

**Beteiligung des Transmembranrezeptors CD5 und der durch
miRNA modulierten Expression des Proto-Onkogens PLAG1 an
der Pathogenese der Chronischen Lymphatischen Leukämie**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Michaela Patz

aus Hanau

Köln, 2009

Berichtersteller/in: PD Dr. Roswitha Nischt

Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2009

Inhalt

Zusammenfassung	1
Abstract.....	3
1 Einleitung	5
1.1 Chronische Lymphatische Leukämie (CLL).....	5
1.1.1 Krankheitsverlauf der CLL.....	5
1.1.2 Mögliche Vorläufer von CLL-Zellen.....	6
1.1.3 Überleben der CLL-Zelle	6
1.2 CD5 und sein molekulares Umfeld.....	7
1.2.1 Der Transmembranrezeptor CD5.....	7
1.2.2 Der B-Zell Rezeptor (BZR) und dessen Aktivierung	10
1.2.3 Src-Kinasen	10
1.2.4 Syk-Kinasen	12
1.2.5 SHP1	12
1.2.6 Experimentelle Aktivierung von CD5-induzierten Signalkaskaden.....	12
1.2.7 Chimäre Rezeptoren als Modelle für eine ligandeninduzierte CD5-Stimulation	13
1.3 Beteiligung veränderter microRNA-Expression an einer veränderten Proteinexpression in der CLL	14
1.3.1 RNA-Interferenz (RNAi) und microRNA (miRNA).....	14
1.3.2 Prozessierung von microRNA	15
1.3.3 Regulationsmechanismen durch microRNA	16
1.3.4 Bedeutung der microRNA-Regulation in neoplastischen Erkrankungen.....	17
1.3.5 Das Proto-Onkogen PLAG1	18
1.4 Fragestellung.....	19
2 Material	21
2.1 Verbrauchsmaterial	21
2.1.1 Plastikware	21

2.1.2	Reagenzien.....	21
2.1.3	Verwendete Zelllinien.....	24
2.1.4	Verwendete Plasmide und Primer.....	24
2.2	Verwendete Geräte	26
2.3	Verwendete Puffer.....	26
3	Methoden.....	27
3.1	Arbeiten in der Zellkultur	27
3.1.1	Zelllinien.....	27
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
3.1.3	Gewinnung von primären Zellen.....	27
3.2	Herstellen der verwendeten Plasmide.....	28
3.2.1	Klonierungen in den pCDNA6-Vektor	28
3.2.2	Klonierungen in den pIS1-Vektor.....	29
3.3	Transfektion der verwendeten Plasmide.....	30
3.3.1	Transfektionen von Zelllinien.....	30
3.3.2	Luziferase-Assay	31
3.3.3	Transfektionen von primären Zellen	32
3.4	Crosslinking	32
3.5	Stimulierungen.....	33
3.5.1	Stimulierungen mit EGF.....	33
3.5.2	Stimulierungen mit IgM	33
3.5.3	Stimulierungen mit CD5.....	34
3.6	XTT-Assay	34
3.7	Herstellung von Lysaten	35
3.7.1	Proteinbestimmung.....	35
3.8	Immunopräzipitation.....	35
3.9	Kinase-Assay	36

3.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.11	Western Blot.....	37
3.12	Immunodetektion	37
3.12.1	Strippen der Membran	37
3.13	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	38
3.14	Gewinnung von cDNA	38
3.14.1	Arbeiten mit dem Light-Cycler	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Beteiligung von CD5 an der Pathogenese der CLL.....	40
4.1.1	Ein chimärer Rezeptor aus EGFR und CD5 kann in Mec1-Zellen stabil auf der Membran exprimiert werden.....	40
4.1.2	Dimerisierung von CD5-EGFR nach EGF-Zugabe	42
4.1.3	Zeitverlauf der Tyrosinphosphorylierung in Mec1-Klonen nach EGF-Behandlung.....	43
4.1.4	Mögliche liganden-induzierte Src-Kinase-Aktivierung in Zelllinien, die CD5-EGFR exprimieren	45
4.1.5	Das Wachstum von CD5-EGFR exprimierenden B-Zellen wird durch EGF-Stimulierung nicht beeinflusst.....	48
4.1.6	Einfluss von CD5 auf die Überlebensregulation durch den B-Zell-Rezeptor.....	50
4.1.7	Patientenzellen, aber nicht CD5-positive Mec1-Zellen, zeigen eine erhöhte Viabilität nach CD5-Stimulation durch Anti-CD5 Antikörper.....	52
4.1.8	Die cytoplasmatische Domäne ist bei Expression von CD5 in Mec1-Zellen konstitutiv phosphoryliert	54
4.1.9	Charakterisierung CD5-positiver und -negativer Zelllinien auf Proteinebene	56
4.1.10	Verminderte Proteinexpression der klassischen PKC-Isoformen in CD5-positiven Mec1-Zellen.....	58
4.1.11	CD5-positive Zelllinien exprimieren weniger PKC α mRNA	58

4.1.12	Die Expression von IL-10 mRNA wird nicht durch CD5-Expression reguliert	61
4.1.13	CD5-positive Mec1-Zellen zeigen eine verringerte Viabilität.....	63
4.2	Modulierte Expression von PLAG1 durch microRNA in CLL	65
4.2.1	Identifizierung von PLAG1 als mögliches Zielgen.....	65
4.2.2	PLAG1 ist in CLL-Zellen überexprimiert.....	66
4.2.3	MicroRNAs können an die 3'UTR von PLAG1 binden	67
4.2.4	Retransfektion von microRNA in CLL-Zellen kann zu einer verstärkten Apoptoseinduktion führen.....	70
5	Diskussion.....	72
5.1	Beteiligung von CD5 an der Pathogenese der CLL?	72
5.1.1	Stimulierung des chimären Rezeptors in Mec1-Zellen als Modell zur Klärung der Funktion von CD5 in CLL	72
5.1.2	Aktivierung von CD5-Signalkaskaden in primären CLL-Zellen	76
5.1.3	Expression von CD5 in Zelllinien zur Klärung der Funktion von CD5 in CLL	77
5.1.4	Beeinflusst das Vorliegen der cytoplasmatischen Domäne von CD5 das Überleben der CLL-Zelle?	79
5.1.5	Ausblick.....	81
5.2	Die Beteiligung von microRNA an der Pathogenese der CLL	82
5.2.1	Überexpression von PLAG1 in CLL	82
5.2.2	Regulation von miRNA an dem 3'UTR von PLAG1	83
5.2.3	Retransfektion von miRNA in CLL-Zellen	84
5.2.4	Weiterführende Experimente	85
5.3	Ausblick.....	86
6	Literaturverzeichnis.....	87
7	Anhang	103
	Abkürzungsverzeichnis.....	103
	Abbildungsverzeichnis	105

Tabellenverzeichnis.....	107
Danksagung	108
Lebenslauf.....	110

Zusammenfassung

Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist bis heute nicht heilbar. Für die Entwicklung neuer Therapieoptionen ist es wichtig, die Ursachen für das verstärkte Überleben der leukämischen B-Zellen zu verstehen. Der deregulierten Expression von Proteinen und RNA wird hierfür eine bedeutende Rolle zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit werden in diesem Zusammenhang die Proteine CD5 und PLAG1 betrachtet.

Eine hohe Expression des Transmembranrezeptors CD5 ist charakteristisch für CLL-Zellen. Um den Einfluss von CD5-abhängigen Signalwegen in der CLL zu analysieren, wurde bislang der Rezeptor mit Hilfe von Antikörpern stimuliert. Jedoch können Antikörper unspezifische Reaktionen in der Zelle hervorrufen. Um dies zu vermeiden, wurde für die vorliegende Arbeit ein chimärer Rezeptor (CD5-EGFR) konstruiert und in die CLL-ähnliche Zelllinie Mec1 stabil transfiziert.

Die Expression des chimären Rezeptors auf der Zelloberfläche und seine Dimerisierung nach Liganden-Zugabe konnte erfolgreich gezeigt werden. Der Nachweis einer liganden-spezifischen Aktivierung von CD5-spezifischen Signalkaskaden in diesem System gelang jedoch nicht. Ebenso zeigten Mec1-Klone, die CD5-EGFR oder CD5 stabil exprimieren, nach Stimulierung des chimären Rezeptors mit Ligand oder des nativen CD5-Rezeptors durch Anti-CD5 Antikörper kein verändertes Wachstum. An primären CLL-Zellen verbesserte dieselbe Behandlung mit Anti-CD5 Antikörpern im Durchschnitt die Viabilität. Auf Grund der stark unterschiedlichen Antworten der einzelnen CLL-Proben reagierten einige der untersuchten CLL-Klone, ähnlich den CD5-positiven Mec1-Zellen, nicht auf die Antikörper-vermittelte Stimulation.

Eine Untersuchung konstitutiver Effekte der CD5-Expression war naheliegend, da an der cytoplasmatischen Domäne von CD5 eine Tyrosinphosphorylierung und eine Assoziation mit der Phosphatase SHP1 im Western Blot nachgewiesen wurde. Untersuchungen an den Zelllinien Hek293, Jurkat und Mec1 zeigten, dass die ektopische Expression der cytoplasmatischen Domäne von CD5 die mRNA-Expression der Serin-Threonin Kinase PKC α herabsetzt. In fünf unabhängigen Mec1-Klonen verringerte die Expression der cytoplasmatischen Domäne von CD5 stets die metabolische Aktivität der Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass allein die Expression der cytoplasmatischen Domäne von CD5 ohne weitere Stimulation einen Einfluss auf Signalkaskaden, die Genexpression und die metabolische Aktivität hat, und damit zur Pathogenese der CLL beitragen kann.

Die zweite in dieser Arbeit behandelte Fragestellung basiert auf miRNA-Array-Analysen, bei denen die Herabregulation einiger miRNAs in CLL-Zellen im Vergleich zu B-Zellen gesunder Probanden gefunden wurde. Durch bioinformatische Analysen der vorhergesagten Bindestellen dieser miRNAs, wurde die mRNA des Proto-Onkogens PLAG1 als potentielle Zielstruktur von deregulierten miRNAs in CLL-Zellen identifiziert. Durch die verringerte miRNA-Expression könnte die Proteinexpression von PLAG1 erhöht werden. Tatsächlich war das Expressionsniveau von PLAG1 in CLL-Zellen höher als in B-Lymphozyten gesunder Probanden. Durch Luziferase-Reporter-Assays konnte gezeigt werden, dass die identifizierten miRNAs an die vorhergesagten Bindestellen in der 3'UTR von PLAG1 mRNA binden und dadurch die Translation des Reportergens herabsetzen. Transfektion dieser miRNAs in primäre CLL-Zellen führte bei einigen CLL-Proben zu einem erhöhten Anteil apoptotischer Zellen. Diese Experimente legen nahe, dass eine Erhöhung der PLAG1-Expression mangels bestimmter miRNAs an der Pathogenese der CLL beteiligt sein könnte.

Abstract

Chronic Lymphatic Leukemia (CLL) is still an incurable disease. For the development of therapeutic options it is necessary to understand the reasons for the improved survival of leukemic B-cells. An important role is ascribed to the deregulated expression of proteins and RNA in CLL cells. In this context the proteins CD5 and PLAG1 were examined in the present work.

High expression of the transmembrane receptor CD5 on B-cells is distinctive for CLL cells. For analysis of CD5-induced signaling pathways in CLL, so far the receptor has been stimulated by means of antibodies. Antibodies, however, may elicit unspecific effects on the cell. To avoid these effects a chimeric receptor (CD5-EGFR) was constructed and transfected into the CLL-like cell line Mec1.

Expression of the chimeric construct on the cell surface and its dimerisation after addition of ligand were successfully demonstrated. The proof for ligand-specific activation of CD5-induced signaling cascades in this system, however, failed. Similarly, Mec1 clones stably expressing CD5-EGFR or CD5 did not show any changes in growth after stimulation with ligand or anti-CD5 antibodies. For primary CLL samples the same treatment with anti-CD5 antibodies on the average improved cell viability. Due to strongly different response of individual CLL samples, some of the investigated CLL clones, similarly to CD5-positive Mec1 cells, did not respond at all to antibody-mediated stimulation.

It was obvious to investigate constitutive effects of CD5-expression, since tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of CD5 and its association with the phosphatase SHP1 was detected by Western Blot. Investigations of the cell lines Hek293, Jurkat and Mec1 showed that ectopic expression of the cytoplasmic domain of CD5 reduces the mRNA expression of the serine-threonine kinase PKC α . In five independent Mec1 clones expression of the cytoplasmic domain always decreased the metabolic activity of the cells. These results indicate that expression of the cytoplasmic domain of CD5, independently of its external stimulation can influence signaling cascades, gene expression and metabolic activity and thus contribute to the pathogenesis of CLL.

The second topic of this thesis is based on miRNA-Array analysis, which showed down regulated miRNA expression in CLL cells as compared to peripheral B-cells of healthy donors. Bioinformatic analysis of the predicted binding sites for these miRNAs identified

the mRNA of the proto-oncogene PLAG1 as a potential target of deregulated miRNAs in CLL cells. Reduced miRNA expression might increase the protein expression of PLAG1. Indeed, PLAG1 protein levels in CLL cells were higher than in B-lymphocytes from healthy donors. Luciferase-reporter-assays showed that miRNAs bind to the predicted binding sites in the 3'UTR of the PLAG1 mRNA and reduce translation of the reporter gene. Transfections of these miRNAs into CLL patient samples showed in some CLL samples resulted in an increased percentage of apoptotic cells. These experiments imply that an increased PLAG1 expression due to lack of certain miRNAs may be involved in the pathogenesis of CLL.

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zu der Beteiligung des Transmembranproteins CD5 und der durch miRNA modulierten Expression von PLAG1 in der Pathogenese der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) leisten. Dies verlangt zunächst eine ausführliche Auseinandersetzung mit der Erkrankung CLL sowie deren Ursachen (Abschnitt 1.1). Weiterhin ist die Kenntnis von CD5 und seiner molekularen Umgebung nötig (Abschnitt 1.2), sowie der Bedeutung von microRNA (miRNA) in Tumorerkrankungen (Abschnitt 1.3).

1.1 Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)

CLL ist in den Industriestaaten die häufigste Form der Leukämie bei Erwachsenen (Redaelli et al., 2004). Die Inzidenz liegt landesabhängig zwischen einem bis fünf Fällen auf 100 000 Einwohnern pro Jahr. Die Krankheitshäufigkeit ist in Australien, USA, Italien, Schweiz und Irland besonders hoch (Redaelli et al., 2004). Auffällig ist, dass Männer ungefähr doppelt so häufig wie Frauen an CLL erkranken (Cartwright et al., 2002).

Diagnostiziert wird CLL meist bei Patienten höheren Lebensalters. Der Median liegt bei 65 Jahren (Shaffer et al., 2002). Aufgrund von Immunodefizienz sind Infektionen die häufigste Todesursache für CLL-Patienten (Hamblin and Hamblin, 2008). Therapieoptionen für CLL-Patienten sind Behandlungen mit Chemotherapeutika. Eine Heilung ist bis heute nicht möglich (Ghia et al., 2007).

1.1.1 Krankheitsverlauf der CLL

CLL ist charakterisiert durch die langsame Akkumulation CD5-positiver B-Zellen (Rozman and Montserrat, 1995). Da die Erkrankung häufig jahrelang symptomlos verläuft, wird in vielen Fällen die Diagnose nach einer routinemäßigen Blutuntersuchung gestellt.

Aus heutiger Sicht ist CLL eine relativ heterogene Krankheit. Auf der Basis molekularer Marker, z.B. des Mutationsstatus der Immunglobulin schweren Ketten-Gene (IgVH), oder der Expression von ZAP70 (*Zeta-Chain-Associated Protein Kinase 70*), kann zwischen einer indolenten und einer aggressiven Verlaufsform unterschieden werden (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999; Kim et al., 2004).

Die Expression der prognostischen Marker korreliert stark mit der Lebenserwartung der Patienten. Patienten einer aggressiven Verlaufsform haben eine mediane Lebenserwartung von 95 Monaten, bei Patienten der indolenten Verlaufsform liegt sie bei 293 Monaten (Hamblin et al., 1999). Ob die CLL-Zellen beider Prognostischen Gruppen denselben zellulären Ursprung haben, wird diskutiert. Möglicherweise stellt CLL nicht eine, sondern zwei verschiedene Krankheiten mit ähnlichem Phänotyp dar.

1.1.2 Mögliche Vorläufer von CLL-Zellen

Zurzeit ist unklar, aus welchen B-Zellen CLL-Zellen hervorgehen (Ghiotto et al., 2004; Martin and Kearney, 2001). Es kommen mehrere Subtypen von B-Zellen in Frage, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Am stärksten ähneln CLL-Zellen in ihrem Oberflächen-Phänotyp und ihrer Genexpression Antigen-erfahrenen Gedächtnis B-Zellen (Damle et al., 2002; Damle et al., 1999; Klein et al., 2001). CLL-Zellen mit unmutierter IgVH könnten sich auch aus marginalen B-Zellen entwickelt haben, bei denen keine somatische Hypermutation stattfinden muss (Chiorazzi et al., 2005; Ghiotto et al., 2004). Möglicherweise liegt der Ursprung von CLL-Zellen in B1a-Zellen (Martin and Kearney, 2001). Im Gegensatz zu B2-Zellen exprimieren B1a-Zellen analog zu CLL-Zellen CD5. Ihre Aufgabe besteht in der Abwehr von bakteriellen Infektionen. Im Gegensatz zu B2-Zellen befinden sich diese Zellen hauptsächlich im Peritoneum.

1.1.3 Überleben der CLL-Zelle

Das Überleben der CLL-Zellen *in vivo* ist durch eine langsame Proliferation und eine geringe Apoptoserate charakterisiert (Chiorazzi, 2007). Eine wichtige Rolle für das Überleben von CLL-Zellen spielt das Mikromilieu, da primäre CLL-Zellen *ex vivo* unter Zellkulturbedingungen innerhalb weniger Tage in Apoptose gehen (Ghia et al., 2008). Die Interaktion mit anderen Zellen oder Kofaktoren ist also zumindest teilweise für die fehlende Apoptoseinduktion in CLL-Zellen verantwortlich. Die extrazellulären Stimuli und die dazugehörigen Signalkaskaden zu identifizieren und zu verstehen, die das Überleben der CLL-Zellen ermöglichen, ist ein wichtiger Schritt, um neue Therapieoptionen für CLL zu finden.

Für viele Transmembranrezeptoren ist die Teilnahme an der Entwicklung und dem Überleben der CLL-Zelle nicht geklärt. In dieser Arbeit wird die Beteiligung des Transmembranrezeptors CD5, der in CLL-Zellen überexprimiert wird, an der Pathogenese der CLL näher untersucht. Ein anderer Schwerpunkt beschäftigt sich mit den Auswirkungen veränderter MicroRNA (miRNA)-Expressionen auf die Expression des Proto-Onkogens PLAG1 in CLL (Abschnitt 1.3). Um die Bedeutung von CD5 in der CLL-Zelle besser verstehen zu können, wird im Folgenden das molekulare Umfeld von CD5 näher beschrieben.

1.2 CD5 und sein molekulares Umfeld

In diesem Abschnitt wird der Rezeptor CD5 näher beschrieben, sowie sein molekulares Umfeld. Dazu gehören der B-Zell-Rezeptor (BZR), Src-Kinasen, Syk-Kinasen und die Phosphatase SHP1 (Abbildung 1.1).

1.2.1 Der Transmembranrezeptor CD5

CD5 ist ein 68 kDa großer Transmembranrezeptor, der auf T-Zellen, B1a-Zellen und auf CLL-Zellen exprimiert wird. Die extrazelluläre Domäne von CD5 besitzt drei cysteinreiche Domänen, und gehört daher zu der SRCR-Familie (*Scavenger-Receptor-Cysteine-Rich Family*, siehe Lozano et al., 2000). In dieser Familie sind CD5 und CD6 die am stärksten verwandten Proteine. Es wird davon ausgegangen, dass ihr Ursprung in einem gemeinsamen Gen liegt (Lecomte et al., 1996).

Aufbau der cytoplasmatischen Domäne von CD5

Die cytoplasmatische Domäne von CD5 besitzt, analog zum BZR, keine Enzymaktivität. Eine Weiterleitung extrazellulärer Stimulation ist folglich auf die Rekrutierung von Kinasen und Phosphatasen angewiesen. In der Aminosäure-Sequenz von CD5 können vier Tyrosin-, sowie vier Threonin- und elf Serin- Phosphorylierungsmotive identifiziert werden (Abbildung 1.2).

Die Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste von CD5 lassen sich in T-Zellen nachweisen (Griffith et al., 1989). Eine Verstärkung der Phosphorylierung wird nach T-Zell Stimulation oder Behandlung mit Anti-CD5 Antikörpern detektiert (Alberola-Ila et al., 1993; Lozano et al., 1990). Hierbei sind Isoformen der Protein Kinase C (PKC) und CAM-Kinase II beteiligt (Calvo et al., 1998; Lozano et al., 2000).

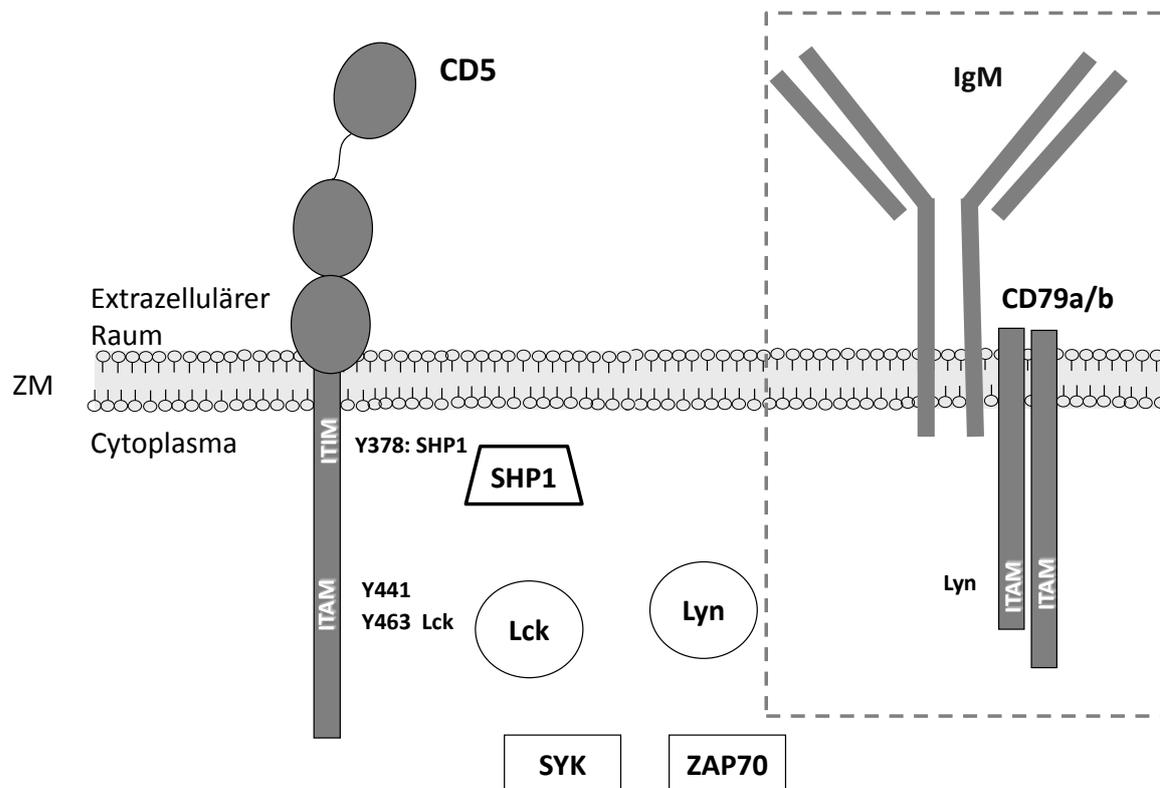


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der molekularen Umgebung von CD5. CD5 (links) besitzt drei extrazelluläre cysteinreiche Domänen. Die cytoplasmatische Domäne besitzt mehrere Tyrosine. An ein ITIM-Motiv kann SHP1 (Raute) binden. An ein ITAM-Motiv konnte eine Rekrutierung von Src-Kinasen nachgewiesen werden (Kreis). Zu den relevanten Src-Kinasen gehören hier Lck und Lyn. Der B-Zell-Rezeptor (gestrichelte Box), bestehend aus IgM, CD79a und CD79b besitzt ebenfalls ein ITAM-Motiv. Hier können Src-Kinasen und im zweiten Schritt Syk-Kinasen (Rechteck) rekrutiert werden. Zu den Syk-Kinasen gehören die Proteine Syk und ZAP70. ZM: Zellmembran; Y: Tyrosinreste; Zahlen: Aminosäureposition.

