellen.

6. Zusammenfassung

Etwa die Hälfte der primären multiplen Myelome (MM) zeigt eine durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöste, aberrante Expression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 (CyD1). Neues Interesse haben zwei trunkierte CyD1 mRNA Varianten geweckt, die z.T. charakteristische Funktionsunterschiede aufweisen. So konnte beim Mantelzellymphom (MCL) gezeigt werden, dass die Expression der sog. 3'UTR (untranslatierten Region)-defizienten CyD1 alpha(a) mRNA Variante mit höherer CyD1 Expression, einer höheren „Proliferationssignatur“ und einer schlechteren Prognose einhergeht. In vitro Modelle deuten darauf hin, dass die so genannte Spleißvariante CyD1 beta(b) ein aberrantes „onkogenes“ Cyclin D1 Protein generiert, welches möglicherweise eine wesentliche Rolle bei der Tumorigenese von Tumoren spielen könnte. Obwohl das MM die häufigste Lymphomerkkrankung mit aberranter CyD1 Expression ist, gab es bisher keine Untersuchungen bezüglich einer möglichen tumorbiologischen bzw. prognostischen Rolle dieser trunkierten CyD1 mRNA Varianten bei dieser Erkrankung.

Da für die Genexpressionsanalysen ausschließlich archiviertes formalinfixiertes paraffineingebettetes (FFPE) Tumorgewebe zur Verfügung stand, wurde in einem zelllinienbasierten methodischen Teilprojekt der Arbeit vorerst die Effizienz der CyD1-variantenspezifischen Taqman Assays bestimmt. Durch Anwendung entsprechender mathematisch ermittelter Korrekturfaktoren konnte so eine verlässliche Quantifizierung der CyD1mRNA Varianten im FFPE Gewebe gewährleistet werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CyD1+MM regelmäßig kurze 3'UTR defiziente CyD1a-Transkripte exprimieren. Dabei besteht bei MM mit Translokation t(11,14), wie auch beim MCL, eine signifikante Korrelation zwischen der Expressionshöhe der kurzen CyD1a mRNA und hoher CyD1mRNA-Gesamtexpression. Im Gegensatz zum MCL, geht beim MM die Expression der kurzen CyD1a mRNA jedoch weder mit höherer Proliferationsrate der Tumorzellen noch mit schlechterer Prognose einher, so dass eine prognostische Bedeutung der 3'UTR defizienten CyD1a hier nicht belegt werden kann. Die Ursache für das teilweise Fehlen der 3'UTR ist beim MM bisher nicht geklärt, eine genomische Deletion des 3'-UTR-Lokus fand sich nicht, und es besteht kein Zusammenhang mit der Translokation t(11;14).

Die „onkogene“ mRNA Spleißvariante CyD1 beta wird beim MM hingegen nicht bzw. auf sehr niedrigem Niveau exprimiert und scheint daher keine besondere tumorbiologische Rolle zu spielen.

7. Literaturverzeichnis

Abrahamsen HN, Steiniche T, Nexø E, Hamilton-Dutoit SJ & Sørensen BS: Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients. *J Mol Diagn* 5 (2003), 34-41.

Adnane J, Shao Z & Robbins PD: Cyclin D1 associates with the TBP-associated factor TAF(II)250 to regulate Sp1-mediated transcription. *Oncogene* 18 (1999), 239-247.

Agnelli L, Biccato S, Mattioli M, Fabris S, Intini D, Verdelli D, Baldini L, Morabito F, Callea V, Lombardi L & Neri A: Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations. *J Clin Oncol* 23 (2005), 7296-7306.

Akira S, Taga T & Kishimoto T: Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54 (1993), 1-78.

Akiyama N, Tsuruta H, Sasaki H, Sakamoto H, Hamaguchi M, Ohmura Y, Seto M, Ueda R, Hirai H, Yazaki Y: Messenger RNA levels of five genes located at chromosome 11q13 in B-cell tumors with chromosome translocation t(11;14)(q13;q32). *Cancer Res* 54 (1994), 377-379.

Alt JR, Cleveland JL, Hannink M & Diehl JA: Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* 14 (2003), 102-3114.

Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, Altermatt HJ & Jaggi R: Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest* 13 (200), 513.

Atadja P, Wong H, Veillette C & Riabowol K: Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 217 (1995), 205-216.

Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C, Callet-Bauchu E, Terre C, Lafage-Pochitaloff M, Desangles F, Ramond S, Talmant P & Bataille R: Cytogenetic, interphase, and multicolor

fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myelome and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 97 (2001), 822-825.

Bakkus MH, Van Riet I, De Greef C, Van Camp B & Thielemans K: The clonogenic precursor cell in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 18 (1995), 221-229.

Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M & Draetta G: Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7 (1993), 812-821.

Bartl R & Fateh-Moghadam A :The diagnosis of multiple myeloma. *Onkologie* 9 (1986), 183-188.

Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, Kettner G, Jaeger K & Sommerfeld W: Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol* 87 (1987), 342-355.

Bergsagel PL & Kuehl WM: Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 20 (2001), 5611-5622.

Bergsagel PL & Kuehl WM: Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev* 194 (2003), 96-104.

Bergsagel PL & Kuehl WM: Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23 (2005), 6333-6338.

Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD & Heighway J: Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 11 (1995), 1005-1011.

Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E, Rapp MJ, Harousseau JL, Moisan JP & Bataille R: High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* 18 (2001), 212-224.

Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW & Adams JM: Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *Embo J* 13 (1994), 2124-2130.

Boice JD, Jr. & Fraumeni JF, Jr.: Second cancer following cancer of the respiratory system in Connecticut, 1935-1982. *Natl Cancer Inst Monogr* 68 (1985), 83-98.

Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C & et al.: PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 84 (1994), 2726-2732.

Bourguet CC & Logue EE: Antigenic stimulation and multiple myeloma. A prospective study. *Cancer* 72 (1993), 2148-2154.

Burd CJ, Petre CE, Morey LM, Wang Y, Revelo MP, Haiman CA, Lu S, Fenoglio-Preiser CM, Li J, Knudsen ES, Wong J & Knudsen KE: Cyclin D1b variant influences prostate cancer growth through aberrant androgen receptor regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), 2190-2195.