Die Tyrosine 429 und 441 befinden sich in einem ITAM-Motiv (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motife*) ähnlichen Umfeld. Ein ITAM-Motiv ist definiert durch zwei YXXL Motive, die durch acht bis zwölf Aminosäuren getrennt sind. Nach einer Phosphorylierung, z.B. durch Src-Kinasen, können an diese Motive Kinasen binden, die eine SH2-Domäne besitzen. Analog zum BZR und T-Zell Rezeptor (TZR) könnte es durch Bindungen von Syk-Kinasen zu einer Weiterleitung von Signalen kommen (Monroe, 2006).

In T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Lck Tyrosinreste von CD5 phosphoryliert kann (Burgess et al., 1992; Dennehy et al., 2001; Raab et al., 1994). Durch Mutationen der betreffenden Tyrosine konnte gezeigt werden, dass Lck hauptsächlich Y441, jedoch auch Y463, phosphorylieren kann (Dennehy et al., 2001).

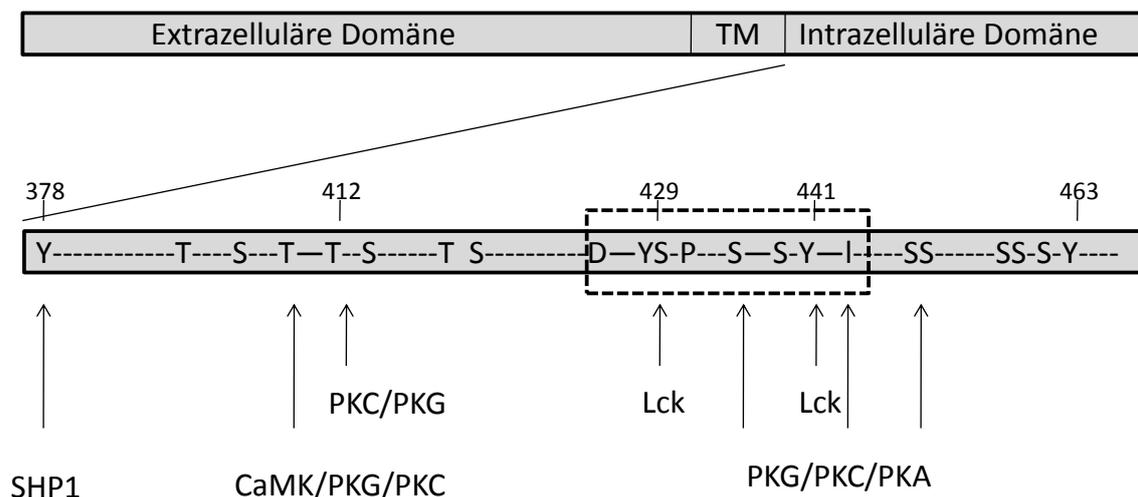


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von CD5 und den möglichen Phosphorylierungsmotiven. Das Protein CD5 ist mit extrazellulärer Domäne, Transmembran-Domäne (TM) und der cytoplasmatischen Domäne abgebildet. Im unterem Balken ist die cytoplasmatische Domäne vergrößert dargestellt. Potentiell phosphorylierbare Aminosäurereste (T: Threonin; S: Serin; Y: Tyrosin) sind eingezeichnet. Mit Pfeilen werden Kinasen/Phosphatasen, die die Aminosäuren phosphorylieren, aufgelistet. PKC: Protein Kinase C, PKG: Protein Kinase G, CaMK: Calcium-abhängige Protein Kinase, PKA: Protein Kinase A, Lck: *Lymphocyte-Specific Protein-Tyrosine Kinase*, SHP1: Protein-Tyrosin Phosphatase1c. Zahlen geben die jeweilige Aminosäureposition an. Das ITAM-Motiv ist in der gestrichelten Box besonders hervorgehoben. Modifiziert nach Lozano (Lozano et al., 2000).

Tyrosin 378 befindet sich in einem ITIM-Motiv (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motife*). ITIM-Motive sind definiert durch die Aminosäuresequenz AENTITYSLKHP (Unkeless and Jin, 1997). An ITIM-Motive können SH2-Domäne enthaltende Tyrosin-Phosphatasen rekrutiert werden. Für das ITIM-Motiv von CD5 lässt sich eine Bindung der Phosphatase SHP1 nachweisen (Perez-Villar et al., 1999; Sen et al., 1999). Durch deren Rekrutierung kann eine Weiterleitung der Rezeptor-Stimulierung durch Kinasen unterbunden werden (Sen et al., 1999; Unkeless and Jin, 1997).

Liganden von CD

Als Liganden von CD5 werden CD72, gp40-80 und gp150 diskutiert (Biancone et al., 1996; Bikah et al., 1998; Calvo et al., 1999; Calvo et al., 1998; Van de Velde and Thielemans, 1996). Keiner dieser Liganden konnte in weiteren Publikationen bestätigt werden. Möglicherweise wird die Suche nach einem Liganden durch eine nicht stetige Expression erschwert. So konnte der Ligand gp40-80 nur auf Splenozyten gefunden werden, die mit CD3/CD28 aktiviert waren (Biancone et al., 1996).

1.2.2 Der B-Zell Rezeptor (BZR) und dessen Aktivierung

Der B-Zell Rezeptor (BZR) besteht aus einem Molekül IgM, das aus zwei leichten und zwei schweren Immunoglobulin-Ketten zusammengesetzt ist. Ergänzt wird der BZR durch das weitgehend intrazelluläre Heterodimer CD79a und CD79b (Monroe, 2006; Niiro and Clark, 2002; Papavasiliou et al., 1995; Teh and Neuberger, 1997). An den BZR können Fremdantigene binden, was zu dessen Aktivierung führt.

CD79a und CD79b besitzen wie CD5 ITAM-Motive. Nach einer Stimulierung des BZR kommt es zu einer Phosphorylierung seiner ITAM-Motive durch die Src-Kinase Lyn (Niiro and Clark, 2002). An diese kann anschließend die Tyrosinkinase Syk mit der SH2-Domäne binden. Die Phosphorylierung der ITAM-Motive kann zusätzlich durch Koregulatoren wie CD19, CD22 oder CD5 weiter beeinflusst werden (Niiro and Clark, 2002; Sen et al., 1999; Tedder et al., 1997).

Nach einer BZR-Aktivierung werden über die Proteine RAS, PKC und NF κ B Signalwege induziert, die die Gen-Expression der B-Zelle verändern. Gleichzeitig lässt sich ein Calcium-Influx im Cytoplasma nachweisen (Niiro and Clark, 2002).

Im Gegensatz zu reifen B-Zellen exprimieren CLL-Zellen nur wenig IgM und CD79b (Payelle-Brogard et al., 2002; Zomas et al., 1996). Stimulierungen des BZR in CLL-Zellen zeigen, dass viele CLL-Zellen nur unzureichend auf eine Stimulation reagieren (Bernal et al., 2001; Lankester et al., 1995; Nedellec et al., 2005). In vielen Fällen kann auch Apoptose oder ein verstärktes Überleben der CLL-Zelle induziert werden (Deglesne et al., 2006; Zupo et al., 2000). Dabei scheint die Art der Stimulation einen großen Einfluss auf die Antwort der CLL-Zelle zu haben (Deglesne et al., 2006; Petlickovski et al., 2005). Auffällig ist auch, dass CLL-Zellen, die die Marker für die aggressive Verlaufsform tragen, besser auf BZR-Stimulation reagieren (Nedellec et al., 2005).

1.2.3 Src-Kinasen

Src-Kinasen sind neben der Weiterleitung der BZR- und CD5-Stimulierung auch an der Signalweiterleitung vieler anderer Membranrezeptoren involviert. Src-Kinasen sind an Prozessen des Zellwachstums, der Differenzierung aber auch des Überlebens und der Migration beteiligt. Auf diese Weise spielen sie eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von Stimuli aus dem externen Milieu der Zelle (Abram and Courtneidge, 2000; Ingley, 2008; Kefalas et al., 1995).

Src-Kinasen gehören zu den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Familie der Src-Kinasen besteht aus neun Mitgliedern (Abram and Courtneidge, 2000; Ingley, 2008; Kefalas et al., 1995). Während die Src-Kinasen Src, Fyn, Yes und Yrk ubiquitär exprimiert werden, sind die Src-Kinasen Lyn, Fgr und Blk typischerweise stark in B-Zellen vorzufinden. Lck wird in T-Zellen, NK-Zellen und im Gehirn synthetisiert (Abram and Courtneidge, 2000; Ingley, 2008; Kefalas et al., 1995; Thomas and Brugge, 1997).

Src-Kinasen haben eine Größe von 52-62 kDa und bestehen aus sechs Untereinheiten (Abram and Courtneidge, 2000; Ingley, 2008; Kefalas et al., 1995; Thomas and Brugge, 1997). Jede Src-Kinase besitzt eine spezifische Unique-Region, die für Protein-Protein Interaktionen relevant zu sein scheint. Weitere Domänen sind die SH2-Domäne, die spezifisch an phosphorylierte Tyrosinmotive bindet, und eine SH3-Domäne, die an Prolin-reiche Sequenzen bindet und damit Protein-Protein Wechselwirkungen fördert. In der SH4-Domäne befindet sich eine N-Terminale Myristilierungs-Domäne, welche an die Membran bindet. Daher sind Src-Kinasen an der Zellmembran lokalisiert.

Die SH1-Domäne beinhaltet das katalytische Zentrum der Kinase. Hier befindet sich auch Tyrosin 416. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle sorgt für eine optimale Struktur der Substrat-Binde-Domäne und ist wichtig für die Aktivität des katalytischen Zentrums (Xu et al., 1999). Am C-terminalen Ende befindet sich eine zweite Tyrosin-Phosphorylierungsstelle. Eine Phosphorylierung dieses Tyrosins führt zu einer Bindung mit der SH2-Domäne. Vermutet wird, dass hierdurch die Kinase in einer geschlossenen, inaktiven Form verbleibt (Brown and Cooper, 1996).

Src-Kinasen in CLL-Zellen

Lyn ist CLL-Zellen in wesentlich stärker exprimiert als in gesunden B-Zellen (Contri et al., 2005; Majolini et al., 1998). Außerdem ist diese Kinase in CLL-Zellen zu einem größeren Anteil im Cytoplasma lokalisiert. Die Kinase spielt eine wesentliche Rolle bei der Signaltransduktion des BZR. Lck, welche üblicherweise in T-Zellen exprimiert wird, wird in CLL-Zellen ebenfalls stärker exprimiert als in gesunden B-Zellen (Majolini et al., 1998). Da Tyrosin-Motive in der cytoplasmatischen Domäne von CD5 bekannte Substrate für Lck sind, ist auch in CLL-Zellen eine Wechselwirkung von CD5 und Lck wahrscheinlich (Dennehy et al., 2001; Raab et al., 1994).

1.2.4 Syk-Kinasen

Zu den Syk-Kinasen gehören die Proteine *Spleen Tyrosine Kinase* (Syk) und *Zeta-Chain-Associated Protein Kinase 70* (ZAP70). Sie haben eine Größe von ungefähr 70 kDa. Die Kinase Syk wird hauptsächlich in B-Zellen exprimiert, in T-Zellen wird eher ZAP70 exprimiert (Mustelin et al., 2003; Turner et al., 2000). Für B-Zellen untypisch wird ZAP70 auch teilweise stark in CLL-Zellen exprimiert (Chen et al., 2002).

Die Hauptrolle dieser Moleküle ist die Signalweiterleitung von extrazellulären Stimuli, beispielsweise einer BZR-Stimulierung. Durch das Vorhandensein von SH2-Domänen können sie an phosphorylierte ITAM-Motive binden und weitere Proteine phosphorylieren (Niuro and Clark, 2002). In Syk-negativen B-Zelllinien kann nur eine schwache, verzögerte Calcium-Mobilisation nach Stimulierung des BZR nachgewiesen werden (Jiang et al., 1998; Takata et al., 1994).

1.2.5 SHP1

Die Tyrosin-Phosphatase *Src homology region 2-domain-phosphatase* (SHP1) kann an SH2-Domänen binden. Bei CD5 liegt SHP1 durch Rekrutierung an das ITIM-Motiv in räumlicher Nähe zum ITAM-Motiv (Unkeless and Jin, 1997). Eine Signalweiterleitung an ITAM-Motive durch Src-Kinasen kann durch SHP1 gestört werden (Gary-Gouy et al., 2000).

1.2.6 Experimentelle Aktivierung von CD5-induzierten Signalkaskaden

Da keine Liganden zur Stimulierung von CD5 erhältlich sind, werden experimentelle Stimulierungen von CD5, analog zu Stimulierungen des BZR und TZR, mit Antikörpern durchgeführt (Pers et al., 1998; Renaudineau et al., 2005).

In früheren *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass eine Stimulierung von CD5 durch monoklonale Antikörper in T-Zellen zu einem verstärktem Calcium-Influx und erhöhter IL-2 Produktion führt. Zusammen mit einer TZR-Stimulation konnte eine verstärkte Proliferation beobachtet werden (Ceuppens and Baroja, 1986; June et al., 1987; Spertini et al., 1991). In B1a-Zellen kann eine alleinige Stimulierung von CD5 durch Anti-CD5 Antikörper Signalkaskaden auslösen. Hier zeigte sich eine verstärkte Apoptose-Induktion (Pers et al., 1998).

Stimulierungen in CLL-Zellen

Stimulierung von CD5 auf CLL-Zellen führt bei vielen Patientenproben zu einem erhöhten Anteil apoptotischer Zellen (Cioca and Kitano, 2002; Pers et al., 2002; Renaudineau et al., 2005). Eine verstärkte Apoptoserate wurde in solchen CLL-Zellen gefunden, die die Marker für den aggressiven Verlauf dieser Krankheit exprimieren.

Einen möglichen Hinweis auf eine konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion nach CD5-Stimulation gibt eine neuere Publikation. Hier wird nach einer CD5-Stimulation bei niedrigen Konzentrationen in den meisten CLL-Zellen eine Förderung des Überlebens erzielt, erst bei höheren Antikörperkonzentrationen gehen die CLL-Zellen in Apoptose (Perez-Chacon et al., 2007b).

1.2.7 Chimäre Rezeptoren als Modelle für eine ligandeninduzierte CD5-Stimulation

Da primäre CLL-Zellen einer Variabilität durch den Binet-Status, den prognostischen Verlauf und der Lebensweise des Patienten selber unterworfen sind, unterliegen die Experimente mit primären Zellen einer hohen Variabilität. Erschwert wird die Arbeit an primären CLL-Zellen *in vitro* dadurch, dass die Zellen schnell in Apoptose gehen. Um die Beteiligung von CD5 an der Pathogenese der CLL untersuchen zu können, ist es daher günstiger langlebige B-Zelllinien als Modellsystem zu verwenden.

Ein Zelllinienmodell für die CD5-Stimulation in CLL existiert noch nicht, da alle verfügbaren CLL-Zelllinien CD5-negativ sind. Daher wäre es ideal, den CD5-Rezeptor in CLL-Zelllinien einzubringen und dann zu stimulieren. Ein Ansatz, Rezeptoren zu stimulieren, von denen keine Liganden bekannt sind, ist das Benutzen von chimären Rezeptoren. Als extrazelluläre Domäne wird hierbei ein Rezeptor mit bekannten Liganden gewählt. Als cytoplasmatische Domäne wird die Domäne des zu untersuchenden Rezeptors verwendet. Durch Zugabe des passenden Liganden können Aktivierungen der cytoplasmatischen Domäne erzielt werden (Lehvaslaiho et al., 1989; Pandiella et al., 1989; Piccinini et al., 2002; Riedel et al., 1989; Riedel et al., 1986).

Für die Erforschung CD5-induzierter Signalkaskaden wurden bereits chimäre Rezeptoren entwickelt. Ein chimärer Rezeptor, der extrazellulär aus FC γ -Rezeptor besteht, konnte durch Antikörper nur zusammen mit dem BZR in einer Maus B-Zelllinie stimuliert werden (Gary-Gouy et al., 2000). Eine Chimäre aus CD5 und CD6 wurde in einer T-Zelllinie

exprimiert. Dieser Rezeptor wurde, vielleicht wegen einer schlechten Handhabung des CD6-Ligandes, nur mit Antikörpern aktiviert (Perez-Villar et al., 1999). Ein chimärer Rezeptor, der in B-Zellen mit einem Liganden aktiviert werden kann, ist aus der vorliegenden Literatur nicht bekannt.

Eigene Erfahrungen in der Verwendung von chimären Rezeptoren wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Krause schon gewonnen (Hausherr et al., 2007; Schaeffer et al., 2001). In diesem Fall wurde ein chimärer Rezeptor für die Erforschung der Signaltransduktion des IL-6 Rezeptors (IL6R) entwickelt. Ebenfalls konnte die Aktivierung eines chimären CD5-EGFR Rezeptors in einer T-Zelllinie nachgewiesen werden (Aditya Veldurthy, persönliche Mitteilung).

1.3 Beteiligung veränderter microRNA-Expression an einer veränderten Proteinexpression in der CLL

In den nächsten Abschnitten wird auf die Bedeutung von miRNA, ihrer Prozessierung und Regulierung von mRNA eingegangen (Abschnitte 1.3.1 bis 1.3.3). Eine wichtige Bedeutung hat die Expression von miRNA in der Entwicklung von Tumorerkrankungen eingenommen. Auf diesen Aspekt und ihrer Bedeutung in CLL wird in Abschnitt 1.3.4 näher eingegangen. In diesem Zusammenhang wird auch das Proto-Onkogen PLAG1, dessen mRNA-Stabilität potentiell durch miRNA reguliert werden könnte, näher charakterisiert (Abschnitt 1.3.5).

1.3.1 RNA-Interferenz (RNAi) und microRNA (miRNA)

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der mRNA-Stabilität und Proteinexpression in der Zelle. Durch Bindung von komplementärer RNA an mRNA kommt es zum Abbau, sowie einer veränderten Translation der mRNA. Erstmals wurde RNAi in *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Inzwischen ist bekannt, dass auch in Pflanzen und Pilzen Regulationsmechanismen durch RNAi gesteuert werden (Rana, 2007). Unterschieden wird zwischen zwei Untergruppen von RNAi auslösender RNA: small interfering RNA (siRNA) und microRNAs (miRNA).

Während siRNAs komplett komplementär zu ihrer Target mRNA sind, stimmen bei miRNA oft nur wenige Basenpaare überein. SiRNAs werden von Transposons transkribiert

oder entstehen durch Abbau viraler RNA (Bi et al., 2009; Rana, 2007). Dagegen sind miRNAs endogene RNAs, die von Genen kodiert werden.

Es wird geschätzt, dass ca. 700 miRNAs im menschlichen Genom kodiert sind. Diese Anzahl scheint im Vergleich zu den proteinkodierenden Genen (ca. 22 000) relativ gering. Es muss jedoch beachtet werden, dass eine miRNA schätzungsweise die Transkription von hunderten Genen beeinflussen kann (Deng et al., 2008; Rana, 2007; Selbach et al., 2008).

1.3.2 Prozessierung von microRNA

MiRNAs sind kleine, ungefähr 22 Nukleotide lange, nicht-kodierende, doppelsträngige RNA-Moleküle. Menschliche miRNAs sind in Introns von Protein-kodierenden Genen und Introns und Exons von nicht kodierenden Genen kodiert (Bi et al., 2009; Rana, 2007; Rodriguez et al., 2004). Außerdem befindet sich ein Teil der miRNA-kodierenden Loci in intergenen Bereichen (Lin et al., 2006). Die Regulationsmechanismen für die Transkription dieser Gene sind noch unklar. Um funktionale miRNAs zu erhalten muss primäre miRNA (pri-miRNAs) mehrfach prozessiert werden (Abbildung 1.3).

Pri-miRNAs werden von RNA Polymerase II oder Polymerase III transkribiert (Borchert et al., 2006; Cai et al., 2004). Sie werden von dem Komplex Drosha-DGCR8 erkannt und

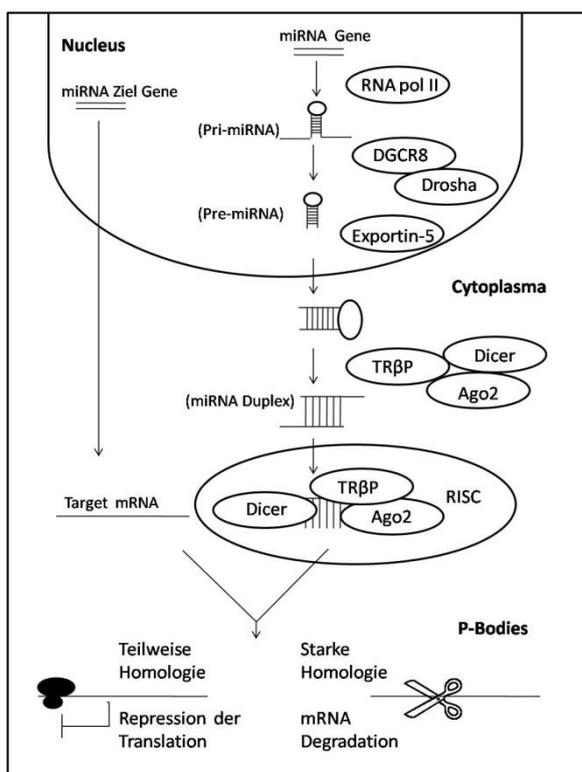


Abbildung 1.3: Biogenese und Funktion von miRNA. Im Nucleus wird das miRNA-Gen von einer RNA-Polymerase abgelesen. Danach wird die pri-RNA durch die Enzyme DGCR8 und Drosha prozessiert. Durch Exportin-5 wird die Pre-miRNA in das Cytoplasma geschleust und durch Dicer zur reifen miRNA prozessiert. Dort bindet sie an einen Multienzymkomplex RISC und wird zu einem RNA-Einzelstrang abgebaut. Eine Bindung an mRNA ist nun möglich. In P-Bodies kommt es abhängig von der Homologie zwischen miRNA-Bindedomäne und miRNA zu einer mRNA Degradation oder zu einer Repression der Translation. Abbildung modifiziert nach Bi et. al.(2009).

in ein 70-Nukleotid großes Molekül gespalten, welches eine typische Haarnadelstruktur enthält (Bi et al., 2009). Die so entstandene Pre-miRNA wird mittels des RanGTP-abhängigen ds-RNA-Binde-Proteins Exportin-5 in das Cytoplasma geschleust (Bohnsack et al., 2004). Dort wird es durch das RNase III Enzym Dicer zu einem 22-Nukleotid großen, doppelsträngigen RNA-Molekül geschnitten (Ketting et al., 2001). Ein Strang des Doppelstranges wird in einen großen Enzymkomplex, dem RNA-induced silencing complex (RISC), inkorporiert, während der zweite Strang abgebaut wird. RISC besteht aus den Enzymen Dicer, TRBP (dsRNA-Binde-Protein) und Argonaute Protein 2 (Ebenfalls ein RNA-bindendes Protein).

Die reife miRNA, gebunden im RISC-Komplex, kann nun an komplementäre mRNA Sequenzen binden.

1.3.3 Regulationsmechanismen durch microRNA

Die Bindung reifer miRNA im RISC-Komplex an mRNA führt zu einer veränderten mRNA-Stabilität oder Translationsrate. Meistens bindet die miRNA an die 3'UTR (*3'untranslated Region*) der mRNA (Bi et al., 2009). In seltenen Fällen konnte auch eine Bindung an die 5'UTR nachgewiesen werden (Jopling, 2008; Orom et al., 2008). Meistens führt die mRNA-Bindung zu einer verminderten Translationsrate (Bartel, 2004; Engels and Hutvagner, 2006). Eine Verstärkung der Translationsrate nach mRNA-Bindung konnte bis jetzt nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden (Orom et al., 2008; Vasudevan et al., 2007).

Unterschiedliche Mechanismen können, abhängig von der Komplementarität zur mRNA, zu einer verminderten Translation führen. Während eine Degradierung der mRNA bei einer starken Komplementarität zwischen den beiden RNAs vorkommt, wird eine verminderte Translation bei weniger komplementären RNA-Strängen beobachtet (Bartel, 2004). Die RNA-Sequenz zwischen dem 2-7 Nukleotid bzw. 2-8 Nukleotid der miRNA sind für einen Regulationsmechanismus besonders wichtig. Diese Sequenz wird als Seed bezeichnet (Lewis et al., 2005; Rana, 2007). Jedoch können Wobble-Basen Paarungen in der Seed-Sequenz toleriert werden, bzw. eine nicht perfekt passende Seed-Sequenz durch weitere komplementäre Basen zwischen miRNA und mRNA ausgeglichen werden (Brennecke et al., 2005; Miranda et al., 2006; Vella et al., 2004).

Im Cytoplasma sind im Normalfall die mRNAs mit den gebundenen RISC-Proteinen in P-Bodies lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich in P-Bodies Enzyme befinden, die den RNA-Abbau beschleunigen (Rana, 2007).

1.3.4 Bedeutung der microRNA-Regulation in neoplastischen Erkrankungen

Für die Entstehung von malignen Transformationen neoplastischer Erkrankungen sind mehrere Veränderungen im Genom notwendig. Viele Untersuchungen der Tumorentstehung beschäftigen sich mit den Veränderungen der Protein-kodierenden Genbereiche. Es zeigt sich aber, dass auch die Veränderungen der nicht Protein-kodierenden Genbereiche einen Beitrag zur Krebsentstehung leisten können (Deng et al., 2008; Imyanitov, 2009). So ist die globale Expression von miRNA in vielen Tumorarten verändert (Calin and Croce, 2006; Lu et al., 2005).

Einige miRNAs werden bereits als Onkogene bezeichnet (Papagiannakopoulos et al., 2008). Beispielsweise wurde in vielen Tumorarten eine Hochregulation von miRNA-21 (miR-21) gefunden. In Glioblastoma-Zelllinien zeigte sich, dass miR-21 ein Netzwerk von Tumorsuppressorgenen wie p53 beeinflusst. Eine verringerte Expression der miRNA führt zu einer verstärkten Apoptoserate, verminderter Proliferation und Zell-Zyklus-Arrest (Papagiannakopoulos et al., 2008).

Ebenso wurde für miRNAs eine Rolle als Tumorsuppressorgene gefunden (Calin et al., 2002; Mayr et al., 2007; Shi et al., 2008). Bei vielen Tumoren wird die 3'UTR von dem Gen, welches das Protein High Mobility Group A2 (Hmga2) kodiert, durch eine Translokation getrennt. Hierdurch kommt es zu einer Überexpression von Hmga2. In gesundem Gewebe wird die Translation durch die miR-let-7, die an den 3'UTR bindet, reduziert (Mayr et al., 2007).

MiRNA-Expression in CLL-Zellen

In CLL-Zellen von 50% aller CLL-Patienten wird eine Translokation des 13q14.3 Chromosomenabschnittes gefunden (Dohner et al., 2000). Es konnte jedoch kein Protein-kodierendes Gen in diesem Chromosomenabschnitt identifiziert werden. 2002 wurde entdeckt, dass sich die Gene für miR-16-1 und miR-15a in diesem Abschnitt befinden. Durch die Translokation ergibt sich eine Herabregulation dieser miRNAs in CLL-Patientenzellen (Calin et al., 2002). Eine Target-Sequenz dieser miRNAs ist die 3'UTR des

anti-apoptotischen Proteins BCL2 (Calin et al., 2008). Durch eine geringere Expression der miRNA kann es zu einer Überexpression von BCL2 kommen, wodurch die Apoptoseinduktion verhindert werden kann (Calin et al., 2008; Calin et al., 2002; Nicoloso et al., 2007).

Weitere miRNAs, die in der Pathogenese von CLL eine Relevanz haben, sind die miRNAs miR-181 und miR-29. Diese können die Expression des Proteins TCL1, das in CLL überexprimiert ist, beeinflussen (Herling et al., 2006; Pekarsky et al., 2006).

Möglicherweise lässt sich anhand verschiedener miRNA-Expressionslevel nicht nur eine CLL-Zelle von gesunden Zellen unterscheiden, sondern diese spiegeln sogar verschiedene Verlaufsformen und den Krankheitsprogress wieder. Die Grundlage für die Erforschung von miRNA an sich und in der CLL verbessert sich zunehmend durch neue Array-Technologien und geben damit Potential, die Gründe für das Entstehen von CLL und auch dessen Heilung auf einer neuen Ebene zu betrachten.

Ein miRNA-Array wurde auch in den Arbeitsgruppen AG Wendtner und AG Schultze der medizinischen Klinik I der Uniklinik Köln durchgeführt. Es konnte eine veränderte miRNA-Expression im Vergleich zu aus Blut gesunder Probanden isolierten B-Zellen ermittelt werden. Durch eine weitere Auswertung der Ergebnisse wurden Gene bestimmt, deren 3'UTR-Sequenzen der mRNA durch miRNA reguliert werden könnten. Durch eine veränderte Expression von miRNA in CLL-Zellen besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine veränderte Expression auf Proteinebene. Ein potentielles Protein, dessen Expression in der CLL durch eine veränderte miRNA-Expression beeinflusst wird, stellt das Proto-Onkogen PLAG1 dar.

1.3.5 Das Proto-Onkogen PLAG1

PLAG1 (Pleomorphic Adenoma Gene 1) ist ein 56kDa, oder nach alternativem Spleißen 47kDA großer Transkriptionsfaktor (Kas et al., 1997). Die Ausbildung von sieben Zink-Finger Domänen dient zur Bindung an DNA. Am C-Terminus von PLAG1 befindet sich eine transkriptionsaktivierende Domäne (Kas et al., 1998). PLAG1 kann posttranslational durch Sumoylierung, Phosphorylierung von Serin- oder Threonin-Aminosäureresten und Acetylierung modifiziert werden (Van Dyck et al., 2007).

Das Gen für PLAG1 besteht aus 5 Exons (Queimado et al., 1999). Interessanterweise befinden sich am 3'UTR der mRNA mehrere potentielle Bindestellen für verschiedene

miRNAs. Eine Funktion einiger miRNA-Bindestellen wurde vor kurzem nachgewiesen (Zhang et al., 2009).

Eines der von PLAG1 regulierten Zielgene ist das Gen des Insulin-like growth factor II (IGF-II) Proteins (Voz et al., 2000). Es ist bekannt, dass IGFII durch autokrine und parakrine Mechanismen die Zell-Proliferation fördern kann (Van Dyck et al., 2007). Somit kann es eine Rolle in der Tumorentstehung spielen.

PLAG1 wurde zuerst in Tumoren der Speicheldrüse entdeckt. In 25% der Fälle werden durch Translokationen in diesen Tumoren die Gene für PLAG1 und β -Catenin fusioniert (Kas et al., 1997). Durch den dauerhaft aktiven Promotor des β -Catenin Gens kommt es zu einer Hochregulation dieses Proteins. Eine Deregulation der PLAG1-Expression wurde auch in Lipoblastomen, Hepatoblastomen, und Akuter Myeloischer Leukämie (AML) gefunden (Van Dyck et al., 2007). Auch Experimente an Fibroblasten zeigten ein onkogenes Potential von PLAG1. Durch Transfektion von PLAG1 verlieren die Fibroblasten den Zell-Zell Kontakt, wachsen auch ohne Haftung, zeigen eine geringere Abhängigkeit von Serum Zusatzstoffen und können Tumoren in Mäusen mit defektem Immunsystem (Nude-Mäuse) induzieren (Hensen et al., 2002). In Cre-abhängigen PLAG1-Mäusen konnten sich nach Hochregulation der PLAG1-Expression in der Speicheldrüse sowie Brustdrüse Tumoren entwickeln (Declercq et al., 2005). Ein Zusammenhang mit CLL wurde noch nicht hergestellt.

1.4 Fragestellung

Der Expressionsstatus von Proteinen und RNA unterscheidet CLL-Zellen von ihren möglichen Vorläuferzellen (Caligaris-Cappio and Ghia, 2008; Su et al., 2009). Die Auswirkungen veränderter Protein- und RNA-Expression in CLL-Zellen und ihre möglichen Ursachen zu verstehen, hilft die Biologie der Tumorzelle zu begreifen, und neue Therapieansätze zu finden.

In dieser Arbeit wird die Beteiligung der Expression von CD5 und seiner Stimulation näher charakterisiert. Ebenfalls werden die Auswirkungen der global veränderten miRNA-Expression in CLL auf die Proteinexpression des Proto-Onkogens PLAG1 betrachtet.

Bis heute sind CD5-Stimulation für die Erforschung der Signaltransduktion in CLL nur in primären CLL-Zellen durchgeführt worden. Experimente mit primären Zellen unterliegen aufgrund von Binet-Status und Prognostischer Gruppe einer hohen Variabilität. Eine

Stimulierung von CD5 mit einem natürlichen Liganden ist nicht möglich, da bis heute keine beschriebenen Liganden validiert wurden. Unter anderem konnte in der Arbeitsgruppe Krause gezeigt werden, dass chimäre Rezeptoren, die extrazelluläre Domänen von stimulierbaren Rezeptoren exprimieren, sich eignen, um eine Stimulierung weiterzuleiten (Hausherr et al., 2007; Schaeffer et al., 2001). Die Aktivierung eines chimären CD5-EGFR Rezeptors in einer T-Zelllinie war erfolgreich (Aditya Veldurthy, persönliche Mitteilung). Dieser chimäre Rezeptor wurde in Zelllinien, die sich aus CLL-Zellen entwickelt haben, exprimiert und stimuliert. Bei einer erfolgreichen Stimulation und Aktivierung der Signalkaskade sollte diese näher untersucht werden. Ebenfalls wurde betrachtet, ob sich die gewonnenen CD5-positiven Zelllinien von CD5-negativen Zelllinien unterscheiden.

In einem miRNA-Array wurde die Expressionsstärke von miRNA in CLL-Zellen mit der von gesunden B-Zellen verglichen. Hierbei wurden Hinweise für mehrere deregulierte miRNAs in B-Zellen CLL erkrankter Patienten gefunden. Untersucht wurde im diesem Zusammenhang die Regulation der Translation durch miRNA an der 3'UTR mRNA für den Transkriptionsfaktor PLAG1. Es sollte die mögliche Beteiligung des Proteins PLAG1, das durch mehrere miRNA-Bindestellen reguliert werden könnte, an der Pathogenese der CLL näher erfasst werden.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

2.1.1 Plastikware

Alle Waren, mit Ausnahme der in Tabelle 2.1 angegeben Waren wurden von Sarstedt bezogen.

Tabelle 2.1: Hersteller benutzter Plastikware, die nicht von Sarstedt bezogen wurden.

Plastikware	Hersteller
96-Well Platte für Luziferase Assays	Becton Dickinson
Combi-Tips	Eppendorf
Einfrierbox	NUNC
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson/Sarstedt
Kryotubes	NUNC

2.1.2 Reagenzien

Die Hersteller der benutzten Reagenzien für Assay und in der Zellkultur sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die Hersteller der benutzten Baukästen für das Durchführen von Assays sind in Tabelle 2.3, die benutzten Antikörper in Tabelle 2.4 aufgelistet. Eine Liste der Verwendeten Restriktionsenzyme befindet sich in Tabelle 2.5.

Tabelle 2.2: Hersteller benutzter Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Reagenzien	Hersteller
7-AAD	Becton Dickinson	Ficoll	Amersham
Agarose-A Beads	Roche	Hyperfilm-ECL	Amersham
Agarose-G Beads	Roche	IgM-Beads	Irvine Scientific
Blocking Solution (Nitrozellulose)	LiCOR	MACS CD19-beads	Millitnyl Biotec
B-Rosete Sep	Stemcell Technologies	Micro-RNA Duplex	Dharmacon
BS3	Pierce	Nitrozellulose Membran	Amersham
Cell Fix	Becton Dickinson	Opti-Mem	Invitrogen
Cell-Fix	Becton Dickinson	Penicillin-Streptomycin	Invitrogen
Cell-Wash	Becton Dickinson	PVDF	Millipore
CIAP	New England Biolabs	Rabbit-muscle Enolase	SIGMA
DMEM	Invitrogen	Re-Blot Solution (mild)	Chemicon
Duplex-miRNA	Dharmacon	RPMI 1640	Invitrogen
Dynalbeads (M450)	Invitrogen	SDS-Gel-Laufpuffer (10×)	SIGMA
EGF	BIOSOURCE	T4-DNA Ligase	New England Biolabs
Enolase	SIGMA	TCEP	Pierce
FACS-Clean	Becton Dickinson	Trizol	Invitrogen
FACS-Flow	Becton Dickinson	Trypsin	Invitrogen
FBS	PAN-Biotech	UV-etten	Eppendorf

Tabelle 2.3: Hersteller benutzter Baukästen

Baukasten	Hersteller
BCA-Protein- Assay	Pierce
XTT-Assay	Roche
cDNA Synthese Kit	Roche
Midi/Mini/Maxi Präparation	Qiagen
PCR-Aufreinigungs Kit	Qiagen
Gel-Aufreinigungs Kit	Qiagen
Dual-Glow Luziferase Assay	Promega
Apoptose Assay (7-AAD, Annexin-V FITC/PE)	Becton Dickinson
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Nukleofektion Solution V	Amaxa
Light-Cycler Kapillaren	Roche

Tabelle 2.4: Hersteller benutzter Antikörper

Antikörper gegen	Hersteller	Anwendung
Annexin-V	Becton Dickinson	FACS
BCL2 (610538)	Becton Dickinson	Western Blot
CD23 (Leu-20)	Becton Dickinson	FACS
CD5 (L17F12)	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot /Immunopräzipitation
CD5 (UCHT2)	Biolegend	Stimulierung
CD5-PE (UCHT2)	Becton Dickinson	FACS
CD83-PE (2218)	Immunotech	FACS
CD86-PE	Pharmingen	FACS
EGFR (LA22)	Upstate	Western Blot
EGFR-PE	Becton Dickinson	FACS
IgG1 Maus Kontrolle-PE	Becton Dickinson	FACS
IgG2a Maus Kontrolle	Biolegend	Immunopräzipitation
IgG2a Maus Kontrolle-FITC	Becton Dickinson	FACS
Lck (06-583)	Upstate	Western Blot/ Immunopräzipitation
Lck (3A5)	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
Lyn (610003)	Becton Dickinson	Western Blot
PKC (α, β, γ)	Upstate	Western Blot
PLAG1 (AB 55652)	Abcam	Western Blot
pY (4G10)	Upstate	Western Blot
pY (PY20)	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
pY (PY99)	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
PY416 pan Src	Cell Signaling	Western Blot
Sek. Antikörper 680 Anti-Kaninchen	LiCOR	Western Blot
Sek. Antikörper 680 Anti-Maus	LiCOR	Western Blot
Sek. Antikörper 800 Anti-Kaninchen	LiCOR	Western Blot
Sek. Antikörper 800 Anti-Maus	LiCOR	Western Blot
Sek. Antikörper Anti-Kaninchen-HRP	Ammershan	Western Blot
Sek. Antikörper Anti-Maus-HRP	Ammershan	Western Blot
SHP1 (C-19)	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
Tubulin (sc-9104)	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot
V5	Invitrogen	Western Blot/ Immunopräzipitation
β -Aktin	Santa Cruz Biotechnology	Western Blot

2.1.3 Verwendete Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien und die Bezugsquelle sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.5: Hersteller verwendeter Restriktionsenzyme.

Restriktionsenzym	Hersteller
BSU36I	New England Biolabs
HindIII	Fermentas
NHE I	Fermentas
XBa	New England Biolabs
SpeI	Boehringer Mannheim

Tabelle 2.6: Bezugsquellen benutzter Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
BA/F3	DSMZ
BA/F3-CD5-EGFR	Aditya Veldurthy, AG Krause
BA/F3-EGFR	Aditya Veldurthy, AG Krause
Daudi	DSMZ
Hek293-CD5	Luca Parabo, Köln
Hela	DSMZ
Jurkat (2G5-, 2G5+)	Lozano, Barcelona (Calvo et al., 1998)
JVM3	DSMZ
JVM3-CD5	Aditya Veldurthy, AG Krause
Mec1	DSMZ

2.1.4 Verwendete Plasmide und Primer

Die Bezugsquellen der verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in 5'-3' Richtung in Tabelle 2.8 aufgelistet.

Tabelle 2.7: Bezugsquelle der verwendeten Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pCDNA6	Invitrogen
pH β Apr-1-neo-CD5	Lozano, Barcelona
pIS0	Addgene
pIS1	Addgene
pmax-GFP	Amara
pRK5-EGFR	Ullrich, Martinsried
pTrcHis2-Topo	Invitrogen
pCDNA6-EPO-CD5	Martina Bamberger, München

Tabelle 2.8: Sequenzen der verwendeten Primer

Primer für	Sequenz
B2M	TTCTGGCCTGGAGGCTATC (FW) TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC (RW)
CD5 (aus pH β Apr-1-neo)	CGCAAGCTTATGGGGTCTCTGCAACCG (FW) CCCTGGATCCTGGCATGTGAC (RW)
CD5-EGFR (aus pRK5)	ATC CAA GCT TAT GCG ACC CTC CGG GAC (FW) AAT TCT CGA GCA GCC TCT GAG CC (RW)
CD5-EGFR (cytoplasmatische und Transmembran-Domäne CD5)	ATA CCT CAG GAT CCA AAC CCC G (FW) ATC CAA GCT TCA GCC TCT GAG CCC (RW)
EGFR (Mutation des Stop-Codon)	CAGGAGGCAAAGTGCCTATCA (FW) CCCAAGCTTTGATGCTCCAAT (RW)
IL10	TGGGGGAGAACCTGAAGAC (FW) CCTTGCTCTTGTTTTACAGG (RW)
PKC α	AAACCCCGTTCTTGACG (FW) ACGAAGTACAGCCGATCCA (RW)
PLAG1 (aus RZPDB737F102048D)	GACTAGTTGCCTATTTGTTGCTTGTGC (FW) TTTTCCTTTTGCGGCCAGCCACTTTCCATTCT (RW)
PLAG1-3'UTR	TTCGTTGAGCGAGTTCT (zur Sequenzierung)
PLAG1-3'UTR (MUT 107,424)	CCTTCAATATTATATTHATCATGATGATAATGTAACCTGGGCTACA ACTCT (FW) AGAGTTGTAGCCCAAGTTACATTATCATGATCCAATATAATATTGAA GG (RW)
PLAG1-3'UTR (MUT 141)	CAAAAATGGTAGATGGTATTTTAAACAGGTACATTTTAAAGGGTT TTCTTATCAATTTGCTAT (FW), TATAGCAAATTGATAAGAAAACCCTTTAAAAATGTACCTGTTTAAA ATACCATCTACCATTTTT (RW)
PLAG1-3'UTR (MUT 181, 1)	CCAGAGCCGATTGCTTTATTAAGCTAATAAGGAAGGTTAAAGAGT ACATATTTTCA(FW) TGAAAATATGTACTATTTAACCTTCCTTATTAGCTTAATAAAGCAAT CGGCTCTGG (RW)
PLAG1-3'UTR (MUT 181, 2)	CAGTGGTACAGATGAACCAGAAGGAAGGTTTATCTTCTCAGAAAC ACTC (FW) GAGTGTCTGAGAAGATAAACCTTCCTTCTGGTTCATCTGAACC ACTG (RW)

2.2 Verwendete Geräte

Die Hersteller verwendeter Geräte sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Tabelle 2.9: Hersteller verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
Elisa-Reader MR500	Dynatech
FACS-Canto	Becton Dickinson
LiCOR-Odyssey	LiCOR
Light-Cycler	Roche
Luminometer	Berthold
Nanodrop	Paqlab
PCR	Biometra
SDS-Gel/Western Blot Kammern	Bio-Rad

2.3 Verwendete Puffer

Die Rezepturen verwendeter Puffer sind in Tabelle 2.10 aufgelistet.

Tabelle 2.10: Rezeptur verwendeter Puffer

Puffer	Rezeptur
HEPES-Puffer	50 mM HEPES pH7, 1 mM DTT, 1 mM MgCl ₂
Kinase-Assay-Puffer	50 mM Tris-HCl pH7,2, 10mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 0,01% Tween 20, 100 µM ATP
Lyse-Puffer	1% Detergenz (NP40/Brij 96), 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH8, 10% Glycerol, 18 mM EDTA, 0,2% Phosphatase- und Proteaseinhibitor
TBS	10 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, (für TBST: 0,1% Tween 20)
Transfer-Puffer	200 mM Tris, 200mM Glycin, 15% Methanol

3 Methoden

3.1 Arbeiten in der Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ mit 10% Hitze inaktivierten FBS und 1% Penicillin/Streptomycin inkubiert und alle 2-3 Tage in die von der DSMZ empfohlenen Dichte gesplittet (www.dsmz.de, 13.02.2009). Mec1-, Jurkat-, JVM3-, BA/F3- und Daudi-Zellen wurden in RPMI1640 kultiviert. Für die Kultivierung von BA/F3-Zellen wurde dem Medium noch 10 ng ml⁻¹ IL-3 hinzugegeben. Hek293- und Hela-Zellen wurden in DMEM kultiviert.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zelllinien wurden in einer Dichte von 1×10⁶ ml⁻¹ in FBS mit 10% DMSO in Kryotubes eingefroren. Dazu wurden diese in Einfrierboxen (Kryobox) überführt und bei -80°C gelagert. Für längere Aufbewahrung wurden die Proben in Flüssig-Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen auf 37°C erwärmt. Sie wurden in ein 50 ml Falcon mit 10 ml Medium überführt und zentrifugiert (1 000 rcf), um das DMSO zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 5 ml Kultivierungsmedium überführt und weiter passagiert.

3.1.3 Gewinnung von primären Zellen

Um periphere mononucleäre Blut- (PBMCs) Zellen zu gewinnen wurde heparinisieretes Blut von Patienten mittels eines Ficoll-Gradienten aufgereinigt. Das Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und auf 20 ml Ficoll in einem 50 ml Röhrchen aufgeschichtet. Die 50 ml Röhrchen wurden bei 2300 rcf für 30 min zentrifugiert und ohne zusätzliches bremsen gestoppt. Die mononucleären Zellen befinden sich nun auf der Ficoll-Schicht und werden mit einer Pipette abgenommen. Nach zweimaligem waschen mit PBS wurden die Zellen gezählt und für weitere Experimente verwendet. Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10⁶ ml⁻¹ in RPMI1640 Medium weiter kultiviert.

Um eine reinere Population von B-Zellen von Patientenblut zu gewinnen, wurde vor der Ficoll-Zentrifugation zu den Zellen ein Aufreinigungs-Antikörper Kit (Rosette Sep B-cell

purification) dazugegeben (100 µl Antikörper-Lösung auf 2 ml Blut) und 15 min bei RT inkubiert.

PBMCs aus Blut von gesunden Probanden wurden mittels der MACs-Technik weiter aufgereinigt. Die Zellen wurden mit CD19 gekoppelten magnetischen Beads inkubiert. Die Anti-CD19 Antikörper binden ausschließlich CD19-positive Zellen, B-Zellen. Diese werden an einen Magneten in einer Säule gebunden, während die restlichen Zellen, die sich im Blut befinden, gewaschen werden.

Die Abnahme von Patienten- bzw. Probandenblutproben erfolgte im informierten Einverständnis im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethikkommission der Universität zu Köln genehmigt (Antragszeichen 01.163).

3.2 Herstellen der verwendeten Plasmide

Für die Arbeiten zur Herstellung von CD5, CD5-EGFR und EGFR kodierende Plasmide wurde der pCDNA6 Vektor verwendet. Die 3'UTR von dem PLAG1 kodierendem Gen wurde in den Vektor pIS1 kloniert. Eine Auflistung der verwendeten Plasmide und Primer befinden sich in Tabelle 2.7 und Tabelle 2.8.

Im Allgemeinen wurden die DNA-Abschnitte mittels PCR gewonnen. Danach wurde der PCR Ansatz mit dem PCR Purification Kit aufgereinigt. Es folgte ein Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen. Der Verdau wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. Die benötigten DNA Banden wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel Extraktion Kits aufgereinigt und 1 h bei 16°C mit T4-Ligase ligiert und in XL-1- blue oder DHT5α-Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Die Bakterien wurden auf Ampizillin-LB-Platten ausgesät und bei 37°C in Inkubator über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Klone gepickt und wieder über Nacht bei 37°C schüttelnd in LB-Medium inkubiert. Danach folgten eine DNA-Isolierung und ein Restriktionsverdau. Das Insert der gewonnen Plasmide wurde mittels Sequenzierung verifiziert.