Chen CY & Shyu AB :AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20 (1995), 465-470.

Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT & Selby PJ : High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 348 (2003), 1875-1883.

Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL & Kuehl WM : Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 20 (2007), 571-596.

Cook JR, Hsi ED, Worley S, Tubbs RR & Hussein M : Immunohistochemical analysis identifies two cyclin D1+ subsets of plasma cell myeloma, each associated with favorable survival. *Am J Clin Pathol* 125 (2006), 615-624.

Costea I, Moghrabi A & Krajinovic M : The influence of cyclin D1 (CCND1) 870A>G polymorphism and CCND1-thymidylate synthase (TS) gene-gene interaction on the outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 13 (2003), 577-580.

Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, Esteban JM & Baker JB: Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 164 (2004), 35-42.

Darby SC, Doll R, Gill SK & Smith PG : Long term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis. *Br J Cancer* 55 (1987), 179-190.

Davis DL, Hoel D, Fox J & Lopez A : International trends in cancer mortality in France, West Germany, Italy, Japan, England and Wales, and the USA. *Lancet* 336 (1990), 474-481.

de Boer CJ, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM & Schuurin E : Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene* 10 (1995), 1833-1840.

Determann O, Hoster E, Ott G, Wolfram Bernd H, Loddenkemper C, Leo Hansmann M, Barth TE, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M & Klapper W : Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 111 (2008), 2385-2387.

Dhar KK, Branigan K, Howells RE, Musgrove C, Jones PW, Strange RC, Fryer AA, Redman CW & Hoban PR : Prognostic significance of cyclin D1 gene (CCND1) polymorphism in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 9 (1999), 342-347.

Diehl JA : Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 1 (2002), 226-231.

Diehl JA, Zindy F & Sherr CJ : Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 11 (1997), 957-972.

Donjerkovic D & Scott DW : Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res* 10 (2000), 1-16.

Drach J, Angerler J, Schuster J, Rothermundt C, Thalhammer R, Haas OA, Jager U, Fiegl M, Geissler K, Ludwig H & Huber H : Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 86 (1995), 3915-3921.

Dragnev KH, Freemantle SJ, Spinella MJ & Dmitrovsky E : Cyclin proteolysis as a retinoid cancer prevention mechanism. *Ann N Y Acad Sci* 952 (2001), 13-22.

Duquesne F, Florent M, Roue G, Troussard X & Sola B : Ectopic expression of cyclin D1 impairs the proliferation and enhances the apoptosis of a murine lymphoid cell line. *Cell Death Differ* 8 (2001), 51-62.

Ek S, Bjorck E, Porwit-MacDonald A, Nordenskjold M & Borrebaeck CA : 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* 89 (2004), 686-695.

Ely S, Di Liberto M, Niesvizky R, Baughn LB, Cho HJ, Hatada EN, Knowles DM, Lane J & Chen-Kiang S : Mutually exclusive cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 6/cyclin D2 pairing inactivates retinoblastoma protein and promotes cell cycle dysregulation in multiple myeloma. *Cancer Res* 65 (2005), 11345-11353.

Espel E : The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Semin Cell Dev Biol* 16 (2005), 59-67.

Fend F, Kremer M & Quintanilla-Martinez L : Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection. *Pathobiology* 68 (2000), 209-214.

Fend F, Kremer M, Specht K & Quintanilla-Martinez L : Laser microdissection in hematopathology. *Pathol Res Pract* 199 (2003), 425-430.

Fend F & Raffeld M : Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 53 (2000), 666-672.

Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ & Greipp PR : Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101 (2003), 4569-4575.

Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Hoyer JD, Harrington D, Kay NE, Van Ness B & Greipp PR : Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 99 (2002), 3735-3741.

Fonseca R & San Miguel J : Prognostic factors and staging in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 21 (2007), 1115-1140, ix.

Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Kyle RA, Hoyer JD, Jalal SM & Greipp PR : Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases. *Br J Haematol* 101 (1998), 296-301.

Furukawa Y, Kikuchi J, Nakamura M, Iwase S, Yamada H & Matsuda M : Lineage-specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. *Br J Haematol* 110 (2000), 663-673.

Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, Van Wier SA, Ahmann GJ & Fonseca R : Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 106 (2005), 2837-2840.

Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Hayman SR & Kumar SK : High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther* 6 (2006), 343-360.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H & Parks WP : In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51 (1973), 1417-1423.

Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW & Jensen RH : Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2 (2000), 84-91.

Guo Y, Yang K, Harwalkar J, Nye JM, Mason DR, Garrett MD, Hitomi M & Stacey DW : Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis. *Oncogene* 24 (2005), 2599-2612.

Hallek M, Bergsagel PL & Anderson KC : Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91 (1998), 3-21.

Han EK, Sgambato A, Jiang W, Zhang YJ, Santella RM, Doki Y, Cacace AM, Schieren I & Weinstein IB : Stable overexpression of cyclin D1 in a human mammary epithelial cell line prolongs the S-phase and inhibits growth. *Oncogene* 10 (1995), 953-961.

Ho-Pun-Cheung A, Assenat E, Thezenas S, Bibeau F, Rouanet P, Azria D, Cellier D, Grenier J, Ychou M, Senesse P & Lopez-Crapez E : Cyclin D1 gene G870A polymorphism predicts response to neoadjuvant radiotherapy and prognosis in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68 (2007), 1094-1101.

Hoechtlen-Vollmar W, Menzel G, Bartl R, Lamerz R, Wick M & Seidel D : Amplification of cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance. *Br J Haematol* 109 (2000), 30-38.

Holley SL, Parkes G, Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Leder K, Strange RC, Fryer AA & Hoban PR : Cyclin D1 polymorphism and expression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Pathol* 159 (2001), 1917-1924.

Horstmann S, Ferrari S & Klempnauer KH : Regulation of B-Myb activity by cyclin D1. *Oncogene* 19 (2000), 298-306.

Hosokawa Y, Gadd M, Smith AP, Koerner FC, Schmidt EV & Arnold A : Cyclin D1 (PRAD1) alternative transcript b: full-length cDNA cloning and expression in breast cancers. *Cancer Lett* 113 (1997), 123-130.