3.2.1 Klonierungen in den pCDNA6-Vektor

Die cDNA von CD5, EGFR oder dem chimären Rezeptor CD5-EGFR wurde in einen pCDNA6 Vektor kloniert. Die Transkription dieses Vektors wird durch einen CMV-Promotor reguliert. Nach der Multiple-Cloning-Site wird noch ein His-Tag und V5-tag kodiert.

pCDNA6-CD5-EGFR: Um den chimären Rezeptor zu klonieren wurde aus dem Plasmid pCDNA6-EPO-CD5 mittels PCR der Transmembran-Domäne kodierende Bereich und der die cytoplasmatische Domäne kodierende Bereich herausgeschnitten. An dem 3'-Ende wurde in den Primer eine HindIII-Schnittstelle hinzugefügt, an das 5'-Ende eine Bsu36I Schnittstelle. Der amplifizierte DNA-Abschnitt wurde mittels dieser Restriktionsenzyme geschnitten und mit dem Vektor pRK5-EGFR ligiert, der zuvor ebenfalls verdaut wurde. Mit Hilfe einer weiteren PCR wurde CD5-EGFR aus dem Vektor pRK5 herausgeschnitten, und nach einem Verdau mit HindIII und XhoI in den Vektor pCDNA6 überführt.

pCDNA6-CD5: Die cDNA für die Kodierung der extrazellulären Domäne von CD5 wurde aus dem Vektor pH β Apr-1-neo-CD5 mittels PCR herausgeschnitten. Der Vektor pCDNA6-CD5-EGFR und die gewonnene amplifizierte DNA wurden mit BamHI verdaut und ligiert.

pCDNA6-EGFR: Die cDNA für EGFR wurde aus dem Vektor pRK5-EGFR mit den Restriktionsenzymen HindIII und XBa herausgeschnitten. Der Vektor pCDNA6 wurde mit NHEI und HindIII verdaut. Danach wurden beide Fragmente ligiert. Um das Stop-Codon am EGFR 3'-Ende zu entfernen wurde mit Primern in einer PCR eine Punktmutation eingeführt, wodurch statt Translationsstop ein Leucin synthetisiert wurde.

3.2.2 Klonierungen in den pIS1-Vektor

In den pIS1-Vektor wurde die 3'UTR für das Gen PLAG1 kloniert und die Mutationen der miRNA-Bindestellen durchgeführt. Die Sequenz für PLAG1 3'UTR wurde aus einer cDNA-Datenbank (ImaGenes, Clone RZPDB737F102048D) bezogen. Mit einer PCR wurde eine Sequenz der 3'UTR (3316bp-4617bp) aus dem Plasmid herausgeschnitten. Für diese PCR wurde eine High Fidelity Polymerase (Fermentas) benutzt, die Poly-A Enden produziert. Das entstandene DNA-Fragment wurde in den pTrcHis2-Topo hinein kloniert. Aus diesem Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen SpeI und NotI das gewünschte Fragment herausgeschnitten und in pIS1 kloniert. Das Plasmid wurde pIS1-PLAG1-3'UTR genannt.

Mutationen: Die Mutationen der miRNA-Bindestellen wurden mit dem Stratagene QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Die Primer wurden mit Hilfe der Primer-Design Software auf der Stratagene Homepage erstellt (<http://www.stratagene.com>). Es wurde darauf geachtet, dass die miRNA-Bindestelle durch zwei Punktmutationen verändert wird. Dadurch soll die Ausbildung einer Helix zwischen

mRNA und miRNA unterbunden werden (Brennecke et al., 2005). Außerdem wurde die Punktmutation so gewählt, dass auch eine Ausbildung von Wobble-Basenpaaren nicht möglich war. Für die Herstellung der Plasmide wurde die Anleitung von Stratagene verwendet (Tabelle 3.1).

3.3 Transfektion der verwendeten Plasmide

3.3.1 Transfektionen von Zelllinien

Stabile Transfektionen: Für Transfektionen von Suspensions-Zelllinien wurden stabile Klone hergestellt. Bevor die Zellen für eine stabile Transfektion transfiziert wurden, wurde zuerst die effizienteste Transfektion getestet und die optimale Konzentration für eine Selektion mit Blastizidin bestimmt. Dafür wurden die Zellen in einer Dichte von $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ausgesät und 0-10 μg Blastizidin pro ml ausgesät. Nach zwei Wochen wurde die geringste Blastizidin-Konzentration gewählt, bei der nur tote Zellen mit Trypan-Blau Färbung ermittelt werden konnten. Alle Transfektionen (außer Hek293-Zellen) wurden durch Elektroporation bei 900 μF und 250 V durchgeführt. Die zu transfizierende DNA wurde zuvor linearisiert und 30 μg verwandt. Die Konzentrationen für die Selektion der Klone sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Zwei Wochen nach der Selektion wurde die Lebendzellzahl bestimmt und die Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät. Dabei wurden pro Platte 50, 25, 12, 6, 2 oder 1 lebendige Zellen pro Well ausgesät. Pro Zell-Konzentration wurde eine Platte ausgesät. Wöchentlich wurden die Platten nach hochgewachsenen Klonen untersucht. Sobald sich das Medium eines Wells gelb färbte, wurden die Zellen in eine neue Kulturschale überführt. Damit möglichst nur Einzel-Zell Klone weitergezogen wurden, wurden nur die

Tabelle 3.1: Sequenzen der miRNA und mutierten miRNA-Bindestellen.

Potentielle Bindestelle für hsa-miR	Seed-Sequenzmotiv1	Mutiertes Bindemotiv1,2	Position in PLAG1-3'-UTR
181a / 181b	UGAAUGU	GGAAGGU	3502, 4309
107 / 424	AUGCUGC UGCUGCUA	AUGAUGAUGUA	4437
141	CAGUGUU	AAGGGUU	3878

1: Orientierung der mRNA von 5' zu 3'

2: Nukleotide die durch Mutagenese vertauscht wurden sind unterstrichen dargestellt.

3: Die Nummerierung der 3'UTR startet nach dem PLAG1 Stop-Codon.

Tabelle 3.2: Blastizidin-Konzentrationen zur Selektion stabiler Klone.

Zelllinie	Blastizidin-Konzentration
Mec1	8 $\mu\text{g ml}^{-1}$
JVM3	8 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Daudi	4 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Jurkat	8 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Hek293	15 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Klone weiter kultiviert, bei denen höchstens jedes dritte Well eine Population entwickelte. Die heranwachsenden Klone wurden mittels FACS auf die Oberflächenexpression des Target-Proteins getestet.

Transiente Transfektionen: Am Tag vor der Transfektion wurden 2×10^4 Hela-Zellen pro Well ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die benötigte DNA/RNA in einem Endvolumen von 25 μl (aufgefüllt mit Opti-Mem) vorpipettiert. Insgesamt wurde pro Well 50 ng DNA (pIS0:pIS1; 1:10) und 1 pg miRNA transfiziert. Jeder Ansatz wurde mindestens in Triplets transfiziert. In der Zwischenzeit wurde DMEM und die am Tag zuvor ausgesäten Hela-Zellen auf RT gebracht.

Danach wurde die Lipofectamin Lösung vorbereitet. Dazu wurde ein Mastermix Ansatz angesetzt. Pro Well wurde 0,5 μl Lipofectamin (Vorher vorsichtig gemischt) in 25 μl Opti-Mem pipettiert. Nach vorsichtigem mischen wurde die Lösung 5 min bei RT inkubiert.

Pro Well wurde 25 μl Lipofectamin Mix in die Eppendorfgefäße gegeben, vorsichtig gemischt und 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde auf die Hela-Zellen 50 μl frisches DMEM-Medium gegeben (ohne Penicillin/Streptomycin).

Nach der Inkubationszeit wurde je Well 50 μl Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Für jedes Well wurde eine neue Pipettenspitze benutzt. Nach 4-6 h Inkubation im 37°C Inkubator wurde das Medium nach einmaligem waschen mit 100 μl Medium erneut gewechselt (75 μl). Über Nacht wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

3.3.2 Luziferase-Assay

Für den Luziferase-Assay wurde das Kit Dual-Glo von Promega verwandt. Das Substrat für die *Firefly*-Luziferase wurde im Wasserbad auf RT erwärmt. Währenddessen wurde die Zellkulturplatte auf RT abgekühlt. Pro Ansatz (75 μl) wurden 75 μl Luziferase-Substrat auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Menge an

umgesetztem Luziferin, messbar durch Lichtemission, mit einem Luminometer bestimmt. Danach wurden 75 µl der Stop and Glow Solution auf die Zellen gegeben. Dies Inhibiert die Aktivität der *Firefly*-Luziferase. In dieser Lösung befindet sich auch das Substrat für die *Renilla*-Luziferase. Nach weiteren 10 min Inkubationszeit konnte die Menge an Luziferin bestimmt werden.

Die Menge an umgesetztem Substrat der Luziferasen ist proportional zu ihrer Expressionsstärke. Die Expression der *Renilla*-Luziferase wurde normalisiert auf die Expression der *Firefly*-Luziferase. In einem zweiten Schritt wurde die normalisierte Expression der *Renilla*-Luziferase auf Expression der *Renilla*-Luziferase nach Transfektion mit Kontroll-miR normalisiert.

3.3.3 Transfektionen von primären Zellen

Zur Transfektion primärer CLL-Zellen wurde von Amaxa Kit V verwandt. Frisch aufgereinigte Zellen wurden sofort transfiziert. Für einen Ansatz wurden 5×10^6 Zellen verwendet. Die zu benutzenden Zellen wurden in einem Eppendorfgefäß herunterzentrifugiert und pro Ansatz in 100 µl Solution V resuspendiert. 100 µl der Zelllösung wurden in die Küvetten, in denen sich schon die zu transfizierende DNA/RNA befand pipettiert und mit der DNA/RNA durch schütteln gemischt. Insgesamt wurden fünf Doppelansätze transfiziert. Ein Ansatz wurde ohne zusätzliche RNA transfiziert, einer mit 2 µg pMAX-GFP, einer mit Kontroll-RNA, einer mit miR-181a/181b und einer mit miR-181a/181b/424/107. Zur Elektroporation der CLL-Zellen wurde das Programm U-013 gewählt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort mit Hilfe der im Kit erhältlichen Pipette in ein 6-Well Platte transferiert, indem sich 1,5 ml 37°C warmes RPMI mit 10% FBS befanden. Die Küvette wurde noch zweimal mit Medium ausgespült.

24 h später wurde die Transfektionseffizienz des pMAX-GFP ermittelt, indem diese Probe mit einem FACS analysiert wurde. Die Überlebensrate der mit RNA transfizierten Zellen wurde mit 7-AAD und Annexin-V-FITC in einer FACS-Messung bestimmt.

3.4 Crosslinking

Für das Crosslinking mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS3) wurden pro Ansatz 2×10^7 Zellen verwendet. Experimente wurden an Mec1-Klon CD5-EGFR1 und 2 und EGFR durchgeführt. Für jeden Klon wurden drei Ansätze angesetzt, nämlich mit Crosslinking und

EGF, mit Crosslinking ohne EGF und nur EGF-Zugabe ohne Crosslinking. Die Proben wurden dreimal mit PBS gewaschen und in 200 μ l resuspendiert. Sie wurden auf Eis gestellt und 1 h mit dem Liganden (100 ng) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von BS3 für 30 min (2 mM). Um überflüssiges BS3 zu binden wurde 20 mM Tris (pH 7,5) hinzugegeben. Die Proben wurden noch einmal mit PBS gewaschen und mit 70 μ l NP40 Lyse-Puffer lysiert. Für die Analyse wurden 6% SDS-Gele angefertigt und von jeder Probe die gleiche Menge an Protein aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Anti-V5 Antikörper durchgeführt.

3.5 Stimulierungen

Für die Stimulierungen wurden verschiedene Protokolle ausgetestet, z.B. wurden die Proben teilweise über Nacht in Medium ohne FBS gehungert, oder zur Lyse der Zellen andere Lyse-Puffer benutzt. Beschrieben werden die Methoden, der hier dargestellten Ergebnisse.

3.5.1 Stimulierungen mit EGF

Für die Stimulierungen mit EGF wurden die Zellen am Vortag in einer Dichte von $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ausgesät in RPMI ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen herunterzentrifugiert, in PBS resuspendiert, und in einer Konzentration von $4 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ in Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und 100 ng EGF dazugegeben. Danach folgte eine weitere Stunde Inkubation auf Eis und eine 60 min Stimulierung bei 37°C im Wasserbad (Majolini et al., 1998). Danach wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt und 1 ml PBS mit 1 mM Na_3VO_4 und 20 mM NaF gestoppt. Die Proben wurden zweimal mit PBS gewaschen und 30 min in NP-40 Lyse-Puffer lysiert.

3.5.2 Stimulierungen mit IgM

Primäre CLL-Zellen wurden mit $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Anti-IgM gekoppelten Beads Stimuliert. Die primären Zellen wurden in einer Dichte von $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ausgesät. Der XTT-Assay wurde nach 24 h und 48 h durchgeführt. Für den Vergleich mit Anti-CD5 Antikörper Behandlungen wurden die Assays nach fünf Tagen Inkubation durchgeführt.

Für Zelllinien wurden die Zellen mehrmals mit PBS und RPMI ohne FBS gewaschen. Danach wurden sie über Nacht in RPMI kultiviert und mit ebenfalls $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Anti-IgM Beads stimuliert. Annexin-V-Assay und XTT-Assay wurde nach 24 h und 48 h gemessen.

3.5.3 Stimulierungen mit CD5

Primäre CLL-Zellen wurden in einer Dichte von $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ in RPMI kultiviert. Für Stimulierungen mit löslichem Anti-CD5 Antikörper wurde $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ auf die Zellen gegeben (als Kontrolle IgG). Nach fünf Tagen Inkubation wurde der XTT-Assay und Annexin-V-Assay durchgeführt. Dieses Protokoll wurde übernommen von Perez-Chacon et al (Perez-Chacon et al., 2007b).

Für die Stimulierung mit gekoppelten Anti-CD5 Antikörper an M-450 Dynalbeads (Tosyl-aktiviert) mussten zuerst die Beads hergestellt werden. Dafür wurden $400 \mu\text{g}$ Antikörper in $1,2 \text{ ml}$ mit Borat-Puffer ($0,1 \text{ M}$ Natrium-Borat, $\text{pH } 9$) gewaschene Beads gegeben (Ausgangsmenge Beads 4 ml) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Beads fünfmal mit PBS gewaschen und in 4 ml PBS resuspendiert. Die Anzahl Beads wurde mikroskopisch bestimmt. Für die Stimulierungen der Patientenzellen wurde ein halbes Bead, ein Bead oder zwei Beads pro Zelle benutzt.

Für die Stimulierungen der Mec1-Zellen wurde ein halbes Bead pro Zelle benutzt. Mec1-Zellen wurden für diesen Versuch über Nacht in RPMI gehungert und ein XTT-Assay nach 24 h und 48 h gemessen.

3.6 XTT-Assay

Der XTT-Assay ist ein kolorimetrischer Test. Die Farbe die sich im Laufe des Assays entwickelt ist von dem Vorhandensein von NADP(H) abhängig. Die Menge an Farbe, die sich in einem Assay entwickelt, korreliert somit mit der Anzahl von metabolisch aktiven, lebendigen Zellen. Damit gibt der XTT-Assay einen indirekten, relativen Nachweis von der Zellzahl in einem Ansatz.

Für den XTT-Assay wurden 1×10^3 Zellen bei Zelllinien oder 2×10^5 Zellen bei primären Zellen pro Well in eine 96-Well Platte ausgesät. Es wurde pro experimentellen Ansatz mindestens Dupletts ausgesät. Dabei wurde darauf geachtet, in jedem Pipettierschritt eine neue Spitze für die Pipette zu verwenden. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Hintergrundabsorption nur Medium in die Schälchen gegeben. Auf die Zellen, und die

Kontrollen wurden nach dem Aussäen jeweils 50 µl XTT-Reagenz mit einer Multipette dazugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C bei 5% CO₂ inkubiert und nach 24-96 h gemessen.

Die Messung des XTT-Assay erfolgte in einem Elisa-Reader. Es wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und gegen die Absorption bei einer Wellenlänge von 650 nm normalisiert. Für die Auswertung wurde die Absorption, die bei der Kontrolle gemessen wurde von den übrigen Werten abgezogen.

3.7 Herstellung von Lysaten

Zur Herstellung von Lysaten wurde pro 1×10^6 Zellen 15 µl Lyse-Puffer verwandt (NP-40 oder Brij Lyse-Puffer). Vor der Lyse wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Lyse wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit einer Pipette und dem Lyse-Puffer resuspendiert. Danach wurden sie 30 min bei 4°C drehend inkubiert. Um Zelltrümmer zu entfernen wurden die Zellen bei 16 000 rcf für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

3.7.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Anleitung des BCA-Kits der Firma Pierce.

3.8 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden 1×10^7 Zellen benutzt (für Kinase-Assay und pY416-Bestimmung 500 µg Protein). Die Zellen wurden in 1 ml Lyse-Puffer lysiert (bei Kinase-Assay, pY416-Bestimmung 300 µl; siehe Tabelle 3.3). Zuerst wurden die Lysate mit Agarose-Beads (50 µl) 1,5 h vorbehandelt. Die Beads wurden herunterzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Die Beads (50 µl) wurden mit den Antikörpern auf die Lysate gegeben und 1,5 h inkubiert. Danach wurden die Proben noch fünfmal mit Brij Lyse-Puffer (oder NP-40 Lyse Puffer) gewaschen und sofort mit 40 µl SDS-Gel-Ladepuffer für 5 min bei 100°C gekocht. Für den Kinase-Assay wurden die Proben ohne kochen weiterverwandt. Für die CD5-Immunopräzipitation wurde der Überstand der gesamten Immunopräzipitation auf ein SDS-Gel aufgetragen, ansonsten die Hälfte der Probe.

Tabelle 3.3: Verwendete Mengen von Antikörper für Immunopräzipitationen

Immunopräzipitation	Konzentration (pro Ansatz)	Lyse-Puffer
CD5 (L17F12)	4 µg	Brij-96 Lyse-Puffer
CD5 (V5)	4 µg	Brij-96 Lyse-Puffer
Lck	2 µg	NP-40 Lyse-Puffer

3.9 Kinase-Assay

Für den Kinase-Assay musste zuerst das Substrat Enolase vorbereitet werden. Dafür wurden 2,15 mg der rabbit-muscle Enolase bei 4°C und 16 000 rcf in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, in 50 µl HEPES-Puffer resuspendiert und 30 min *auf Eis inkubiert*. Es wurde 50 µl Glycerin hinzugegeben und in 20 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Zur Inaktivierung wurde die Enolase mit 1 VT 100 mM Essigsäure versetzt und 10 min bei 30°C inkubiert. Pro Kinasereaktion wurde 1 µl eingesetzt.

Die immunopräzipitierten Kinasen wurden 20 µl Kinase-Puffer (inkl. 1 µl Enolase) resuspendiert und für 15 min bei 30°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Zu den Proben wurde 20 µl 4×SDS-Ladepuffer hinzugegeben und 20 µl auf ein SDS-Gel geladen.

3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht unter denaturierenden Bedingungen die Auftrennung eines Proteingemisches entsprechend der Molekulargewichte der im Proteingemisch enthaltenen Proteine. Die native Konformation der Proteine wird dabei durch die Reduktion der Disulfidbrücken mit TCEP und Anlagerung des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört. Durch die Einführung negativer Ladungen wandern die Proteine umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts, im elektrischen Feld in Richtung Anode.

Nach Einfüllen und Polymerisation der Trenngellösung wurde die Sammelgellösung hinzugefügt. Die Gelkassette wurde dann in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Proben in 4×SDS-Probenpuffer wurden bei 100°C für 5 min denaturiert, kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde in Laemmli-Puffer bei 100 V im Sammelgel und bei 120 V bis max. 150 V (ca. 30 mA) im

Trenngel durchgeführt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts und zur Kontrolle der Laufbedingungen wurden Standardmarker aufgetragen.

3.11 Western Blot

Für die Übertragung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe eines Wet-Western Blots auf eine Membran. Negativ geladene Proteine wandern in einem elektrischen Feld aus dem Gel zur Anode und bleiben an der Transfer-Membran hängen. Die Blotkammer wurde wie folgt aufgebaut: Auf die Kathode wurde ein mit Transfer-Puffer getränkter Schwamm gelegt, danach folgte Filterpapier, das Polyacrylamid-Gel, die Nitrozellulose-Membran (oder PVDF-Membran), wieder ein durchnässtes Filterpapier und ein Schwamm. Der Blot wurde mit Eiskühlung 1 h bei 100 V durchgeführt.

3.12 Immunodetektion

Für die Immundetektion wurde bei einer PVDF-Membran diese über Nacht bei 2,5% BSA in TBS geblockt (Nitrozellulose, Odyssey Blocking Buffer). Am nächsten Tag wurde der Primäre Antikörper in 3 ml TBST hinzugegeben und 1 h drehend inkubiert (für LiCOR in Odyssey Blocking Buffer). Danach wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit sekundärem Antikörper (HRP: 1:3 000; LiCOR 1:15 000) für 45 min und einem erneuten dreimaligen Waschen mit TBST. Die mit Antikörper-HRP behandelte Membran wurde mit ECL-Western Blotting Detection System (Amershan) und darauffolgende Belichtung und Entwicklung von Hyperfilm ECL (Amershan) durchgeführt.

Die mit Fluoreszenz-Antikörper markierte Membran wurde mit dem Odyssey-Imager entwickelt.

3.12.1 Strippen der Membran

Um die Antikörper von der Membran zu entfernen wurde die Membran 15 min bei RT mit Re-Blot Solution mild inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal mit entsprechenden Lösungen geblockt.

3.13 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen sowie intrazellulären Proteinen. Das Verfahren beruht auf einer fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörper-Antigen Reaktion.

Bei der Auswertung der Oberflächen-Proteinexpression am Durchflusszytometer wurde die Software FACSDiva benutzt. Das FACS wurde zur Annexin-V-Färbung benutzt und zur Detektion von Oberflächenmolekülen.

Bei der Annexin-V-Färbung wurden 5×10^5 Zellen in ein FACS-Tube überführt, und 5 min und mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde in jeden Ansatz 150 μ l Annexin-V- Staining Puffer und je 3 μ l Annexin-V-FITC und 7AAD dazugegeben. Für diese Versuche wurden 10 000 Events gezählt.

Für die Oberflächenfärbungen wurden ebenfalls 5×10^5 Zellen in ein FACS-Tube überführt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit je 2,5 μ l Antikörper gefärbt und 15 min bei RT im Dunklen inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit Cell-Fix fixiert und gefaxt.

3.14 Gewinnung von cDNA

Für die Gewinnung von cDNA wurden mindestens 2×10^5 Zellen mit 1 ml Trizol gelöst. Durch Trizol wurden Nukleoprotein-Komplexe aufgelöst. Danach wurden 200 μ l Chloroform zu der Lösung gegeben und zentrifugiert (16 000 rcm; 4°C; 10 min). Die genomische DNA und Proteine befinden sich in der unteren Phase. Die RNA, die sich in der wässrigen Phase befindet, wurde abgenommen und durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol präzipitiert. Nach einer Inkubation von 10 min wurde zentrifugiert (16 000 rcf; 4°C; 30 min). Danach wurde das RNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und abschließend getrocknet. Die RNA wurde in 100 μ l RNAsen-freiem Wasser für 5 min bei 55°C gelöst.

Die RNA-Reinheit und -Konzentration wurde am Spektrometer (Nanodrop) bestimmt, und die Absorption bei 260 nm (A260) und 280 nm (A280) gemessen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem cDNA-Synthese Kit von Roche durchgeführt. Für die Synthese wurden 500 ng RNA eingesetzt. Die Menge an RNA wurde mit RNase-freiem

Wasser auf 12 µl aufgefüllt und nach Zugabe der Anchored Primer 10 min auf 65°C erhitzt. Puffer, dNTPs, RNase Inhibitor und das Enzym Reverse Transkriptase wurde hinzugefügt und die Lösung 30 min bei 55°C, dann 5 min bei 85°C inkubiert. Die cDNA wurde schließlich in 80 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.14.1 Arbeiten mit dem Light-Cycler

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Sonde bindet spezifisch an die Sequenzen der cDNA. Bei jeder Verdoppelung der cDNA wird auch das Fluoreszenzsignal verdoppelt.