Hosokawa Y, Joh T, Maeda Y, Arnold A & Seto M : Cyclin D1/PRAD1/BCL-1 alternative transcript [B] protein product in B-lymphoid malignancies with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Int J Cancer* 81 (1999), 616-619.

Hosokawa Y, Suzuki R, Joh T, Maeda Y, Nakamura S, Kodera Y, Arnold A & Seto M : A small deletion in the 3'-untranslated region of the cyclin D1/PRAD1/bcl-1 oncogene in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 76 (1998), 791-796.

Howe D & Lynas C : The cyclin D1 alternative transcripts [a] and [b] are expressed in normal and malignant lymphocytes and their relative levels are influenced by the polymorphism at codon 241. *Haematologica* 86 (2001), 563-569.

Huang G, Feller AC & Lennert K : Correlation between the number of mitotic figures and the percentage of Ki67-positive cells in non-Hodgkin's lymphomas. *Chin Med Sci J* 9 (1994), 16-19.

Imoto M, Doki Y, Jiang W, Han EK & Weinstein IB : Effects of cyclin D1 overexpression on G1 progression-related events. *Exp Cell Res* 236 (1997), 173-180.

Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJ, Lens D, Bartek J, Dyer MJ, Kruger AR & Catovsky D : 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* 11 (1997), 64-72.

Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T & Akagi T : Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol* 102 (1998), 1323-1326.

Jia A, Gong J, Li Y, Hao Z, Chang X, Dai F & Yu B : GG genotype of cyclin D1 G870A polymorphism is associated with non-cardiac gastric cancer in a high-risk region of China. *Scand J Gastroenterol* 43 (2008), 1353-1359.

Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante AS, Doi S, Santella RM & Weinstein IB : Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene* 8 (1993), 3447-3457.

Katagiri S, Yonezawa T, Kuyama J, Kanayama Y, Nishida K, Abe T, Tamaki T, Ohnishi M & Tarui S : Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma. *Int J Cancer* 36 (1985), 241-246.

Kingsbury AE, Foster OJ, Nisbet AP, Cairns N, Bray L, Eve DJ, Lees AJ & Marsden CD : Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. *Brain Res Mol Brain Res* 28 (1995), 311-318.

Klein B : Cytokine, cytokine receptors, transduction signals, and oncogenes in human multiple myeloma. *Semin Hematol* 32 (1995), 4-19.

Knudsen KE, Cavenee WK & Arden KC : D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. *Cancer Res* 59 (1999), 2297-2301.

Koch I, Slotta-Huspenina J, Hollweck R, Anastasov N, Hofler H, Quintanilla-Martinez L & Fend F : 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* 15 (2006), 149-156.

Kong S, Amos CI, Luthra R, Lynch PM, Levin B & Frazier ML : Effects of cyclin D1 polymorphism on age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 60 (2000), 249-252.

Krafft AE, Duncan BW, Bijwaard KE, Taubenberger JK & Lichy JH : Optimization of the Isolation and Amplification of RNA From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue: The Armed Forces Institute of Pathology Experience and Literature Review. *Mol Diagn* 2 (1997), 217-230.

Krieger S, Gauduchon J, Roussel M, Troussard X & Sola B : Relevance of cyclin D1b expression and CCND1 polymorphism in the pathogenesis of multiple myeloma and mantle cell lymphoma. *BMC Cancer* 6 (2006), 238.

Kuroda Y, Sakai A, Tsuyama N, Katayama Y, Munemasa S, Asaoku H, Okikawa Y, Nakaju N, Mizuno M, Ogawa K, Nishisaka T, Matsui H, Tanaka H & Kimura A : Ectopic cyclin D1

overexpression increases chemosensitivity but not cell proliferation in multiple myeloma. *Int J Oncol* 33 (2008), 1201-1213.

Lebwohl DE, Muise-Helmericks R, Sepp-Lorenzino L, Serve S, Timaul M, Bol R, Borgen P & Rosen N : A truncated cyclin D1 gene encodes a stable mRNA in a human breast cancer cell line. *Oncogene* 9 (1994), 1925-1929.

Lehmann U & Kreipe H : Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* 25 (2001), 409-418.

Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K & Quirke P : Unlocking the archive-gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol* 195 (2001), 66-71.

Lin S, Wang W, Wilson GM, Yang X, Brewer G, Holbrook NJ & Gorospe M : Down-regulation of cyclin D1 expression by prostaglandin A(2) is mediated by enhanced cyclin D1 mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 20 (2000), 7903-7913.

Lu F, Gladden AB & Diehl JA : An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res* 63 (2003), 7056-7061.

Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M & Okubo K : Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 27 (1999), 4436-4443.

McMahon C, Suthiphongchai T, DiRenzo J & Ewen ME : P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), 5382-5387.

Melo JV, Brito-Babapulle V, Foroni L, Robinson DS, Luzzatto L & Catovsky D : Two new cell lines from B-prolymphocytic leukaemia: characterization by morphology, immunological markers, karyotype and Ig gene rearrangement. *Int J Cancer* 38 (1986), 531-538.

Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, Bataille R & Avet-Loiseau H : Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 100 (2002), 1579-1583.

Motokura T & Arnold A : Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 3 (1993), 5-10.

Namba M, Ohtsuki T, Mori M, Togawa A, Wada H, Sugihara T, Yawata Y & Kimoto T:
Establishment of five human myeloma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* 25 (1989), 723-729.

Nilsson K, Bennich H, Johansson SG & Ponten J : Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clin Exp Immunol* 7 (1970), 477-489.

Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R & Montuenga LM : Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 8 (2007), 349-357.

Pettigrew CA & Brown MA : Pre-mRNA splicing aberrations and cancer. *Front Biosci* 13 (2008), 1090-1105.

Pich A, Ponti R, Valente G, Chiusa L, Geuna M, Novero D & Palestro G : MIB-1, Ki67, and PCNA scores and DNA flow cytometry in intermediate grade malignant lymphomas. *J Clin Pathol* 47 (1994), 18-22.