Zunächst wurde eine Standardreihe erstellt. Dazu wurde cDNAs von Mec1-Klon EGFR verwandt. Eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1 000, 1:10 000) der cDNAs wurde vorpipettiert und die quantitative Menge der darin enthaltenen cDNA wurde im Lightcycler gemessen. Die Standardreihe dient den folgenden Messungen als Effizienz-Relation.

Bei den Messungen der Proben im Lightcycler wurde jeweils ein Kalibrator (aus dem gleichen Mastermix wie die restlichen Standardproben) mit gemessen, und das Verhältnis zu dem Referenzgen β -2 microglobulin (B2M) bestimmt.

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit der LightCycler (Version 4.05) Software.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Teile. Zuerst werden die Ergebnisse beschrieben, die die Beteiligung des Transmembranrezeptors CD5 an der Pathogenese der CLL näher charakterisieren sollen. Im Zweiten Abschnitt werden Ergebnisse der Untersuchung der miRNA-Expression in CLL-Zellen und die Auswirkungen auf die Proteinexpression von PLAG1 vorgestellt.

4.1 Beteiligung von CD5 an der Pathogenese der CLL

CLL ist charakterisiert durch die Akkumulation CD5-positiver B-Zellen (Rozman and Montserrat, 1995). Die Rolle von CD5 in der Pathogenese der CLL ist bislang noch unklar. In T-Zellen und B-Zellen werden CD5 Aufgaben in der Signaltransduktion des TZR und BZR zugeschrieben (Gary-Gouy et al., 2000; Perez-Villar et al., 1999). Eine Stimulation von CD5 wurde bisher nur mit Antikörpern durchgeführt, da kein physiologischer Ligand bekannt ist. Stimulationen durch Antikörper können zu unspezifischen Effekten führen, weswegen in dieser Arbeit ein neuer Ansatz zur CD5-Stimulation gewählt wurde (Nimmerjahn and Ravetch, 2008; Rudich et al., 1985).

Für eine ligandenspezifische Aktivierung CD5-abhängiger Signalwege wurde ein chimärer Rezeptor konstruiert und in geeigneten Zellsystemen zur Expression gebracht. Die Ergebnisse der Stimulierungen des chimären Rezeptor werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Ergänzt werden die Ergebnisse durch Stimulierungen von CD5 mit Anti-CD5 Antikörpern auf Patientenzellen und Zelllinien (Abschnitt 4.1.7). Im letzten Abschnitt werden Versuche beschrieben, in denen die konstitutiven Effekte der CD5-Expression auf Zellen betrachtet werden (Abschnitt 4.1.8 bis 4.1.13).

4.1.1 Ein chimärer Rezeptor aus EGFR und CD5 kann in Mec1-Zellen stabil auf der Membran exprimiert werden

Der chimäre Rezeptor wurde so zusammengesetzt, dass die extrazelluläre Domäne aus EGFR besteht, und die cytoplasmatische Domäne und Transmembran-Domäne von CD5 stammt (Abbildung 4.1 A).

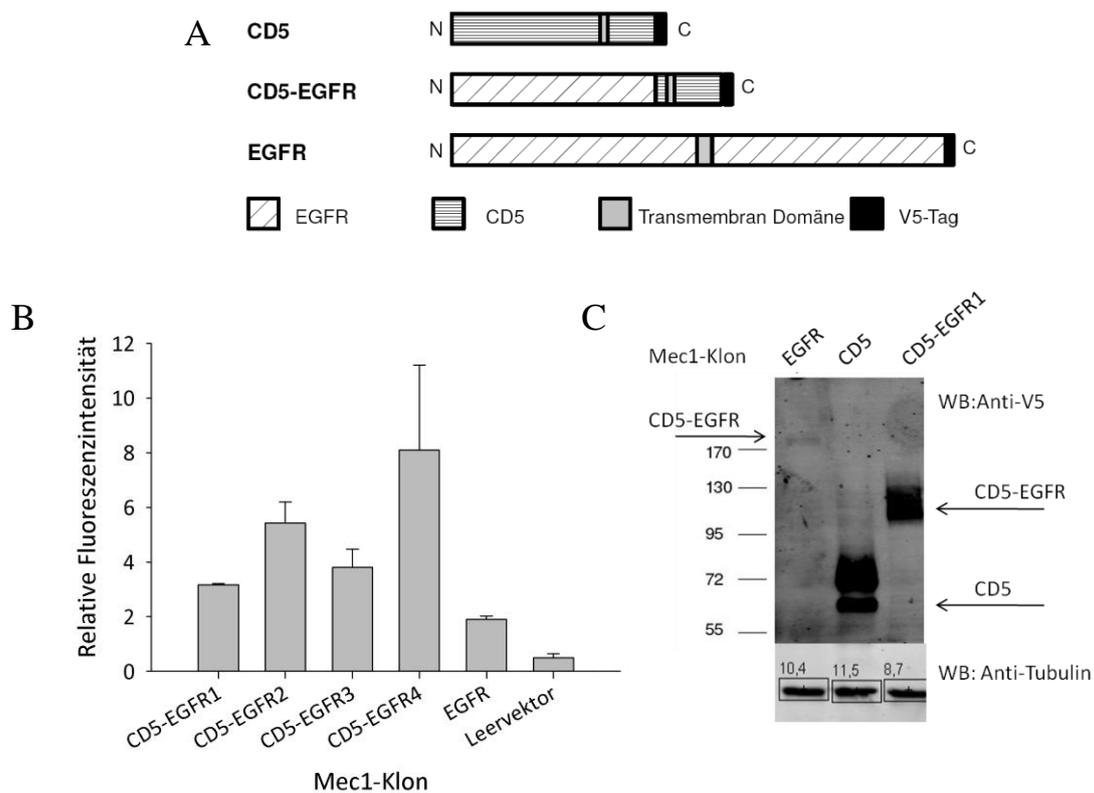


Abbildung 4.1: Expression von CD5-EGFR auf stabil transfizierten Mec1-Klonen. A) Schematische Darstellung der exprimierten Proteine EGFR, CD5-EGFR und CD5. N: N-Terminales Ende; C: C-Terminales Ende. B) Relative Proteinexpression von EGFR oder CD5-EGFR auf Mec1-Klonen und eines mit dem Leervektor transfizierten Klons auf der Zellmembran. Die durchflusszytometrisch gemessene durchschnittliche Fluoreszenz nach Färbung mit Anti-EGFR Antikörper wurde auf die mit einem unspezifischen Isotyp-Kontrollantikörper erhaltene Signalstärke normalisiert. Die Stärke der Oberflächenexpression wurde in zwei unabhängigen Experimenten gemessen. Die CD5-EGFR Klone sind durchnummeriert. C) Lysate von Mec1-Klon EGFR, CD5 und CD5-EGFR1 wurden auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Der Western Blot wurde gegen den am C-Terminus lokalisierten V5-Tag durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Tubulin gefärbt. Der Molekulargewichtsmarker (kDa) ist links im Bild dargestellt.

Für die beabsichtigten Untersuchungen wurde das CD5-EGFR-Konstrukt zunächst in der CLL-ähnlichen CD5-negativen Zelllinie Mec1 stabil exprimiert (Stacchini et al., 1999). Zum Vergleich wurden Mec1-Klone generiert, die den vollständigen EGFR und natives humanes CD5 exprimieren. Das Stop-Codon von CD5, CD5-EGFR und EGFR wurde durch eine Punktmutation verändert, so dass das am 3'-Ende liegende V5-Tag des Vektors mit abgelesen wird.

Die Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert. Nach Blastizidin-Selektion und Einzel-Zell-Verdünnung wurden stabile Klone gewonnen. Die Expression von CD5-EGFR auf der Zellmembran wurde in positiven Klonen durch Antikörperfärbung

durchflusszytometrisch ermittelt (Abbildung 4.1 B). Die Expression von CD5-EGFR ist in den Klonen 1 und 3 ungefähr gleich stark. Klon 2 ist in etwas stärkerer Proteinmenge vorhanden. Die Expression von CD5-EGFR ist in Klon 4 schwankend. Als Kontrolle wurde auch EGFR in Mec1-Zellen stabil transfiziert. EGFR wird auf Mec1-Zellen jedoch nur schwach exprimiert.

Im Western Blot zeigen sich bei CD5-EGFR transfizierten Klonen das Protein CD5-EGFR in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 110-130 kDa. Im Vergleich dazu liegt die Größe von CD5 im stabil transfizierten Mec1-Klon CD5 bei 65-75 kDa. Bei kürzeren Expositionen zeigen sich zwei Proteinbanden, die sich aus unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen, z.B. Glykosylierung, ergeben könnten (Abbildung 4.1 C).

Für die weiteren Untersuchungen standen verschiedene CD5-EGFR-positive Klone zu Verfügung, wovon Klon 3 und 4 mit zeitlicher Verzögerung generiert wurden. Ebenfalls konnte ein EGFR-positiver und mit zeitlicher Verzögerung auch ein CD5-positiver Mec1-Klon hergestellt werden.

4.1.2 Dimerisierung von CD5-EGFR nach EGF-Zugabe

Um zu testen ob der chimäre Rezeptor nach EGF-Zugabe dimerisiert, wurden Crosslinking-Experimente mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS3) durchgeführt. BS3 ist wasserlöslich und somit nicht Membran-permeabel. Mec1-Klon CD5-EGFR1 und 2 und Mec1-Klon EGFR wurden nach Zugabe von EGF mit BS3 gecrosslinkt. Nach Lyse der Zellen und Auftrennung auf einem SDS-Gel wurde ein Western Blot gegen das am C-Terminus vorhandene V5-Tag durchgeführt.

Zu erkennen ist, dass durch gleichzeitige Zugabe von EGF und BS3 ein Dimer von EGFR bei Mec1-Klon EGFR erscheint. Die alleinige Zugabe von BS3 oder EGF reichen nicht aus, um eine detektierbare Dimerisierung von EGFR zu erreichen. Eine Dimerisierung von CD5-EGFR ergibt sich bei gleichzeitiger Zugabe von BS3 und EGF. Auch die Zugabe von BS3 alleine zeigte eine Dimerisierung von CD5-EGFR, jedoch in schwächerer Form. Dies kann bei beiden untersuchten CD5-EGFR Klonen beobachtet werden (Abbildung 4.2). Ohne BS3-Zugabe sind keine Dimere zu erkennen.

Die zunehmende Dimerisierung von CD5-EGFR nach EGF-Zugabe ist ein Anzeichen dafür, dass über die Stimulierung mit EGF eine Signalkaskade für CD5 aktivierbar ist.

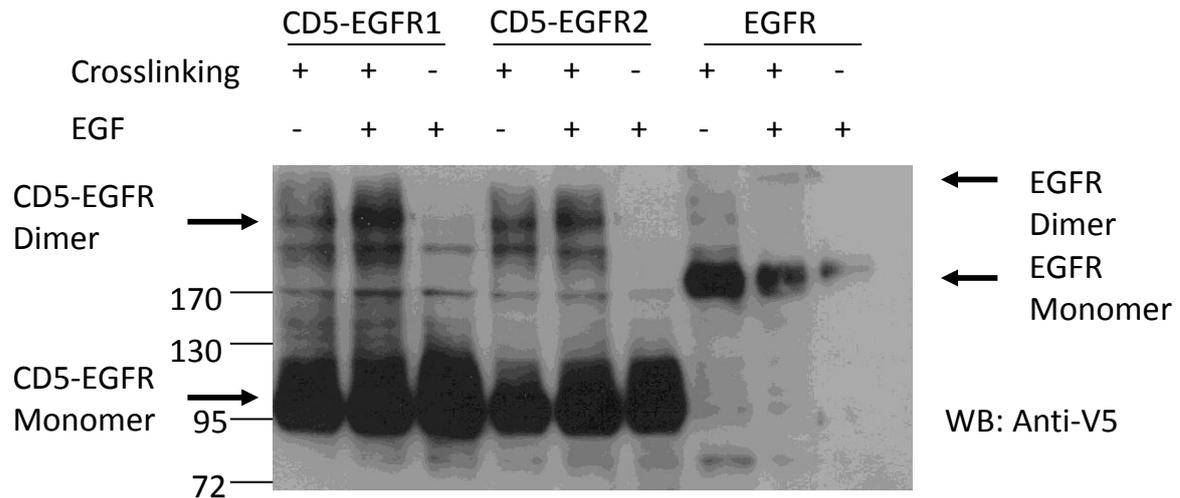


Abbildung 4.2: CD5-EGFR dimerisiert nach Zugabe von EGF. Mec1-Klone EGFR oder CD5-EGFR (Klone 1 und 2) wurden entweder unbehandelt oder nach EGF-Zugabe bei 4°C inkubiert und mit oder ohne Crosslinking-Reagenz BS3 (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat) behandelt. Danach wurden die Zellen lysiert. Der Western Blot wurde mit Anti-V5 Antikörper, der den V5-Tag am C-Terminus von CD5-EGFR oder EGFR erkennt, entwickelt. Links im Bild ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet (kDa).

4.1.3 Zeitverlauf der Tyrosinphosphorylierung in Mec1-Klonen nach EGF-Behandlung

Um zu testen, ob durch die Dimerisierung von CD5-EGFR eine Signalkaskade ausgelöst wird, wurde die globale Tyrosinphosphorylierung von Proteinen vor und nach einer Stimulierung mit EGF verglichen.

Mec1-Klon CD5-EGFR1 wurde nach einem Serumentzug für 60 min mit und ohne Zugabe von EGF bei 37°C inkubiert. Nach einer Stimulierung von CD5-EGFR mit EGF ist zu erkennen, dass die globale Tyrosinphosphorylierung sowohl bei den stimulierten als auch bei den unstimulierten Zellen über den gesamten Inkubationszeitraum abnimmt. Jedoch ist eine stärkere Dephosphorylierung bei den mit EGF-stimulierten Zellen zu erkennen (Abbildung 4.3 A).

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die beobachtete Abnahme der Tyrosinphosphorylierung ein Indiz für eine spezifisch aktivierte CD5-Signalkaskade durch EGF oder einen anderen, unspezifischen Effekt darstellt. Dafür wurden die Mec1-Klone EGFR, CD5-EGFR1 und Leervektor gewählt. Wie oben beschrieben, wurden diese 60 min mit 100 ng EGF oder ohne Zugabe von EGF bei 37°C behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 B dargestellt.

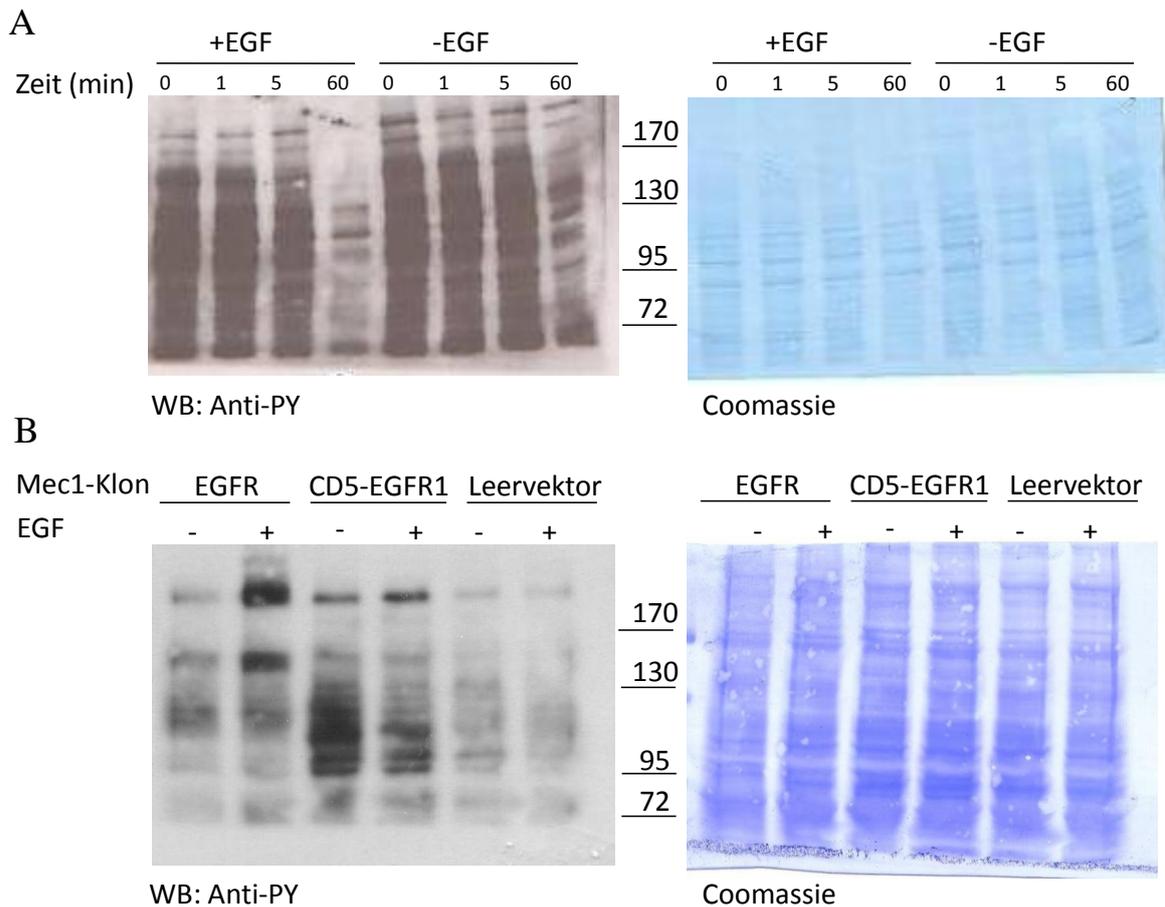


Abbildung 4.3: Zeitverlauf der Tyrosinphosphorylierung in Mec1-Klonen nach EGF-Behandlung. Die Mec1-Klone wurden 60 min mit 100 ng EGF bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen sofort lysiert oder 1 min, 5 min oder 60 min bei 37° inkubiert. Lyse in NP-40 Lyse-Puffer. Auf das Gel wurden 15 µg Protein aufgetragen. Mit Coomassie-Blau gefärbte Membran als Lade- und Transferkontrolle. Zwischen Coomassie und Anti-PY gefärbter Membran ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet (kDa). A) Mec1-Klon CD5-EGFR1 wurde für 1 min, 5 min oder 60 min bei 37°C mit 100 ng EGF inkubiert. Western Blot mit Anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10). B) Mec1-Klone EGFR, CD5-EGFR1 und Leervektor wurden für 60 min mit 100 ng EGF stimuliert. Western Blot mit Anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10).

Eine Phosphorylierung von EGFR bei 180 kDa ist nach der Stimulierung mit EGF zu erkennen. Auch bei dem Mec1-Klon CD5-EGFR1 ist bei 180 kDa eine leichte Zunahme der Phosphorylierung zu sehen. Der mit dem Leervektor transfizierte Klon trägt keine solche Phosphorylierung. Die Proteine zwischen 100-120 kDa zeigen bei Mec1-Klon CD5-EGFR1 nach EGF-Stimulierung eine Dephosphorylierung, ähnlich dem in Abbildung 4.3 A dargestellten Effekt. Eine Dephosphorylierung von Proteinen nach EGF-Stimulierung ist auch bei dem mit Leervektor transfizierten Klon zu erkennen.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass schon die alleinige Zugabe von EGF, bzw. die Durchführung der Stimulierung, einen unspezifischen Einfluss

auf Mec1-Zellen hat. Der Effekt der Stimulierung auf Mec1-Klon CD5-EGFR mit EGF ist gering, während die Aktivierung von EGFR im Mec1-Klon EGFR gut sichtbar ist. Experimente, die das globale Phosphotyrosinlevel der Zelle betrachten, wurden daher nicht weiter durchgeführt.

4.1.4 Mögliche liganden-induzierte Src-Kinase-Aktivierung in Zelllinien, die CD5-EGFR exprimieren

In Lysaten von Mec1-Zellen, die CD5-EGFR exprimieren, konnte nach Behandlung mit EGF keine eindeutige Veränderung auf Phosphotyrosinebene nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der Nachweis auf Lysatebene nicht sensitiv genug ist.

Um die Aktivierung der CD5-Domäne von CD5-EGFR spezifischer zu testen, wurde der Phosphorylierungsstatus der Src-Kinase Lck untersucht. Eine erhöhte Phosphorylierung von Lck wird nach einer Antikörperbehandlung mit Anti-CD5 in T-Zellen und CLL-Zellen beschrieben (Majolini et al., 1998). Um zu testen, ob durch die Stimulierung von CD5-EGFR durch EGF Lck in Mec1-Zellen stärker phosphoryliert wird, wurden Mec1-Klon CD5-EGFR1 und Leervektor transfizierte Zellen mit EGF stimuliert und Lck immunopräzipitiert. Anschließend wurde mittels Western Blot die Phosphorylierung des Tyrosins 416 von Src-Kinasen analysiert, da eine Phosphorylierung dieses Tyrosins eine verstärkte Aktivierung anzeigt (Hunter, 1987).

Wie in Abbildung 4.4 zu erkennen ist, ist die Phosphorylierung des Tyrosins 416 im CD5-EGFR Klon1 im nicht stimulierten Zustand insgesamt schwächer als in den mit Leervektor transfizierten Zellen. Eine Stimulation mit EGF erzielt jedoch eine Verdopplung der Phosphorylierung im Mec1-Klon CD5-EGFR1. Die EGF-Behandlung bei dem mit Leervektor transfizierten Klon zeigt keinen eindeutigen Einfluss. Hier konnten hohe Schwankungen der Phosphorylierung von Lck Tyrosin 416 festgestellt werden. Aufgrund dessen lieferte dieser Versuch kein eindeutiges Ergebnis.

Daher wurde beschlossen, einen Kinase Assay, der die Aktivität von Kinasen sensitiver erfasst, durchzuführen. In einem Kinase-Assay wird ein passendes Substrat durch eine Kinase *in vitro* phosphoryliert. Anhand der Stärke der Substratphosphorylierung nach Inkubation können Rückschlüsse auf die Aktivität der Kinase gezogen werden. Als Substrat wurde Enolase gewählt (Hausherr et al., 2007).

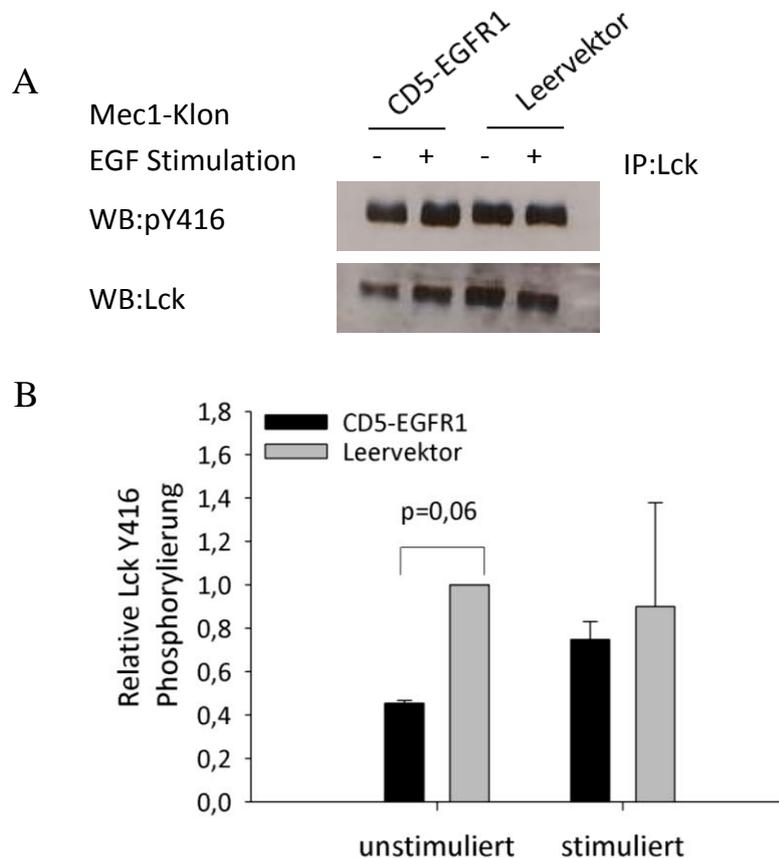


Abbildung 4.4: Die Basisphosphorylierung am aktivierenden Tyrosin ist in Mec1-Klon CD5-EGFR herabgesetzt. Mec1-Klon CD5-EGFR1 oder Leervektor wurden 30 min bei 4°C inkubiert, danach wurden 100 ng EGF zu den Zellen gegeben und für weitere 30 min inkubiert. Für die Stimulierung wurden die Zellen sofort lysiert oder 60 min bei 37°C inkubiert. Lck wurde immunopräzipitiert und auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt. A) Gefärbte PVDF-Membran mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin 416 der Src-Familie (pY416). Nach Strippen der Membran wurde mit einem Antikörper, der Lck bindet, die Quantität der immunopräzipitierten Lck ermittelt. B) Densitometrische Auswertung von zwei unabhängigen Stimulierungsexperimenten normalisiert auf mit Leervektor transfizierten, unstimulierten Mec1 Zellen.

Die Zellen wurden wie oben angegeben stimuliert und Lck immunopräzipitiert. Folgend wurde Lck mit Enolase in einem Kinase-Assay-Puffer inkubiert. Danach wurde mittels Western Blot die Phosphorylierungsstärke von Enolase und Lck quantifiziert. Um zu testen, ob die immunopräzipitierte Lck aktiv ist, wurde in einer Zeitreihe getestet, ob die Phosphorylierung der Enolase mit fortschreitender Inkubationszeit zunimmt. Dies war im Western Blot deutlich zu erkennen (Abbildung 4.5 A).

Die Quantifizierung der Phosphorylierung der Enolase durch Lck zeigt, dass in Mec1-Klon CD5-EGFR1 weniger aktive Lck vorhanden ist als in der mit Leervektor transfizierten Kontrolle. Nach EGF-Stimulierung ist weder im Mec1-Klon CD5-EGFR noch in Leervektor transfizierten Klon eine verstärkte Lck Aktivität zu detektieren (Abbildung 4.5 B und C).

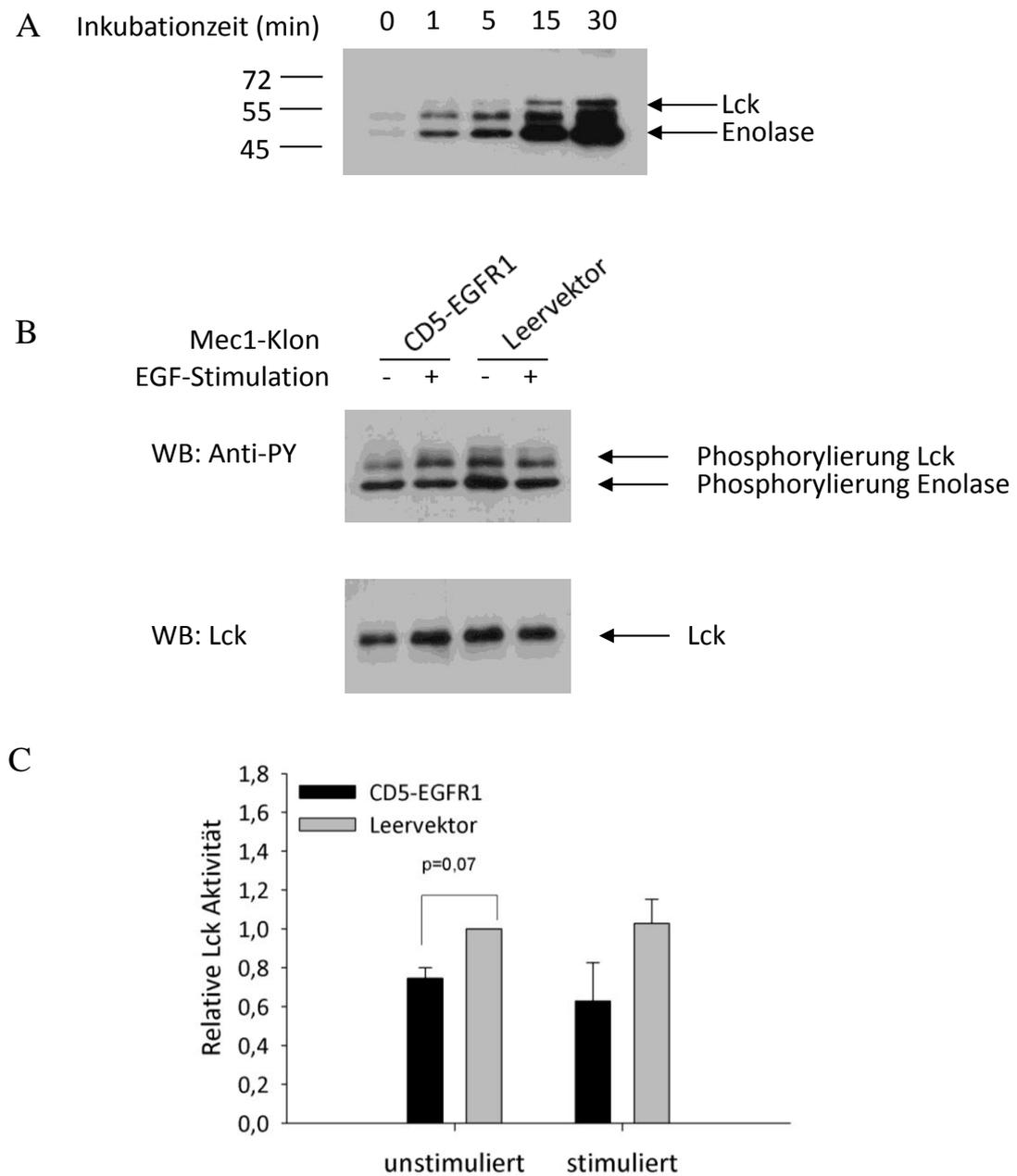


Abbildung 4.5: Die Kinaseaktivität von Lck wird durch Zugabe von EGF im Mec1-Klon CD5-EGFR1 nicht beeinflusst. Mec1-Klon CD5-EGFR1 oder Leervektor wurden mit 100 ng EGF bei 4°C 30 min inkubiert und anschließend für 60 min bei 37°C stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und mit einem Anti-Lck Antikörper immunopräzipitiert. Für den Kinase-Assay wurde Enolase als Substrat gewählt. A) Um zu testen, ob die immunopräzipitierte Lck noch funktionsfähig ist, und die Enolase phosphoryliert werden kann, wurde immunopräzipitierte Lck 0-30 min mit Enolase inkubiert. Mittels Western Blot wurde durch einen Anti-Phosphotyrosin Antikörper (PY99) die Phosphorylierung von Enolase nachgewiesen (47 kDa). B) Parallel dazu wurde ein Kinase-Assay mit EGF stimulierten Mec1-Klonen CD5-EGFR1 oder Leervektor durchgeführt. Nach Strippen der Membran wurde die Quantität der Lck-Immunopräzipitation mit einem Anti-Lck Antikörper ermittelt. C) Die Stärke der Western Blot Banden wurden densitometrisch quantifiziert und die im Western Blot ermittelte Phosphorylierung der Enolase zu der immunopräzipitierten Lck normalisiert.

Aktivitätstest und Phosphorylierungsanalyse an Tyrosin 416 zeigen übereinstimmend eine Abnahme der Lck-Aktivität bzw. Phosphorylierung am aktivierenden Phosphotyrosin in CD5-EGFR exprimierenden Mec1-Zellen. Die Kinase-Assays zeigen keine verstärkte Aktivierung von Lck nach Stimulation mit EGF. Dies steht im Gegensatz zu Phosphorylierungsanalysen an Tyrosin 416 nach Lck Immunopräzipitationen. Hier sind allerdings hohe Schwankungen in dem Kontrollexperiment nachweisbar. Da somit in beiden Experimenten keine deutlich stärkere Aktivität von Lck nach EGF-Zugabe in Mec1-Zellen zu erkennen war, wurden keine weiterführenden Experimente durchgeführt.

4.1.5 Das Wachstum von CD5-EGFR exprimierenden B-Zellen wird durch EGF-Stimulierung nicht beeinflusst

Nachdem keine Aktivierung der erwarteten Signalkaskaden nach EGF-Stimulierung zu erkennen war, wurde getestet, ob durch EGF eine Wachstumsveränderung der CD5-EGFR-positiven Klone erfolgt. Bei einem veränderten Wachstum durch EGF-Zugabe sollten noch weitere Signalkaskaden, die mit CD5 assoziiert sein könnten, untersucht werden.

Mec1 CD5-EGFR Klone wurden in 0% oder 1% FBS ausgesät und mit 0, 10 oder 100 ng EGF behandelt. In einem XTT-Assay wurde das Wachstum der Zellen bestimmt. Es wird angenommen, dass XTT proportional zum Zellwachstum reduziert wird. Die Ergebnisse für den Mec1-Klon CD5-EGFR3 sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Zugabe von 1% FBS das Zellwachstum der Mec1-Zellen erhöht. Einen Einfluss von EGF auf das Wachstum der Zellen ist jedoch nicht feststellbar.

Neben Mec1-Zellen wurde auch bei stabil transfizierten BA/F3-Zellen die Proliferation nach EGF-Zugabe untersucht. Die BA/F3-Zelllinie ist eine IL-3 abhängig wachsende Maus-Zelllinie, die aus pro-B Zellen gewonnen wurde (Palacios et al., 1984).

In Publikationen wird berichtet, dass mit EGFR stabil transfizierte BA/F3-Zellen nicht mehr nur IL-3 abhängig wachsen, sondern auch mit Zugabe von EGF proliferieren können (Riese et al., 1995). Ebenfalls konnte auf diese Weise für das Protein P200bcr-abl ein transformierender Effekt auf B-Zellen nachgewiesen werden (Daley and Baltimore, 1988).

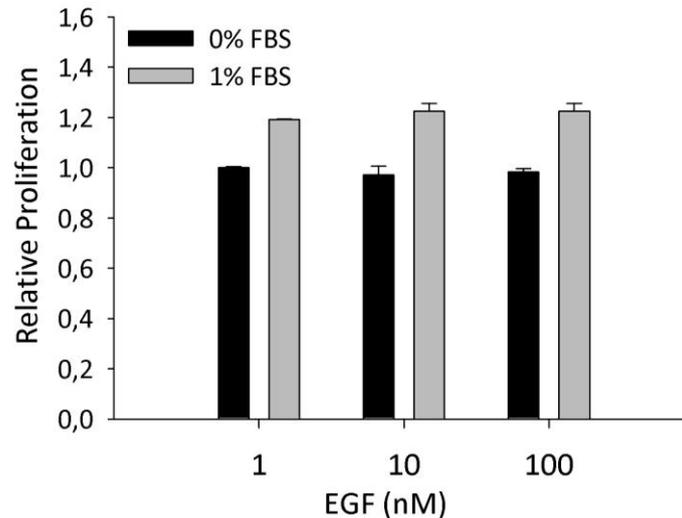


Abbildung 4.6: Die Zugabe von EGF zeigt keinen Einfluss auf das Wachstum von Mec1-Klon CD5-EGFR3. Stabil transfizierter Mec1-Klon CD5-EGFR3 wurde in 0% oder 1% FBS ausgesät. Es wurde 0 ng, 10 ng oder 100 ng EGF zu dem Medium dazugegeben. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und am darauffolgenden Tag das relative Wachstum der Zellen berechnet. Dazu wurde der XTT-Umsatz im Verhältnis zu Mec1-Klon CD5-EGFR3 in 0%FBS ohne EGF auf eins gesetzt. Die Absorption wurde bei 490 nm gemessen.

In diesem Ansatz wurde getestet, ob auch CD5-EGFR-positive Zellen EGF-abhängig wachsen können und somit ein proliferationsfördernder Effekt von CD5 nachgewiesen werden kann. BA/F3-Zellen wurden mit CD5-EGFR, CD5 und als positiv-Kontrolle EGFR stabil transfiziert. Allerdings wuchsen keine CD5-positiven BA/F3-Klone.

Wildtyp-Zellen, EGFR und CD5-EGFR stabil transfizierte BA/F3-Klone wurden ausgesät und mit IL-3 oder 100 ng EGF oder ohne jegliche Zugaben kultiviert. Die Zellzahl wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt.

Zu erkennen ist, dass alle ausgesäten BAF/3-Zellen mit IL-3 deutlich schneller wachsen. Fehlt jegliche Zugabe, zeigen Wildtyp BA/F3-Zellen kein Wachstum. Die Zugabe von EGF lässt, wie erwartet, den EGFR-positiven BA/F3-Klon langsamer, aber auch IL-3 unabhängig proliferieren. Durch Zugabe von EGF zu dem CD5-EGFR Klon lässt sich kein verändertes Wachstum erkennen (Abbildung 4.7). In diesem System lässt sich kein proliferationsfördernder Effekt von CD5 nachweisen.

Weitere Untersuchungen zur Stimulierung des CD5-EGFR durch EGF wurden nicht durchgeführt. Anschließende Experimente befassen sich mit der Stimulierung von CD5 mit Anti-CD5 Antikörpern oder dem konstitutiven Effekt von CD5.

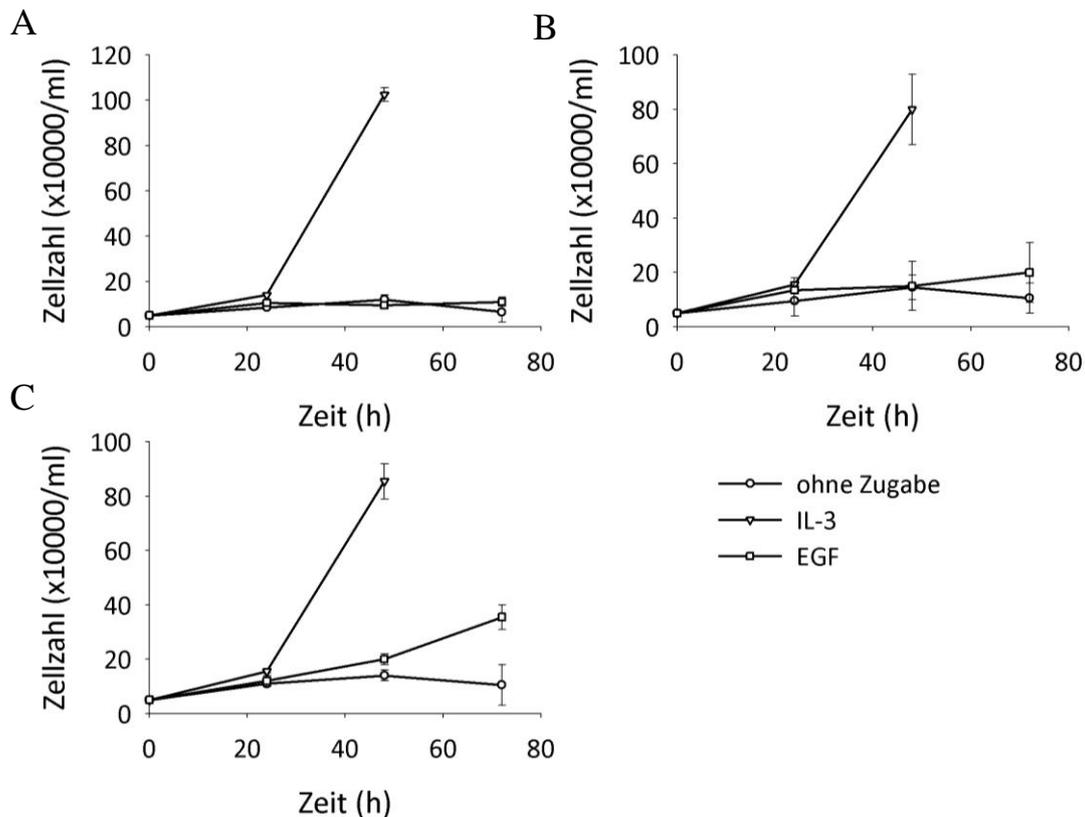


Abbildung 4.7: Die Zugabe des Liganden EGF induziert in EGFR, aber nicht CD5-EGFR transfizierten BA/F3-Zellen IL-3 unabhängiges Wachstum. Untransfizierte BA/F3-Zellen (A) oder CD5-EGFR-transfizierte (B) BA/F3-Zellen oder EGFR-transfizierte BA/F3-Zellen (C) wurden in einer Dichte von $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ausgesät. Die Zellen wurden ohne Zusatz zum Medium oder mit Zusatz von IL-3 (10 ng) oder EGF (100 ng) weiter behandelt. Die Zelldichte wurde mittels Trypan-Blau Zählung nach 24, 48 und 72 h ermittelt. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander wiederholt.

4.1.6 Einfluss von CD5 auf die Überlebensregulation durch den B-Zell-Rezeptor

Die Stimulierung des BZR auf CLL-Zellen führt häufig zu einer Veränderung ihrer Vitalität (Bernal et al., 2001; Nedellec et al., 2005; Petlickovski et al., 2005). CD5 ist als ein Korezeptor des BZR beschrieben, der die B-Zell-Aktivierung herabsetzen kann (Bikah et al., 1996; Renaudineau et al., 2005). Um herauszufinden, ob sich die Überexpression von CD5 in Mec1-Zellen negativ auf die BZR-Stimulation auswirkt, wurde getestet, ob CD5-positive Mec1-Zellen verändert auf die BZR-Stimulation reagieren.

Als Positiv-Kontrolle wurde die BZR-Stimulation auch in CLL-Zellen durchgeführt. Zunächst wurden in diesem Ansatz Mec1-Zellen über Nacht gehungert. Die Konzentration der IgM-Beads wurde analog zu Stimulierungsversuchen von Patientenzellen durchgeführt (Kofler et al., 2004; Pallasch et al., 2008).

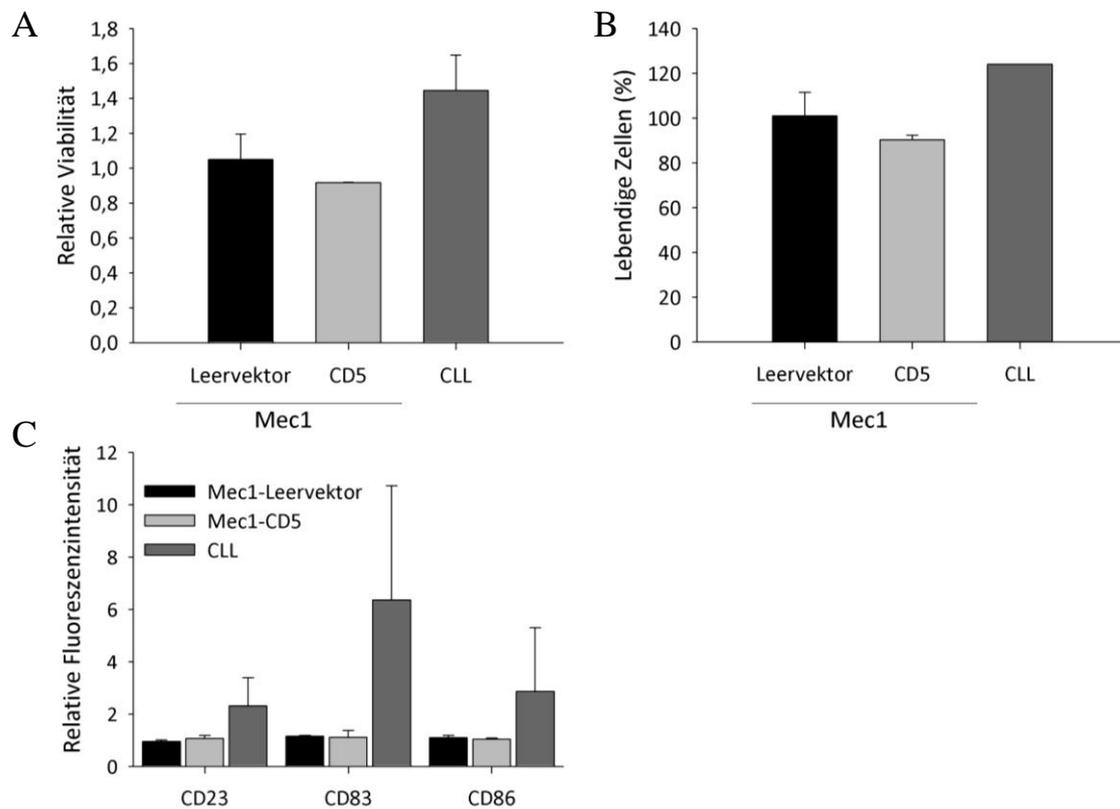


Abbildung 4.8: BZR-Stimulation führt in primären CLL-Zellen zu einem verbesserten Überleben, jedoch nicht in Mec1-Klonen. Mec1-Klone und primäre CLL-Zellen wurden mit IgM (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) oder als Kontrolle mit IgA stimuliert. Dazu wurden 2×10^5 Mec1-Zellen pro ml in Medium ohne FBS ausgesät, oder 2×10^6 Patientenzellen pro ml in Medium mit FBS. A) XTT-Assay von Mec1-Klonen (Leervektor oder CD5) und primären CLL-Zellen. Normalisiert zu IgA. B) Annexin-V-Färbung nach 24 h BZR-Stimulation, normalisiert zu IgA, bei Mec1-Klonen (CD5 oder Leervektor) und primären CLL-Zellen (Probe 9181). C) Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD23, CD83, CD86 auf Mec1-Zellen oder primären CLL-Zellen (n=2). Die durchschnittliche Fluoreszenz nach Antikörperbehandlung stimulierter Zellen wurde auf die gemessene Fluoreszenz ohne Stimulation (IgA) normalisiert.

Wie in Abbildung 4.8 gezeigt, führt die BZR-Aktivierung in Patientenzellen zu einer geringeren Apoptoserate und einer erhöhten metabolischen Aktivität. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in Mec1-Zellen beobachtet werden. Der CD5-Klon zeigt nach IgM-Behandlung eher eine leichte Verringerung der Viabilität und eine erhöhte Apoptoserate. Die mit Leervektor transfizierten Zellen reagieren nicht auf eine BZR-Stimulation.

Als Kontrolle für eine erfolgreiche BZR-Stimulation wurde ermittelt, ob die Aktivierungsmarker CD23, CD83 und CD86 an der Zelloberfläche verstärkt exprimiert wurden (Mahanonda et al., 2002; Mongini et al., 2002). Bei primären CLL-Zellen wird eine Zunahme der Proteinexpression beobachtet, bei Mec1-Zellen nicht.

Da in den Mec1-Klonen keine erfolgreiche BZR-Aktivierung gemessen werden kann, wurde die BZR-Stimulation in Mec1-Zellen nicht weiter verfolgt.

4.1.7 Patientenzellen, aber nicht CD5-positive Mec1-Zellen, zeigen eine erhöhte Viabilität nach CD5-Stimulation durch Anti-CD5 Antikörper

Bei den Stimulierungen von CD5-EGFR mit EGF in Mec1-Klonen konnten keine eindeutigen Aktivierungen von CD5-spezifischen Signalkaskaden nachgewiesen werden. Deswegen wurde versucht primäre CLL-Zellen mit Anti-CD5 Antikörper zu stimulieren und diese Stimulierungen in Mec1-Klon CD5 zu wiederholen.

In den ersten Experimenten wurden lösliche Anti-CD5 Antikörper und Beads mit gekoppelten Anti-CD5 Antikörper zur Stimulierung von primären CLL-Zellen verwendet. Es wurden mehrere Bead-Konzentrationen zur Zellzahl getestet. Als Vergleich wurden die Patientenzellen und Mec1-Zellen mit Anti-IgM Antikörper gekoppelten Beads zur BZR-Aktivierung behandelt.

Die Behandlung primärer CLL-Zellen mit löslichem Anti-CD5 Antikörper zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen (Abbildung 4.9 A). Eine Behandlung mit gekoppelten Anti-CD5 Antikörpern zeigt eine signifikant gesteigerte metabolische Aktivität von Patientenzellen im XTT-Assay. Einen Unterschied in der Stärke der metabolischen Aktivität, abhängig von der verwendeten Bead-Anzahl, lässt sich nicht erkennen.

Die Stärke der Antwort auf die mit Beads durchgeführte CD5-Stimulation schwankt zwischen den verwendeten primären CLL-Zellen (Abbildung 4.9 B). Es wurde bis zu 50% gesteigerte metabolische Aktivität gemessen. Bei manchen primären CLL-Proben ließ sich kein Einfluss auf die metabolische Aktivität durch CD5-Stimulation nachweisen.