Porter TR, Richards FM, Houlston RS, Evans DG, Jankowski JA, Macdonald F, Norbury G, Payne SJ, Fisher SA, Tomlinson I & Maher ER : Contribution of cyclin d1 (CCND1) and E-cadherin (CDH1) polymorphisms to familial and sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 21 (2002), 1928-1933.

Pruneri G, Fabris S, Baldini L, Carboni N, Zagano S, Colombi MA, Ciceri G, Lombardi L, Rocchi M, Buffa R, Maiolo AT & Neri A : Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). *Am J Pathol* 156 (2000), 1505-1513.

Quintanilla-Martinez L, Davies-Hill, T; Fend, F; Calzada-Wack, J; Sorbara, L; Campo, E; Jaffe, ES; Raffeld, M: Sequestration of p27kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphomas (MCL): Implications for pathogenesis. *Blood* (2002), 3181-7

Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Specht K, Calzada-Wack J, Nathrath M, Schaich R, Hofler H & Fend F : Analysis of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat 3) pathway in multiple myeloma: Stat 3 activation and cyclin D1 dysregulation are mutually exclusive events. *Am J Pathol* 162 (2003), 1449-1461.

Rasmussen T, Knudsen LM & Johnsen HE : Frequency and prognostic relevance of cyclin D1 dysregulation in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 67 (2001), 296-301.

Raynaud SD, Bekri S, Leroux D, Grosgeorge J, Klein B, Bastard C, Gaudray P & Simon MP : Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclin D1 expression in B-cell malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 8 (1993), 80-87.

Reutens AT, Fu M, Wang C, Albanese C, McPhaul MJ, Sun Z, Balk SP, Janne OA, Palvimo JJ & Pestell RG : Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner. *Mol Endocrinol* 15 (2001), 797-811.

Ries LAG HB, Miller BA : Cancer statistics review 1973-1988. *Washington DC US govt printing office*, (1991).

Rimokh R, Berger F, Bastard C, Klein B, French M, Archimbaud E, Rouault JP, Santa Lucia B, Duret L, Vuillaume M & et al. : Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood* 83 (1994), 3689-3696.

Ronchetti D, Finelli P, Richelda R, Baldini L, Rocchi M, Viggiano L, Cuneo A, Bogni S, Fabris S, Lombardi L, Maiolo AT & Neri A : Molecular analysis of 11q13 breakpoints in multiple myeloma. *Blood* 93 (1999), 1330-1337.

Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltneane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J & Staudt LM : The

proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 3 (2003), 185-197.

Rydzanicz M, Golusinski P, Mielcarek-Kuchta D, Golusinski W & Szyfter K : Cyclin D1 gene (CCND1) polymorphism and the risk of squamous cell carcinoma of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 263 (2006), 43-48.

Sander B, Flygare J, Porwit-Macdonald A, Smith CI, Emanuelsson E, Kimby E, Liden J & Christensson B : 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* 117 (2005), 418-430.

Sawa HO, T.A.; Ukita, H.; Murakami, H.; Chiba, Y.; Kamada, H.; Hara, M.; Saito, I. : Alternative spliced forms of cyclin D1 modulate entry into the cell cycle in an inverse manner. *Oncogene* 16 (1998), 1701 - 1712.

Schaeffer M, Schneiderbauer M, Weidler S, Tavares R, Warmuth M, de Vos G & Hallek M : Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk kinases. *Mol Cell Biol* 21 (2001), 8068-8081.

Selby JV, Friedman GD & Fireman BH : Screening prescription drugs for possible carcinogenicity: eleven to fifteen years of follow-up. *Cancer Res* 49 (1989), 5736-5747.

Seto M, Yamamoto K, Iida S, Akao Y, Utsumi KR, Kubonishi I, Miyoshi I, Ohtsuki T, Yawata Y, Namba M: Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene* 7 (1992), 1401-1406.

Shimizu Y, Kato H & Schull WJ : Studies of the mortality of A-bomb survivors. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86). *Radiat Res* 121 (1990), 120-141.

Slotta-Huspenina J, Koch I, Richter M, Bink K, Kremer M, Specht K, Krugmann J, Quintanilla-Martinez L & Fend F : Cyclin D1 positive multiple myeloma: predominance of the short, 3'UTR-deficient transcript is associated with high cyclin D1 mRNA levels in cases with t(11;14)

translocation, but does not correlate with proliferation rate or genomic deletions. *Leuk Res* 32 (2008), 79-88.

Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, Senderowicz AM, Conti CJ & Knudsen ES : Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem* 278 (2003), 339-347.

Soverini S, Cavo M, Cellini C, Terragna C, Zamagni E, Ruggeri D, Testoni N, Tosi P, De Vivo A, Amabile M, Grafone T, Ottaviani E, Giannini B, Cangini D, Bonifazi F, Neri A, Fabris S, Tura S, Baccarani M & Martinelli G : Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood* 102 (2003), 1588-1594.

Specht K, Haralambieva E, Bink K, Kremer M, Mandl-Weber S, Koch I, Tomer R, Hofler H, Schuurin E, Kluin PM, Fend F & Quintanilla-Martinez L : Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood* 104 (2004), 1120-1126.

Specht K, Kremer M, Muller U, Dirnhofer S, Rosemann M, Hofler H, Quintanilla-Martinez L & Fend F : Identification of cyclin D1 mRNA overexpression in B-cell neoplasias by real-time reverse transcription-PCR of microdissected paraffin sections. *Clin Cancer Res* 8 (2002), 2902-2911.

Specht K, T; Müller, U; Walch, A; Werner, M; Höfler, H : Quantitative Gene Expression Analysis in Microdissected Archival Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue. *American Journal of Pathology* 158 (2001), 419-429.

Srinivasan M, Sedmak D & Jewell S : Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161 (2002), 1961-1971.

Stanta G & Schneider C : RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. *Biotechniques* 11 (1991), 304, 306, 308.

Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC & Croce CM : Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224 (1984), 1403-1406.

von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M & Fogh J : Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst* 55 (1975), 555-560.

von Smolinski D, Leverkoehne I, von Samson-Himmelstjerna G & Gruber AD : Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. *Histochem Cell Biol* 1-(2005), 12.