Eine durchflusszytometrisch Analyse der Zellen war nicht möglich, da die Beads das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht der CLL-Zellen verändern. Ebenfalls lässt sich eine gesteigerte metabolische Aktivität auch nach BZR-Stimulation mit gekoppelten Anti-IgM Antikörpern nachweisen. Der Effekt der BZR-Stimulation ist stärker als der Effekt der CD5-Stimulation. Auch der Mec1-Klon CD5 wurde mit Anti-CD5 Antikörpern gekoppelten Beads stimuliert. Hier war kein Einfluss auf die Viabilität der Zellen erkennbar (Abbildung 6.9 B).

Ein weiteres Experiment bestand darin, die Assoziation von der Phosphatase SHP1 mit CD5 zu untersuchen. Eine konstitutive Assoziation von SHP1 mit CD5 wurde mit einer fehlenden Stimulierbarkeit von CD5 in Zusammenhang gebracht (Renaudineau et al., 2005).

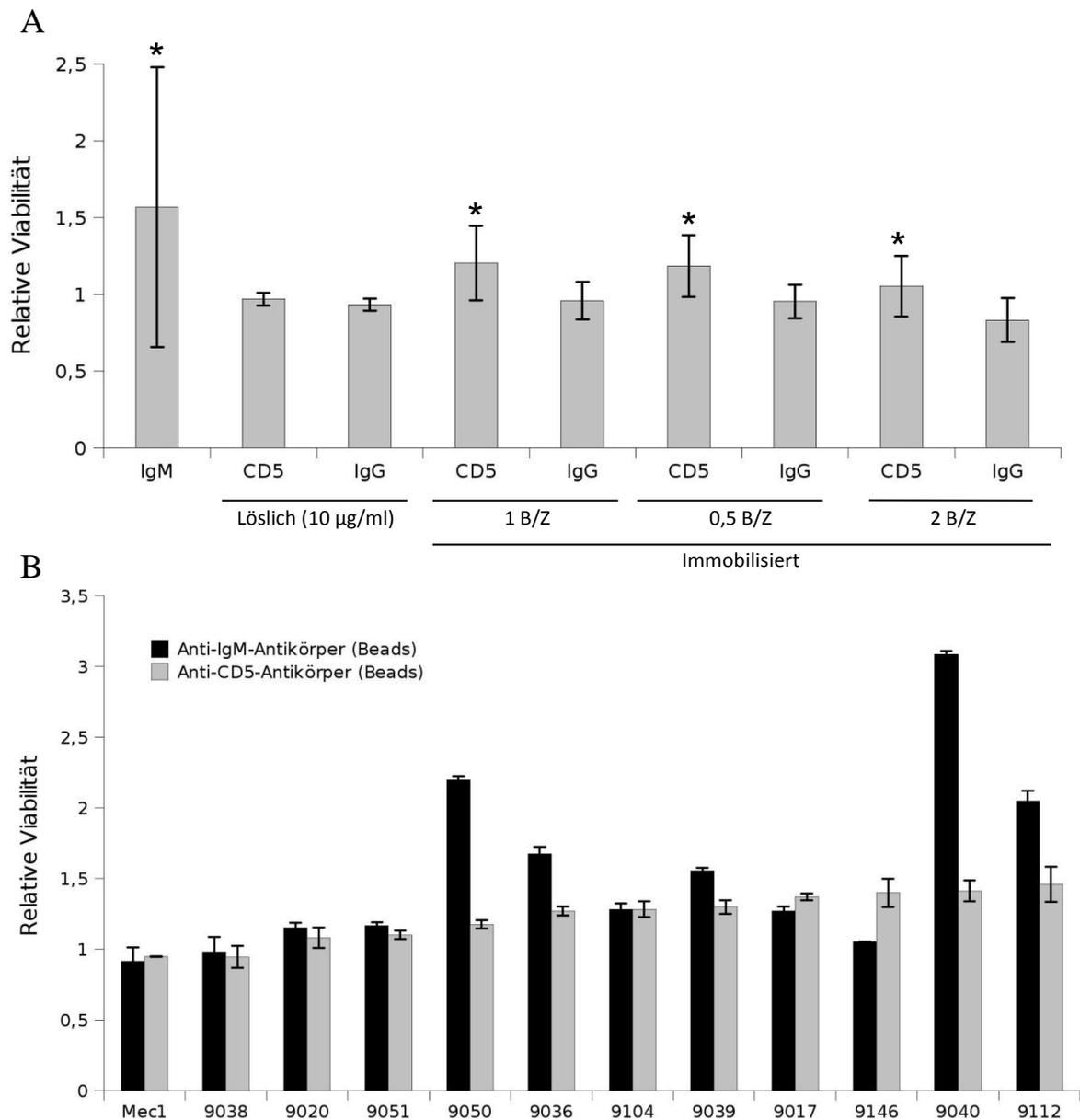


Abbildung 4.9: Stimulationen mit Anti-CD5 Antikörpern können in primären CLL-Zellen zu einer verstärkten Viabilität führen. A) Primäre CLL-Zellen wurden mit gekoppelten Anti-IgM ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) Antikörpern an Beads oder mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ löslichem Anti-CD5 Antikörper (als Kontrolle IgG) oder unterschiedlichen Bead-Konzentrationen mit gekoppelten Anti-CD5 Antikörpern (als Kontrolle gekoppeltes IgG) behandelt. Es wurden entweder ein, zwei oder ein halbes Bead pro Zelle (B/Z) dem Ansatz hinzugefügt. In einem XTT-Assay wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Die Werte wurden zu unbehandelten Zellen normalisiert. Statistisch signifikante Stimulierungen wurden mit * markiert ($p < 0,05$). B) Relative Viabilitätsveränderungen von CLL-Zellen einzelner Patienten nach Zugabe von immobilisierten Anti-CD5 Antikörpern (ein halbes Bead pro Zelle) oder immobilisierten Anti-IgM Antikörpern. Die Patienten sind durchnummeriert. Die Werte wurden zu unbehandelten Zellen normalisiert.

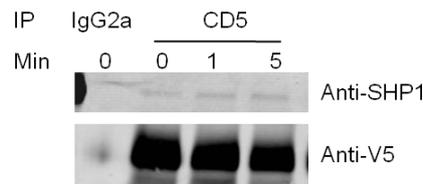


Abbildung 4.10: SHP1 ist konstitutiv mit CD5 assoziiert. Mec1-Zellen wurden mit gekoppelten Anti-CD5 Antikörpern (ein halbes Bead pro Zelle) für ein, zwei und fünf Minuten stimuliert. Die Zellen wurden mit Brij Lyse-Puffer lysiert. Aus 1 mg Lysat wurde CD5 immunopräzipitiert. Als Kontrolle wurde mit IgG2a immunopräzipitiert. Mit Anti-SHP1 Antikörper kann eine Assoziation von SHP1 an CD5 im Western Blot nachgewiesen werden. Der Western Blot wurde ebenfalls mit Anti-V5 Antikörper behandelt und so CD5 nachgewiesen

Aus diesem Grund wurden Immunopräzipitationen von CD5 auf Coimmunopräzipitation von SHP1 nach Stimulierung von CD5 in Mec1-Klon CD5 untersucht. Wie in Abbildung 4.10 gezeigt, lässt sich im Western Blot eine Assoziation von SHP1 mit CD5 auch ohne Stimulation von CD5 nachweisen. In der Negativ-Kontrolle lässt sich SHP1 nicht detektieren.

Die Effekte der CD5-Stimulierung in CLL-Zellen wurden als unbedeutend im Vergleich zur IgM-Stimulation eingestuft. Die Stimulationsversuche wurden aus diesem Grund nicht weiter verfolgt. Da in den Mec1-Zellen Hinweise auf eine unzureichende Stimulierbarkeit von CD5 zu finden sind, wurde auch an CD5-Stimulierungen in Mec1-Zellen nicht weiter gearbeitet.

4.1.8 Die cytoplasmatische Domäne ist bei Expression von CD5 in Mec1-Zellen konstitutiv phosphoryliert

Physiologisch relevante Effekte einer Signalkaskade, die durch Dimerisierung von CD5 ausgelöst werden, wurden in dem vorliegenden Modellsystem nicht festgestellt. Deswegen wurden die konstitutiven Effekte der CD5-Expression beobachtet. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse hierzu beschrieben.

Die cytoplasmatische Domäne von CD5 besitzt mehrere Tyrosine, die potentiell phosphorylierbar sind. In T-Zellen kann gezeigt werden, dass CD5 durch TZR-Stimulierung an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Durch die neu entstandenen Bindestellen können Proteine rekrutiert werden (Vila et al., 2001). In CLL-Zellen wird eine andauernde Tyrosinphosphorylierung von CD5 beschrieben (Gary-Gouy et al., 2007; Renaudineau et al., 2005). Es ist zu vermuten, dass durch eine konstitutive Phosphorylie-

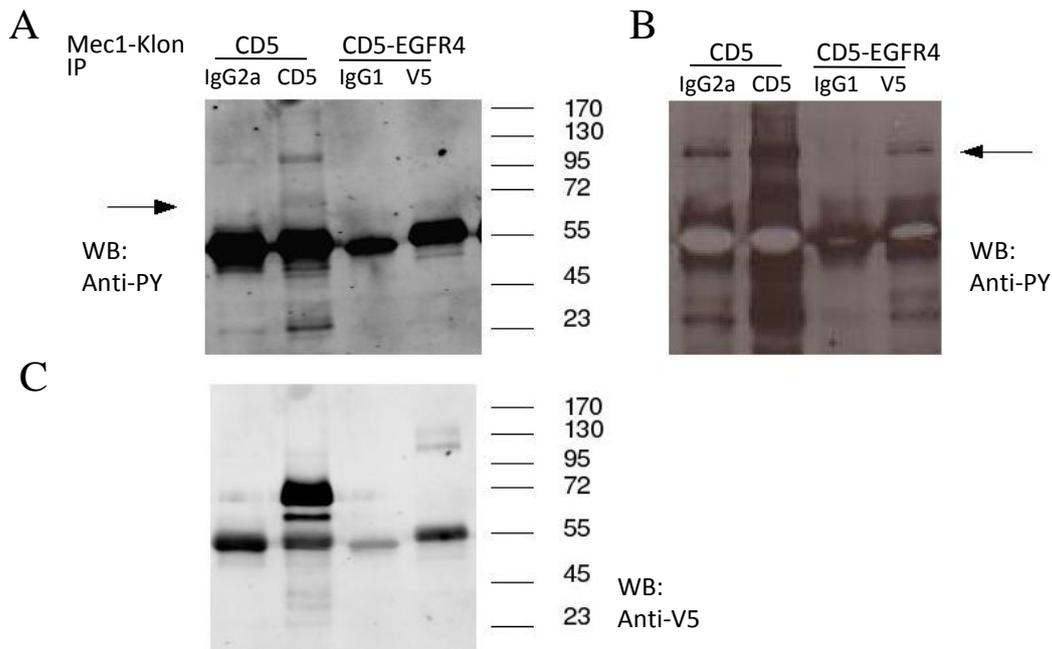


Abbildung 4.11: CD5 ist in Mec1-Klonen phosphoryliert. A) Unstimulierte Mec1-Klone CD5 und CD5-EGFR (Klon4) wurden lysiert. Mit Anti-CD5 Antikörper bzw. mit Anti-V5 Antikörper (Tag am C-Terminus von CD5-EGFR) wurde aus 1 mg Proteinlysate CD5 bzw. CD5-EGFR immunopräzipitiert. Als Isotyp-Kontrollen dienten zur Immunopräzipitation IgG2A-Antikörper oder IgG1-Antikörper. Die komplette Immunopräzipitation wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western Blot mit Anti-Phosphotyrosin Antikörper (Anti-PY, PY99) durchgeführt. Die Membran wurde gestrippt und mit V5-Antikörper behandelt. A) Der Pfeil zeigt die Phosphorylierung von CD5. Rechts von dem Bild ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet (kDa). B) Phosphorylierung von CD5-EGFR (Pfeil) nach einer längeren Exposition. C) Nach Strippen der Membran und erneutem Färben mit Anti-V5 Antikörper wird CD5 bei ca. 68 kDa sichtbar, bzw CD5-EGFR bei ca. 120 kDa.

CD5-induzierte Signalkaskaden dauerhaft angeschaltet sind. Dies könnte zu Unterschieden in der globalen Phosphorylierung und Proteinexpression in CD5-positiven Zellen führen. Aus diesem Grund wurde in CD5-positiven Mec1-Klonen (CD5-Klon und CD5-EGFR4) der Phosphorylierungsstatus von CD5 erfasst

Um zu testen, ob CD5 in Mec1-Zellen tyrosinphosphoryliert ist, wurden CD5-positive Mec1-Klone CD5 und CD5-EGFR4 lysiert und CD5 immunopräzipitiert. Nach einer Immunopräzipitation ist mittels Western Blot eine schwache Tyrosinphosphorylierung von CD5 (68 kDa) zu erkennen (Abbildung 4.11). Parallel hierzu werden noch Coimmunopräzipitationen von einem ca. 120 kDa großem Protein und 23 kDa großem Protein sichtbar. Bei einer längeren Exposition sind allerdings auch in der Negativ-Kontrolle Banden auf dieser Höhe zu erkennen. Auch eine Phosphorylierung von CD5-EGFR kann nach einer längeren Exposition bei 110 kDa nachgewiesen werden. In der dazugehörigen Negativ-Kontrolle ist keine Phosphorylierung detektierbar. Nach Strippen

der Membran und erneuter Behandlung mit Anti-V5 Antikörper lässt sich CD5 bei einer Höhe von ca. 68 kDa nachweisen. CD5-EGFR lässt sich wesentlich schwächer, bei ca. 120 kDa detektieren.

In den hier gezeigten Experimenten kann also gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne von CD5 in Mec1-Klonen tyrosinphosphoryliert wird. Damit sind für Kinasen und Phosphatasen Voraussetzungen geschaffen, an CD5 zu binden und die Signaltransduktion von Mec1-Zellen zu beeinflussen.

4.1.9 Charakterisierung CD5-positiver und -negativer Zelllinien auf Proteinebene

Da die konstitutive Phosphorylierung von CD5 einen Einfluss auf die Signaltransduktion in CD5-positiven Zellen haben könnte, wurde auf Lysatebene nach Unterschieden auf Phosphotyrosin- und Proteinebene zwischen CD5-positiven und -negativen Zellen gesucht. Auf Proteinebene wurde das molekulare Umfeld von CD5, also Src-Kinasen und SHP1 betrachtet. PKC ist in der Signaltransduktion von CD5-vermittelten Signalkaskaden involviert (Perez-Chacon et al., 2007a). Weiterhin wurde die Expression von BCL2 betrachtet, da in CD5-positiven Daudi-Zellen eine erhöhte mRNA-Expression von BCL2 gemessen wurde.

Um eine allgemeingültige Aussage über die Auswirkungen von CD5 machen zu können, wurden mehrere stabil transfizierte CD5-positive Zelllinien getestet. Es wurden die Zelllinien Mec1, JVM3, ebenfalls eine CLL-ähnliche Zelllinie, und Daudi, eine aus einem Burkitt-Lymphom gewonnene Zelllinie, benutzt. Mittels Western Blot wurde die globale Tyrosinphosphorylierung und auch die spezifische Phosphorylierung des Tyrosins 416 von Src-Kinasen zwischen CD5-positiven und -negativen Zelllinien verglichen.

Betrachtet man in den Klonen die Tyrosinphosphorylierung im Western Blot auf Lysatebene, so zeigt sich keine einheitliche Veränderung des Musters zwischen stabil transfizierten Mec1-, Daudi- und JVM3-Zellen (Abbildung 4.12 A). Auffällig ist eine verstärkte Phosphorylierung der Mec1 Wildtyp-Zellen bei einer Größe von ca. 95 kDa. Da diese Phosphorylierung nicht bei CD5-negativen Daudi-Zellen oder JVM3-Zellen zu beobachten ist, scheint sie nicht spezifisch durch CD5 reguliert zu werden.

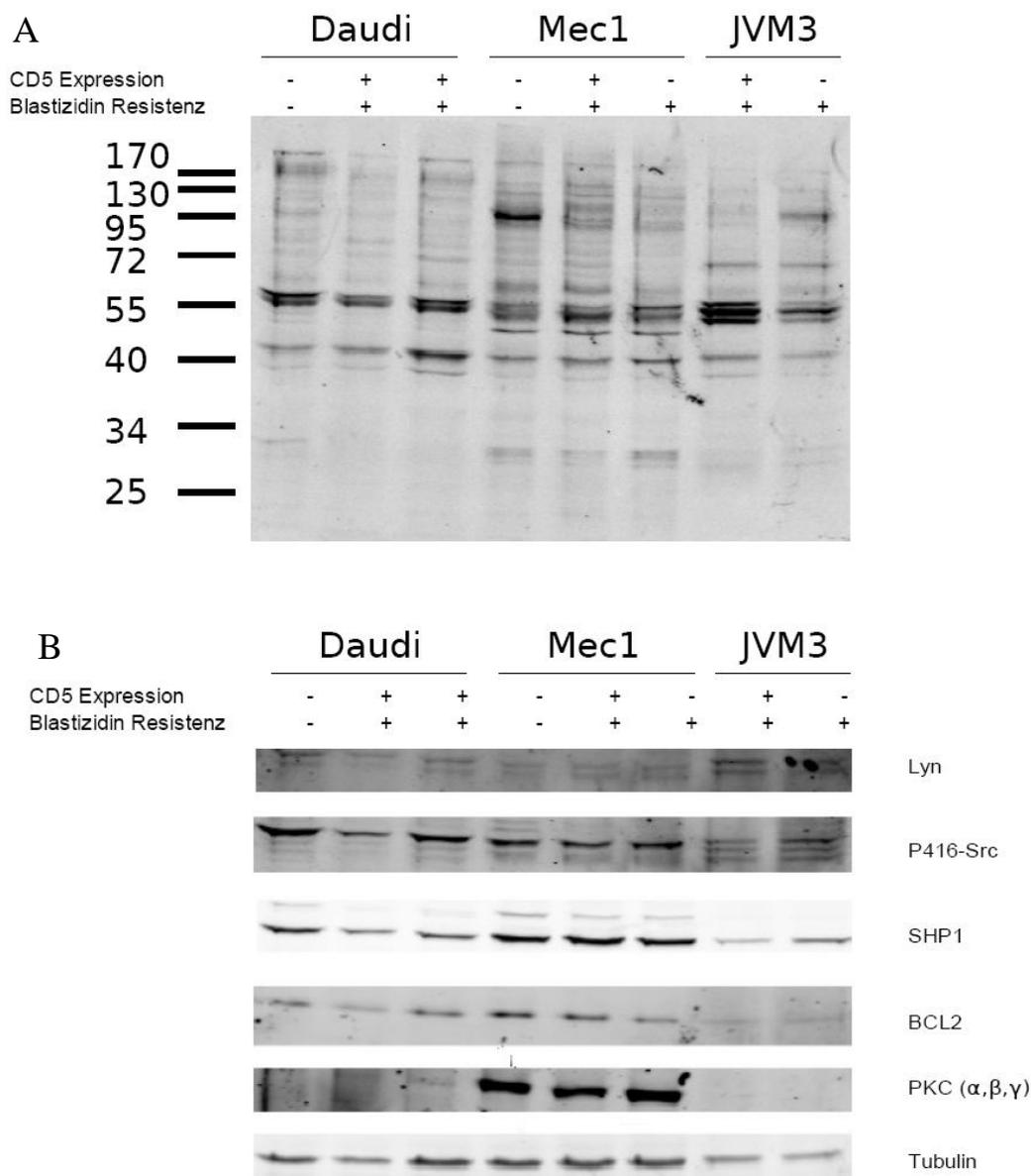


Abbildung 4.12: Charakterisierung CD5-positiver und -negativer Zelllinien auf Lysat-Ebene. A) Unstimulierte JVM3- (Wildtyp und CD5-positiv), Mec1- (Wildtyp, Leervektor- und CD5-Klon) und Daudi- (Wildtyp und zwei CD5-Klone) Zelllinien wurden lysiert. Mittels Western Blot wurde das Phosphotyrosinlevel auf Lysatebene betrachtet (PY99). B) Die gleichen Proben wurden auch mit Anti-Src Phosphotyrosin 416 Antikörper (P416-Src) entwickelt. Nach Strippen der Membran wurden diese noch mit Antikörpern gegen Lyn, BCL2, PKC (α,β,γ), SHP1 und Tubulin als Kontrolle gefärbt. Die stabilen Klone besitzen eine Resistenz gegen Blastizidin.

Auffällig ist in diesem Western Blot die verstärkte Phosphorylierung auf der Höhe der Src-Kinasen in CD5-positiven JVM3-Zellen (Abbildung 4.12 A). Diese verstärkte Phosphorylierung ist nicht in CD5-positiven Mec1- oder Daudi-Zellen zu erkennen. Betrachtet man die verstärkte Phosphorylierung der Src-Kinasen am Tyrosin 416 in JVM3-Zellen, so ist kein Unterschied zwischen den Klonen nachweisbar (Abbildung 4.12 B).

Die verstärkte Phosphorylierung der Src-Kinasen in CD5-positiven JVM3-Zellen scheint demnach nicht das Resultat einer Phosphorylierung des Tyrosins 416 zu sein.

Auf Proteinebene lässt sich für SHP1 und BCL2 keine Änderungen in der Proteinexpression feststellen (Abbildung 4.12 B). Die Src-Kinase Lyn wird in allen Zelllinien nur wenig exprimiert. Eine leichte Reduktion von PKC (α,β,γ) ist in den CD5-positiven Mec1-Klon erkennen. In Daudi-Zellen und den JVM3-Zellen kann keine PKC (α,β,γ)-Expression detektiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass auf Phosphotyrosinebene kein einheitlicher Unterschied zwischen CD5-positiven und CD5-negativen Zelllinien detektierbar ist. Auf Proteinebene könnte die Expression von PKC (α,β,γ) in CD5-positiven Zellen verändert sein. Im nächsten Schritt wurde getestet, ob alle Mec1-Zellen, die die cytoplasmatische Domäne von CD5 exprimieren, eine verringerte PKC (α,β,γ)-Expression zeigen.

4.1.10 Verminderte Proteinexpression der klassischen PKC-Isoformen in CD5-positiven Mec1-Zellen

Aufbauend auf die in Abschnitt 4.1.9 dargestellten Ergebnisse wurde die Expression von PKC (α,β,γ) im Western Blot bei allen Mec1-Klonen bestimmt. Dabei werden die Klone, die kein CD5 exprimieren, mit Klonen, die mindestens die cytoplasmatische Domäne von CD5 exprimieren, verglichen. Diese werden folgend als CD5-positiv bezeichnet.

Wie in Abbildung 4.13 gezeigt, zeigen CD5-positive Mec1-Zellen im Vergleich zu CD5-negativen Mec1-Zellen eine verringerte Expression von PKC (α,β,γ). Die Expression von PKC (α,β,γ) wurde in zwei unabhängigen Experimenten quantifiziert und mit der Expression von Tubulin normalisiert. Die Mec1-Klone CD5-EGFR1-4 und CD5 zeigen eine bis zu siebenmal geringere PKC (α,β,γ)-Expression als die Wildtyp Mec1-Zellen, bzw. die mit EGFR oder mit Leervektor transfizierten Mec1-Zellen. CD5-positive Klone und CD5-negative Klone wurden in Gruppen aufgeteilt und in einem Box Plot dargestellt. Es zeigt sich, dass die CD5-positiven Zellen im Mittel viermal weniger PKC (α,β,γ) exprimieren als die CD5-negativen Klone ($p=0,001$; siehe Abbildung 4.13 C).