Wang L, Habuchi T, Mitsumori K, Li Z, Kamoto T, Kinoshita H, Tsuchiya N, Sato K, Ohyama C, Nakamura A, Ogawa O & Kato T : Increased risk of prostate cancer associated with AA genotype of cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Int J Cancer* 103 (2003), 116-120.

Wang L, Habuchi T, Takahashi T, Mitsumori K, Kamoto T, Kakehi Y, Kakinuma H, Sato K, Nakamura A, Ogawa O & Kato T : Cyclin D1 gene polymorphism is associated with an increased risk of urinary bladder cancer. *Carcinogenesis* 23 (2002), 257-264.

Wang SS, Cozen W, Severson RK, Hartge P, Cerhan JR, Davis S, Welch R, Rothman N & Chanock SJ : Cyclin D1 splice variant and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Hum Genet* 120 (2006), 297-300.

Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, Wright G, Gibellini F, Nakayama K, Liu H, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Vose J, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Montserrat E, Bosch F, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Fisher RI, Grogan TM, Miller TP, Wilson WH, Jaffe ES & Staudt LM : Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood* 109 (2007), 4599-4606.

Williams ME, Swerdlow SH & Meeker TC : Chromosome t(11;14)(q13;q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster. *Leukemia* 7 (1993), 1437-1440.

Wilson CS, Butch AW, Lai R, Medeiros LJ, Sawyer JR, Barlogie B, McCourty A, Kelly K & Brynes RK : Cyclin D1 and E2F-1 immunoreactivity in bone marrow biopsy specimens of multiple myeloma: relationship to proliferative activity, cytogenetic abnormalities and DNA ploidy. *Br J Haematol* 112 (2001), 776-782.

Withers DA, Harvey RC, Faust JB, Melnyk O, Carey K & Meeker TC : Characterization of a candidate bcl-1 gene. *Mol Cell Biol* 11 (1991), 4846-4853.

Xiong Y, Connolly T, Futcher B & Beach D : Human D-type cyclin. *Cell* 65 (1991), 691-699.

Yu CP, Yu JC, Sun CA, Tzao C, Ho JY & Yen AM : Tumor susceptibility and prognosis of breast cancer associated with the G870A polymorphism of CCND1. *Breast Cancer Res Treat* 107 (2008), 95-102.

Zwijssen RM, Wientjens E, Klompmaker R, van der Sman J, Bernardis R & Michalides RJ : CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88 (1997), 405-415.

8. Anhang

8.1 Materialien

8.1.1 Chemikalien und biochemische Reagentien

Agarose	Biozym (Oldendorf)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid	Serva (Heidelberg)
dNTP's	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethanol, absolut (p.a.)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Eurobio (Courtaboeuf Cedex, Frankreich)
Formaldehyd (4% v/v)	Staub und Co. (München)
Hämatoxylin	Shandon (Frankfurt am Main)
Hoechst 33342	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Lithiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Molekulargewichtsmarker IX	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Oligo(dT)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Plasma (human)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Random Hexamers	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen)
RNase freies Wasser	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Eurobio (Courtaboeuf Cedex, Frankreich)
Thrombin (aus Rinderplasma)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
Xylol	Merck (Darmstadt)

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
T-Per	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen)
Complete Mini	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen)

8.1.2 Puffer und Lösungen

5x Lysepuffer (RNA)	50 mM	TrisHCl (pH=8,0)
	0,5 mM	EDTA (pH=8,0)
	2 %	SDS
10x TBE		Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
20x Saline Natrium Citrat		Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Bis Tris Gel (NuPAGE Gel)		Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Bromphenol Blue-Xylene Cyanide Dye		Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Citratpuffer (pH 6)		Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Hi Di Formamid		Applied Biosystems (Foster C., USA)
Proteinase K Puffer (DNA)	1 M	TrisHCl (pH=8,3)
	0,5 M	EDTA (pH=8,0)
	0,1 %	Tween 20 (steril filtriert)

8.1.3 Kits und Reaktionssysteme

BCA Protein Assay Kit	Pierce (Boston, MA, USA)
Big Dye Terminator Cycle Sequencing	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Cycle Sequencing Ready Reactions Kit 1.1	ABI PRISM
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen (Hilden)
Gelextraktionskit	Qiagen (Hilden)
Mini Prep Spin Kit	Qiagen (Hilden)
PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RQ1 Rnase-free Dnase Kit	Promega (Madison, WI, USA)
qPCR Core Reagents	Eurogentec (Seraing, Belgien)

8.1.4 Enzyme

Ampli Taq Gold	Eurogenec (Seraing, Belgien)
----------------	------------------------------

DNase	Promega (Mannheim)
NCI Puffer und Enzym	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Pronase E	Merck (Darmstadt)
Proteinase K	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen)
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Thrombin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

8.1.5 Antikörper

Cyclin D1 (Klon P2D11F11)	Novocastra (Newcastle, GB)
Ki67 (MIB 1)	Dako (Kopenhagen, Dänemark)
Plasmazell-Antikörper VS38C	Dako (Kopenhagen, Dänemark)

8.1.6 Verbrauchsmaterialien

96- Lochplatten Thermo fast	Abgene (Epsom, UK)
Lochplatten-Folien	Abgene (Epsom, UK)
Kryogefäße (2 ml)	Elscolab (Kriubeke, Belgien)
Microtom-Klingen SEC 35	Richard-Allan Scientific (Kalamazoo, MI, USA)
Objektträger (SuperfrostPlus)	Langenbrinck (Emmendingen)
Pipettenspitzen (RNase-frei)	Fisher Scientific (Schwerte)
Reaktionsgefäße (RNase-frei, 1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Sarstedt-Röhrchen (1,5 ml)	Biozym (Hess. Oldendorf)
Zellkulturflaschen T75	TPP (Switzerland)
Zellschaber	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Nitrocellulose-Membran	Amersham (Buckinghamshire, UK)

8.1.7 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

Dulbecco`s modified Eagle`s Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco`s PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA Laboratories (Pasching, Austria)
Dulbecco`s <u>Phosphate-Buffered Saline</u>	PAA Laboratories (Pasching, Austria)
Fötale Kälberserum	PAN (Aidenbach)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Mc Coy`s 5A Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumpyruvat (100 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)

RPMI 1640 mit Glutamax und HEPES	Invitrogen (Karlsruhe)
Streptomycin-Penicillin	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	PAA Laboratories (Pasching, Austria)

8.1.8 Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence DeteCTor	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
ABI PRISM R 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Camera HW/C20	Hitachi (Düsseldorf)
Eagle Eye II	Stratagene (La Jolla, USA)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad (Hercules, USA)
Gewebe-Einbettautomat	Shandon (Frankfurt am Main)
Immunostainer	Ventana (Tucson, AZ, USA)
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
LSM-510 NLO Lasermikroskop	Zeiss (Jena)
Magnetrührer	Ikamag (Staufen)
Mikroskop Axioplan	Zeiss (Jena)
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss (Jena)
Mikrowellengerät MM10048	Mikromaxx (Mühlheim/ Ruhr)
Minishaker MS1	IKA (Willmington, USA)
Nanodrop ND-1000	NanoDropTechnologies Inc.(Wilmington, NC, USA)
Neubauer Zählkammer	Roth (Karlsruhe)
PALM Laser-Microbeam System	Palm (Wolftratshausen)
Thermocycler Primus 96plus	MWG- Biotech (Mendenhall, USA)
pH-Meter	Hanna instruments (Kehl am Rhein)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Schlittenmikrotom HM 335 E	Microm (Walldorf/Baden)
SpeCTrophotometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech (Piscataway, USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Zellkulturwerkbank Hera Safe	Heraeus (Hanau)

8.1.9 Oligonukleotide (Primer und Sonden)

Primer und Sonden für die Standard-PCR (RFLP) und die Sequenzierung sind in Tabelle 21, für die quantitative RT-PCR in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 21: Primer für die Standard-PCR und die Sequenzierung (kursiv)

Primer	Position	Sequenz	Amplifikationslänge (bp)	Referenz/Genbank
beta Globin-F	Promotor	5'- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC - 3'	267	NM000518.4
beta Globin-R	Exon 1	5'- CAACTTCATCCACGTTACC - 3'		
D1-F (A870G)	Exon 4	5'- GTGAAGTTCATTTCCAATCCGC -3'	167	Howe et al 2001
D1-R (A870G)	Intron 4	5'- GGGACATCACCCCTCACTTAC -3'		
<i>D1-F (Poly A 1)</i>	<i>3'UTR</i>	5'- AGGGAAAGCTTCATTCTCCTTGTT -3'	195	NM053056
<i>D1-R (Poly A 1)</i>	<i>3'UTR</i>	5'- ATAAAAATCCTCTATCATCTGTAGCACAACC -3'		
<i>D1-F (Poly A 2)</i>	<i>3'UTR</i>	5'- TCTCTGTTGTAAGAATAGGCATTAACACA - 3'	189	NM053056
<i>D1-R (Poly A 2)</i>	<i>3'UTR</i>	5'- GCCTAGAACCCCACTACAGCTG -3'		

F: forward; R: reverse; UTR: untranslatierte Region; bp: Basenpaare

Tabelle 22: Primer und Sonden für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) und die genomische quantitative PCR (qPCR)

Assay	Primer	Sequenz	Position	Länge des PCR Produkts (bp)	Genbank
qRT-PCR					
D1 total	F-P	5'- CCGTCCATGCGGAAGATC- 3'	Exon 1-2	70	NM053056
	R -P	5'- CCTCCTCCTCGCACTTCTGT- 3'			
	S	6-FAM-CTCGCAGACCTCCAGCATCCAGGT-TAMRA			
D1 3'UTR	F-P	5'- TTTTCTACCCAACGGCCCT- 3'	3'UTR	75	NM053056
	R -P	5'- TGAAGAAGAACACAAACCAAGTAGCT- 3'			
	S	6-FAM-CAGCTCACGTCCAGGTTCAACCCA-TAMRA			
D1 alpha	F-P	5'- CCTACTACCGCCTCACACGC- 3'	Exon 4-5	81	NM053056
	R -P	5'- CGATCTGCTCCTGGCAGG- 3'			
	S	6-FAM-CAGAGTGATCAAGTGTGACC-mgb			
D1 beta	F-P	5'- CCTACTACCGCCTCACACGC- 3'	Exon 4-Intron 4	122	NM053056
	R -P	5'- GCATTTCCGTGGCACTAGGT- 3'			
	S	6-FAM-CAGAGTGATCAAGTGTGACC-mgb			
TBP	F-P	5'- GCCCGAAACGCCGAATAT- 3'	Exon 4-5	73	NM003194.3
	R -P	5'- CCGTGGTTCGTGGCTCTCT- 3'			
	S	6-FAM-ATCCCAAGCGGTTTGCTGCGG-TAMRA			
qPCR					
D1 3'UTR	F-P	5'- TTTTCTACCCAACGGCCCT- 3'	3'UTR	75	NM053056
	R -P	5'- TGAAGAAGAACACAAACCAAGTAGCT- 3'			
	S	6-FAM-CAGCTCACGTCCAGGTTCAACCCA-TAMRA			
SOCS 1	F-P	5'- TTTCGCCCTTAGCGTGAAGAT- 3'	Exon 1	79	NM003745
	R -P	5'- ATCCAGGTGAAAGCGGCC- 3'			
	S	6-FAM-CTCGGGACCCACGAGCATCCG-TAMRA			
beta Globin	F-P	5'- ACCCTTAGGCTGCTGGTGG- 3'	Intron 1- Exon 2	70	NG000007
	R -P	5'- GGAGTGGACAGATCCCCAAA- 3'			
	S	6-FAM - CTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTC-TAMRA			

F-P: forward-primer; R-P: reverse-primer; S: Sonde; bp: Basenpaare

Die Primer wurden von Dr. Linzner, Pathologisches Institut der GSF (Neuherberg), die FAM-TAMRA markierten Sonden von der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg) und die mgb-Sonden von der Fa. Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) hergestellt.

Für die FISH-Analysen wurden die LSI IgH/CCND1 Dual Color Dual Fusion Translocation“-Sonde und die „LSI Cyclin D1/CEP 11 Dual Color“- Sonde der Fa. Vysis Inc (Downers Grove IL, USA) verwendet.

8.1.10 Plasmide

Zur Berechnung der Amplikon-Kopienanzahl wurden in der qRT-PCR Analyse folgende von Frau Dr. Ina Koch (Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie, München) etablierte Plasmidstandards verwendet (Tabelle 23).

Tabelle 23: Plasmidstandards

Plasmid-Nr.	Gen	klonierter Bereich	Insert-Länge (bp)	Vektor
p5	Cyclin D1 alpha	ORF	1118	pCR2.1
p6	Cyclin D1 beta	ORF	1334	pGemTeasy
p11	Cyclin D1 3'UTR	Teile der 3'UTR	506	pGemTeasy
p13	TBP	ORF	564	pCRII-Topo

Bp: Basenpaare; ORF: open reading frame

8.2 Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Aqua p.a.	Aqua per analysii
Bp	Basenpaare (engl. base pairs)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: complementary deoxyribonucleic acid)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest. destillata	einfach destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
(d) NTP	(Desoxy) Nukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Et alii (lat.: und andere)
Fa.	Firma
FAM	6-Carboxyfluorescein
FFPE	F ormalin f ixiert und P araffin eingebettet
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
G	Guanin
h	Stunde
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaCTion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (lat.: potentia Hydrogenii)
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-PCR
qPCR	quantitative PCR

RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Reverse Transkription – quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
U	Umdrehungen

8.3 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Klinische Symptome und Komplikationen beim MM.....	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung der MM-Zelltypen und Histologie.	11
Abbildung 3: Genetische Ereignisse in der Pathogenese der Plasmazellneoplasien.	14
Abbildung 4: CDK-abhängige Funktion von Cy	19
Abbildung 5. Schematische Darstellung des CyD1 Genes	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung des CyD1 Proteins.....	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Prozessierung von DNA zur reifen mRNA.....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung der langen und kurzen CyD1a mRNA.	24
Abbildung 9: Schematische Darstellung der CyD1a und CyD1b mRNA.	25
Abbildung 10: Standardkurven der Plasmidverdünnungsreihen D1 total und D1 3'UTR	39
Abbildung 11: Schematische Darstellung der CyD1 mRNA Varianten und Lage der Assays	46
Abbildung 12: Amplifikationskurven der Plasmidstandardverdünnungsreihe.....	50
Abbildung 13: Original Screenshot.....	51
Abbildung 14: Zelllinienbasierter Versuchsaufbau	54
Abbildung 15: % CyD1b mRNA im nativen und FFPE Zellmaterial.	62
Abbildung 16: Einfluss der Expressionshöhe eines Gens auf CT-Werte	64
Abbildung 17: Einfluss von Adenosingehalt und Amplikonlänge auf CT-Werte.....	67
Abbildung 18: Einfluss der „Autolysezeit“ auf CT-Werte.	69
Abbildung 19: Einfluss der Dauer des Proteinase K Verdaus auf CT-Werte.....	70
Abbildung 20: Relative CyD1mRNA Expressionshöhe im MM.....	73
Abbildung 21: CyD1-Immunhistochemie.....	74
Abbildung 22: MIB-1-Immunhistochemie	75
Abbildung 23: Korrelation zwischen Proliferationsrate und CyD1mRNA Expressionshöhe	76
Abbildung 24: FISH.....	77
Abbildung 25: Ergebnisse der FISH-Analyse, der qRT-PCR und Immunhistochemie.....	78
Abbildung 26: CyD1 mRNA und Proteinexpressionshöhe im MM.....	80
Abbildung 27: Amplifikationskurven des CyD1 total und CyD1 3'UTR-Assays.....	82
Abbildung 28: Korrelation zwischen kurzer CyD1a mRNA und CyD1mRNA Expressionshöhe	87
Abbildung 29: Korrelation zwischen kurzer CyD1a mRNA und Proliferationsrate	89
Abbildung 30: Kaplan-Meier Überlebensanalyse.....	90

Abbildung 31: Gelelektrophoresebilder.....	97
Abbildung 32: Korrelation zwischen CyD1beta mRNA und Genotyp A870G.....	98
Abbildung 33: Korrelation zwischen CyD1 b mRNA und Proliferationsrate.	99
Abbildung 34: Korrelation zwischen CyD1 mRNA Expressions und Morphologie.....	101
Tabelle 1 : TC-Klassifikation	16
Tabelle 2: Humane Zelllinien.....	29
Tabelle 3: PCR-Bedingungen für die Amplifikation des beta Globin Gens.....	37
Tabelle 4: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Exon 4/Intron 4 und des 3'UTR	37
Tabelle 5: Konzentration der Primer und Sonden.....	41
Tabelle 6: PCR-Bedingungen für den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide	42
Tabelle 7: Sensitivität der qRT-PCR.....	49
Tabelle 8: Verhältnis zwischen Startkopienanzahl des Ziel, -und der Referenzgene	52
Tabelle 9: CT-Unterschiede zwischen FFPE,-und nativem Zelllinienmaterial	56
Tabelle 10: p-Werte	58
Tabelle 11: Korrekturfaktoren.....	60
Tabelle 12: Anwendungsbeispiel für Korrekturfaktoren	61
Tabelle 13: Ergebnisse der Immunhistochemie und der qRT-PCR Analyse.....	75
Tabelle 14: qRT-PCR Ergebnisse	80
Tabelle 15: Patientendaten und Ergebnisse der qRT-PCR und Immunhistologie	84
Tabelle 16: Patientendaten und Ergebnisse der qRT-PCR und Immunhistologie	85
Tabelle 17: Ergebnisse der quantitativen genomischen PCR-Analyse.....	92
Tabelle 18: Ergebnisse der quantitativen genomischen PCR-Analyse	93
Tabelle 19: qRT-PCR Ergebnisse in Zelllinien	95
Tabelle 20: Häufigkeit der Bartl Grade I, II und III.....	100
Tabelle 21: Primer für die Standard-PCR und die Sequenzierung	134
Tabelle 22: Primer und Sonden für die qRT-PCR und qPCR.....	135
Tabelle 23: Plasmidstandards.....	136

8.4 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bei nationalen und internationalen **wissenschaftlichen Kongressen** vorgetragen:

Vorträge:

Slotta-Huspenina J., Koch I., Richter M., Kremer M., Specht K., Krugmann J., Quintanilla-Martinez L., Fend F.

„Expression von Cyclin D1 Transkript-Varianten beim multiplen Myelom“

89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Wuppertal 20. Mai 2005

Slotta-Huspenina J., Koch I., Richter M., Bink, K., Kremer M., Specht K., Krugmann J., Quintanilla-Martinez L., Fend F.

„Cyclin D1 positive multiple myeloma: loss of the 3'UTR is associated with high cyclin D1 mRNA levels, but does not correlate with proliferation rate or genomic deletions.“

95 th Annual meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, Atlanta, United States of America, 13. Februar 2006

Posterpräsentation:

Koch I., **Slotta-Huspenina J.**, Fend F.

„Quantifizierung der Genexpression in Formalin-fixiertem Gewebe: Einfluss unterschiedlicher mRNA Stabilität.“

89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Wuppertal 20. Mai 2005

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

*Koch, I.; ***Slotta-Huspenina, J.**; Hollweck, R.; Anastasov, N.; Höfler, H.; Quintanilla-Martinez, L.; Fend, F.

“Real-time Quantitative RT-PCR Shows Variable, Assay-dependent Sensitivity to Formalin Fixation: Implications for Direct Comparison of Transcript Levels in Paraffin-embedded Tissues.”

Diagnostic Molecular Pathology; 15(2006);149-156.

*** geteilte Erstautorenschaft**

J. Slotta-Huspenina* , I. Koch*, M. Richter, K. Bink, M. Kremer, K. Specht, J. Krugmann, L. Quintanilla-Martinez, F. Fend

“Cyclin D1 positive multiple myeloma: Predominance of the short, 3’UTR-deficient transcript is associated with high cyclin D1 mRNA levels in cases with t(11;14) translocation, but does not correlate with proliferation rate or genomic deletions“.

Leukemia research, 32(2008);79-88.

*** geteilte Erstautorenschaft**

Salaverria I, Espinet B, Carrió A, Costa D, Astier L, **Slotta-Huspenina J**, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Solé F, Colomer D, Serrano S, Miró R, Beà S, Campo E.

„Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques.“

Genes Chromosomes Cancer; 47(2008);1086-97.

Danksagung

An dieser Stelle sei all denjenigen gedankt, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Allen voran möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Falko Fend für die Überlassung des Themas und sein weit überdurchschnittliches Engagement bei der Leitung dieses Projekts bedanken. Während der vergangenen drei Jahre stand er mir jederzeit mit seiner fachlichen und menschlichen Kompetenz hilfsbereit zur Seite.

Großer Dank gebührt auch Frau Dr. Ina Koch für die ausdauernde Betreuung des praktischen Teils der Arbeit. Vielen Dank für den Entwurf und die Überlassung der TaqMan Assays.

Besonders möchte ich mich bei Frau PD. Dr. Leticia Quintanilla-Martinez, Frau Dr. Karin Bink und Herrn PD. Dr. Markus Kremer bedanken, die mir im Rahmen der Laborbesprechungen gute Tipps und auch tatkräftige Hilfe für den molekularbiologischen Teil der Arbeit gegeben haben. Frau Quintanilla-Martinez und Frau Bink möchte ich zudem für die Durchführung und Auswertung der Westernblots bzw. die FISH-Analysen danken. Dank geht auch an Frau Raimonde Busch für die statistische Auswertung der Daten.

Dank gebührt Herrn Sebastian Warnecke und Frau Birgit Geist, die mir im Rahmen der täglichen Arbeit im Labor mit so manchen praktischen Tipps weiterhalfen.

Ganz besonders herzlich möchte ich meinem geliebten Ehemann und meinen beiden Söhnen Paul und Niklas danken, dass sie mein Vorhaben immer unterstützt haben und meine Abwesenheit meist sehr geduldig ertragen haben. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

Herzlicher Dank geht natürlich auch an meine Eltern und meine Schwiegermutter Monika für die finanzielle Unterstützung und stets tatkräftige Hilfe. Weiterhin bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung der TU München, die ich im Rahmen eines Promotionsstipendiums (HWP II) erhalten habe.

Zuletzt gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler für die Schaffung sehr guter Rahmenbedingungen für Doktoranden (und Assistenten) in seinem Institut.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Bianca Julia Slotta-Huspenina

Geburtsdatum: 13.Juni 1974

Geburtsort: Bogen, Niederbayern

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (Geburtsjahr 1998 bzw. 2002)

Schulische und Akademische Ausbildung und Berufstätigkeit:

Sept. 1981- Juli 1985	Grundschule Metten
Sept. 1985- Juli 1994	Robert-Koch-Gymnasium, Deggendorf
Juli 1994	Allgemeine Hochschulreife
April 1995- April 1997	Vorklinisches Studium an der LMU München
April 1997- April 2002	Klinisches Studium an der Technischen Universität München
März 1997	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Aug. 2000	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Aug. 2000- Aug. 2001	<u>Praktisches Jahr</u>
Aug. 2000- Jan. 2001	Wahlfach Pathologie: Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München
Jan- Apr. 2001	Chirurgie: Krankenhaus München-Bogenhausen
Apr.- Aug. 2001	Innere Medizin: Klinikum Rechts der Isar, TU München
Apr. 2002	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,16)
Okt. 2004	Vollapprobation
seit 2006	Assistenzärztin am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München

Sonstiges:

1998	Stipendiatin der Oskar-Karl-Forster-und der Prof. Dr.WilhelmWittmann`schen Stiftung (TU München)
1999	Stipendiatin des Nicolaus-Fond (TU München)
2002- 2003	Stipendiatin der Technischen Universität München im Rahmen des Programms „Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“(HWP II).