4.1.11 CD5-positive Zelllinien exprimieren weniger PKC α mRNA

Da in Mec1-Klonen die Expression von CD5 einen negativen Einfluss auf die Proteinexpression von PKC (α,β,γ) hat, sollte dieses Ergebnis auch auf mRNA-Ebene mit-

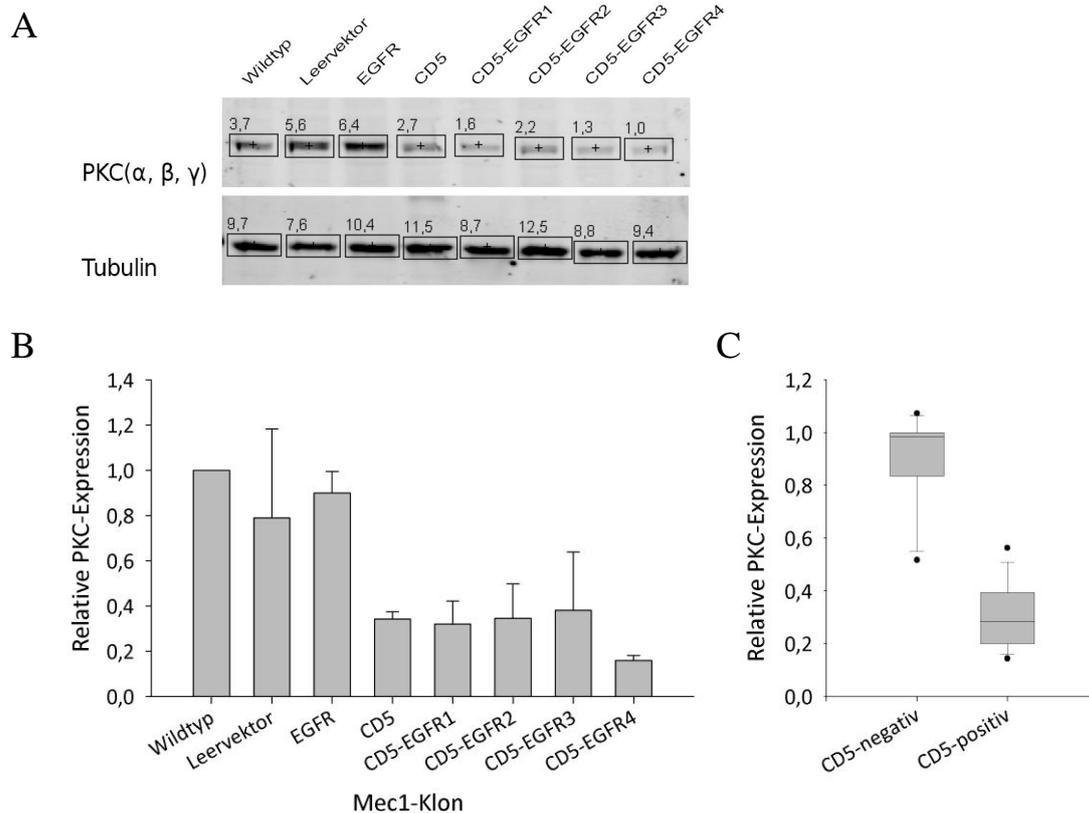


Abbildung 4.13: Die Expression der klassischen PKC-Isoformen ist in CD5-positiven Mec1-Zellen herabgesetzt. A) Unstimulierte Mec1-Klone wurden lysiert und auf ein SDS-Gel geladen. Der Western Blot wurde mit einem Anti-PKC (α, β, γ) Antikörper durchgeführt. Als Ladekontrolle diente Tubulin. B) Quantifizierung zweier unabhängiger Experimente. Normalisiert wurde zu Leervektor transfizierten Zellen. Die Quantifizierung wurde mit dem Odyssey-Imager durchgeführt. C) Die Quantifizierung von zwei unabhängigen Ergebnissen wurde nach CD5-positiven ($n=10$) und CD5-negativen ($n=6$) Zellen gruppiert und das Ergebnis im Box Plot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde in einem T-Test ermittelt ($p=0,001$).

tels Real-Time PCR (RT-PCR) betrachtet werden. Auf Western Blot Ebene war eine Unterscheidung mit den benutzten Antikörpern für die PKC Isoformen α , β und γ nicht möglich. Aus diesem Grund wurden auf mRNA-Ebene die Isoformen einzeln betrachtet. Da in Publikationen zwischen PKC α - und CD5-Expression ein Zusammenhang beschrieben wird, wurde zuerst die mRNA-Expression von PKC α untersucht (Nakagawa et al., 2006).

Die Ergebnisse der Real-Time PCR zeigen für die CD5-positiven Mec1-Klone eine niedrigere Expression von PKC α mRNA als die CD5-negativen Klone (Abbildung 4.14 A). Das Expressionslevel der PKC α mRNA in CD5-negativen Zellen variiert um das 2,5-fache. Die geringste Expression von PKC α mRNA in den CD5-negativen Zellen wird in den

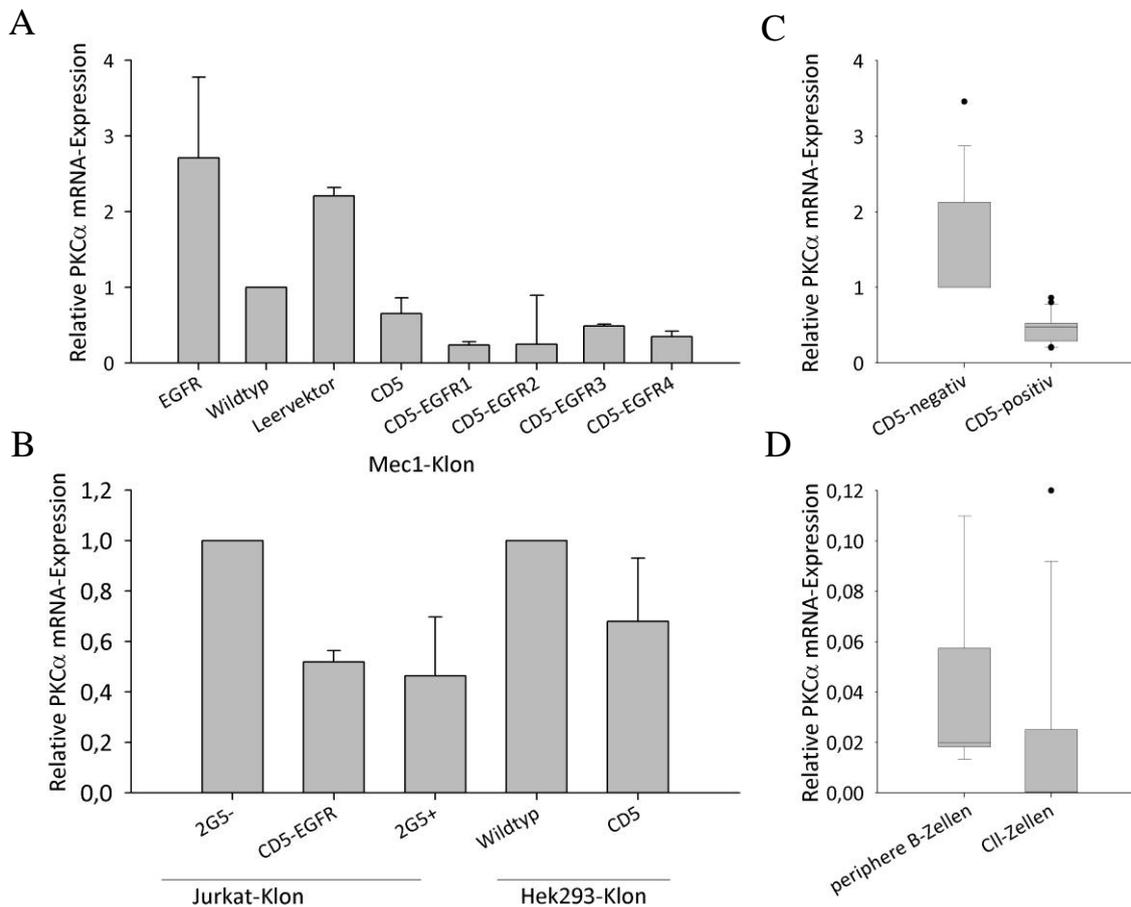


Abbildung 4.14: Das PKC α mRNA-Level ist in CD5-transfizierten Zelllinien herunterreguliert. A) Mittels quantitativer RT-PCR wurde die Expressionsrate von PKC α mRNA in Mec1-Klonen (CD5, CD5-EGFR, EGFR, Leervektor, Wildtyp), Jurkat-Klonen (CD5-negativ (2G5-), CD5-positiv (2G5+), CD5-EGFR), Hek293-Klonen (CD5, Wildtyp), peripheren B-Zellen aus Blut gesunder Probanden und CLL-Zellen quantifiziert. Dabei wurde die PKC α mRNA-Expression jedes Klon relativ zur B2M mRNA-Expression ausgedrückt und auf die Expressionsmenge von PKC α in Wildtyp (Jurkat:2G5-) normiert. Der Mittelwert und die Standardabweichungen wurden von zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. A) Relative PKC α mRNA-Expression in Mec1-Zellen. B) Relative PKC α mRNA-Expression in Hek293- und Jurkat-Zellen. C) CD5-positive und CD5-negative Klone wurden in Gruppen sortiert in einem Box Plot dargestellt (T-Test, $p=6 \times 10^{-5}$). D) Vergleich ($p=0,18$) der PKC α mRNA-Expression zwischen peripheren B-Zellen gesunder Probanden ($n=5$) und CLL-Zellen ($n=12$).

Wildtyp Mec1-Zellen gefunden. Das Expressionslevel ist in diesem Fall allerdings immer noch höher als das in den CD5-positiven Zellen.

Um zu testen, ob die verringerte Expression von PKC α durch eine Expression von CD5 nur in Mec1-Zellen in einem Zusammenhang steht, wurden noch weitere CD5-positive und -negative Zelllinien auf ihre PKC α mRNA-Expression untersucht. Verfügbar waren CD5-positive und -negative Hek293-Zellen, eine Zelllinie aus menschlichem Nierenepithel-Zellen, JVM3- und Daudi- Zellen. Ebenfalls zur Verfügung standen eine modifizierte

Jurkat-Zelllinie (2G5), gewonnen aus einer humanen T-Zell Leukämie (Schneider et al., 1977). Jurkat-Zellen sind normalerweise als T-Zellen CD5-positiv. CD5-negative Jurkat-Klone (2G5-) wurden durch Zell-Sortierung aus Jurkat-Zellen (Klon JE6.1) selektiert (Simarro et al., 1997). In diese Zellen wurde CD5 wieder stabil hineintransfiziert (2G5+). In der AG Krause wurden diese Zellen ebenfalls mit CD5-EGFR stabil transfiziert.

In Daudi- und JVM3-Zellen ist keine PKC α mRNA nachweisbar. In Hek293- und Jurkat-Zellen zeigt sich wie in Mec1-Zellen eine geringere Expression von PKC α mRNA in CD5-positiven Zellen (Abbildung 4.14 B). Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Versuchen erhalten.

Die CD5-positiven und -negativen Zelllinien wurden in zwei Gruppen zusammengefasst und relativ zu den mit Leervektor transfizierten Zellen normalisiert. Die Ergebnisse wurden in einem Box Plot dargestellt (Abbildung 4.14 C). Die Menge an PKC α ist in den CD5-negativen Zellen im Durchschnitt auf ungefähr die Hälfte reduziert ($p=6\times 10^{-5}$).

Ebenfalls wurde die Menge an PKC α mRNA in CLL-Zellen, die CD5 exprimieren, und in gesunden peripheren B-Zellen, die keine Expression von CD5 aufweisen, ermittelt. Hier zeigt sich, dass bei sechs von zwölf Patienten gar keine Expression von PKC α nachweisbar ist. Jedoch ist bei manchen primären CLL-Zellen die PKC α -Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Somit ist kein signifikanter Unterschied der PKC α mRNA-Expression zwischen CLL-Patienten und gesunden B-Zellen zu erkennen ($p=0,18$, siehe Abbildung 4.14 D).

Die Ergebnisse zeigen, dass in CD5-positiven Zelllinien eine verringerte Expression von PKC α mRNA nachweisbar ist. In primären CLL-Zellen zeigt sich im Vergleich zu peripheren B-Zellen keine signifikant geringere Expression von PKC α .

4.1.12 Die Expression von IL-10 mRNA wird nicht durch CD5-Expression reguliert

Die Expression von PKC α mRNA ist in CD5-positiven Zelllinien herabgesetzt. In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die IL-10 mRNA-Expression durch eine CD5-Expression beeinflusst wird. IL-10 hat Einfluss auf das Überleben von B-Zellen (Itoh and Hirohata, 1995). Ein Zusammenhang zwischen CD5-Expression und IL-10-Expression könnte einen Hinweis auf die Funktion von CD5 in der Proliferation von CLL-Zellen geben. In der Literatur sind Zusammenhänge in der IL-10-Expression, der CD5-Expression

und der PKC α -Expression beschrieben (Gary-Gouy et al., 2002; Ohkusu et al., 1997). Weswegen eine Regulation von IL-10 durch CD5 wahrscheinlich ist.

Daher wurde getestet, ob in den verfügbaren Zelllinien ebenfalls ein Zusammenhang zwischen CD5-Expression und IL-10-Expression gefunden werden kann. Für diesen Ansatz wurde die IL-10 mRNA-Expression aller verfügbaren CD5-positiven mit dem entsprechenden CD5-negativen Klone bestimmt und verglichen. Die IL-10 mRNA-Expression wurde auch in CLL-Zellen und peripheren B-Zellen gesunder Probanden bestimmt.

Die IL-10 mRNA-Expression liegen in Jurkat- und in Hek293-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze. Bei Mec1-Klonen zeigt sich, dass die Expression der IL-10 mRNA in den CD5-positiven und -negativen Zellen stark schwankt (Abbildung 4.15 A). Die stärkste IL-10 mRNA-Expression wurde bei Klon CD5-EGFR1 ermittelt, während die niedrigste IL-10 mRNA-Expression in dem Mec1-Klon CD5 zu finden ist, einem ebenfalls CD5-positiven Klon. In den Mec1-Klonen zeigt sich also kein einheitlicher Zusammenhang zwischen der IL-10 Produktion und CD5-Expression.

In den Daudi-Zellen zeigt sich eine gesteigerte IL-10 Produktion in den CD5-positiven Klon, während in den CD5-positiven JVM3-Zellen eine geringere IL-10 mRNA-Expression zu erkennen ist (Abbildung 4.15 B). In Daudi- und JVM3-Zellen wird möglicherweise die Menge an IL-10 durch das Vorhandensein von CD5 einheitlich reguliert, jedoch kann keine allgemeine Aussage getroffen werden. In diesen beiden Zelllinien müssten noch weitere CD5-positive Klone auf ihre IL-10 Produktionen getestet werden, um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse nicht von Klon zu Klon variieren.

Weiterhin wurde die IL-10 mRNA-Expression auch in peripheren B-Zellen und in CLL-Zellen bestimmt. Hier ist auffällig, dass eine signifikant stärkere IL-10 mRNA-Expression in den peripheren B-Zellen zu finden ist ($p=9\times 10^{-6}$; siehe Abbildung 4.15 C).

Die hier dargestellten Ergebnisse verschiedener B-Zell-Lymphom-Zelllinien zeigen keinen einheitlichen Zusammenhang zwischen IL-10 mRNA-Expression und der Expression des intrazellulären Teils von CD5. Ein Zusammenhang zwischen der IL-10-Expression und der Pathogenese der CLL könnte dennoch bestehen.

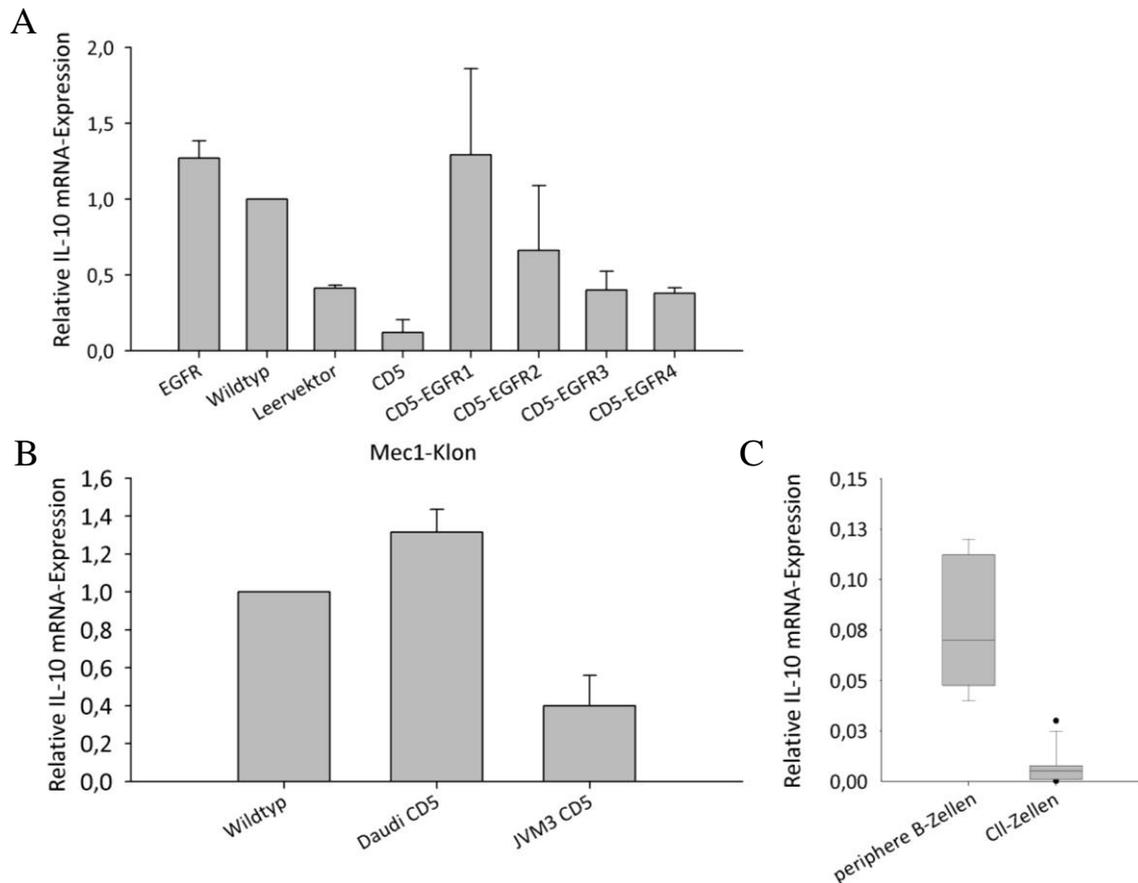


Abbildung 4.15: Die Expression von CD5 zeigt keinen einheitlichen Einfluss auf die IL-10 mRNA Expression. Von Mec1-Klonen (CD5, CD5-EGFR, EGFR, Leervektor, Wildtyp), Daudi-Klonen (Wildtyp, CD5-positiv), JVM3-Klonen (CD5, Wildtyp), B-Zellen gesunder Probanden und CLL-Zellen wurde mRNA gewonnen. Mittels RT-PCR wurde IL-10 mRNA und als Kontrolle B2M mRNA quantifiziert. Die Ergebnisse wurden zum Wildtyp normalisiert. Der Mittelwert sowie die Standardabweichungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. A) Relative Expression von IL-10 mRNA in Mec1-Zellen. B) Relative IL-10 mRNA-Expression in Daudi- und JVM3-Zellen, normalisiert zum Wildtyp. C) Die Expression von IL-10 mRNA wurde in gesunden B-Zellen (n=5) und in CLL-Zellen (n=11) quantifiziert. Mit dem Wilcoxon-Rangsummen Test zeigt sich, dass periphere B-Zellen mehr IL-10 produzieren als CLL-Zellen ($p=9 \times 10^{-6}$).

4.1.13 CD5-positive Mec1-Zellen zeigen eine verringerte Viabilität

Der direkte Einfluss der CD5-Expression auf das Wachstumsverhalten in B-Zellen wurde bisher noch nicht untersucht. Es sollte getestet werden, ob CD5-Expression zu einer Veränderung der Proliferation führen kann. Für diesen Versuch wurden XTT-Assays durchgeführt. In diesem Assay wird die metabolische Aktivität der Zelle bestimmt, die proportional zur Zellzahl zunimmt. Zur Verifizierung wurde die Proliferation von Mec1-Klon CD5 und Leervektor bestimmt.

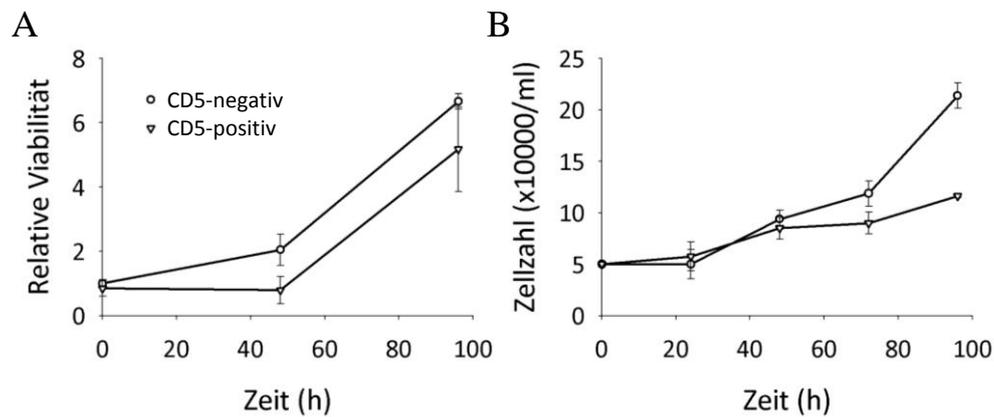


Abbildung 4.16: Die CD5-Expression zeigt einen Einfluss auf die metabolische Aktivität in Mec1-Zellen. A) CD5-positive und -negative Mec1-Zellen wurden in einer Dichte von $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ausgesät. Nach 0 h, 48 h und 96 h wurde ein XTT-Assay durchgeführt. Die XTT-Reduktion von drei unabhängigen Experimenten wurde colorimetrisch gemessen. Die Ergebnisse wurden in CD5-positiv (CD5-EGFR Klone 1-4, CD5 Klon) und CD5-negativ (Mec1 Wildtyp-Zellen, Leervektor-transfiziert und EGFR-transfiziert) eingeteilt. Hiervon wurde die Standardabweichungen berechnet und ein Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt ($p=0,041$). Die Viabilität wurde relativ zu CD5-negativ 0 h dargestellt. B) Um das Experiment zu bestätigen wurden die Mec1-Klone Leervektor und CD5 in einer Dichte von $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ausgesät und täglich die Gesamtzellzahl bestimmt.

Wie in Abbildung 4.16 dargestellt, wurden Mec1 Wildtyp-Zellen, Mec1-Klone CD5-EGFR (1-4), CD5, Leervektor und EGFR ausgesät und ein XTT-Assay nach 0 h, 48 h und 96 h durchgeführt. Zur Darstellung wurden CD5-positive und -negative Mec1-Klone zusammengefasst. Zu Versuchsbeginn ist kaum ein Unterschied in der metabolischen Aktivität zwischen den einzelnen Klonen detektierbar. Nach 48 h ist eine gesteigerte metabolische Aktivität bei den CD5-negativen Zellen zu erkennen, während die CD5-positiven Klone dieselbe metabolische Aktivität wie zu Versuchsbeginn zeigen. Nach 96 h zeigt sich auch eine Steigerung der metabolischen Aktivität der CD5-positiven Klone. Diese ist in CD5-negativen Zellen aber immer noch signifikant höher als in den CD5-positiven Zellen ($p=0,0411$).

Um zu testen, ob der Unterschied in der metabolischen Aktivität auf eine unterschiedliche Proliferation zurückzuführen ist oder durch eine allgemein niedrigere Stoffwechselrate, wurden die Mec1-Klone CD5 und Leervektor ausgesät und täglich ihre Zellzahl bestimmt. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass der Mec1-Klon Leervektor schneller proliferiert als der Mec1-Klon CD5. Dieser Effekt ist allerdings erst nach 72 h Zellwachstum sichtbar (Abbildung 4.16 B).

Die Ergebnisse zeigen, dass CD5-positive Mec1-Zellen eine verringerte metabolische Aktivität aufweisen, welche teilweise durch eine verringerte Proliferationsrate verursacht werden kann.

4.2 Modulierte Expression von PLAG1 durch microRNA in CLL

Die Bedeutung von miRNA in der Pathogenese der CLL ist noch weitgehend unklar. Grundlage der hier durchgeführten funktionellen Analyse bildete die Anwendung einer neuartigen Plattform zur Expressionsbestimmung von hsa-miRNA (*homo sapiens* microRNA, folgend miRNA abgekürzt; Kooperationspartner Arbeitsgruppen Prof. Dr. C. Wendtner und Prof. Dr. Schultze; Name des Arrays: HumanMi_V2). Mit dieser Technik konnte die Expression von 752 verschiedenen miRNAs-basierend auf einem Bead-Chip-Microarray ermittelt werden.

Die Expression von miRNA in B-Zellen von 50 CLL-Patienten wurde mit der von CD19-positiven peripheren B-Zellen von 14 gesunden Probanden verglichen. Die CLL-Patienten waren vor der Blutentnahme noch nicht mit Chemotherapeutika oder anderen CLL-spezifischen Therapien behandelt worden.

Vergleicht man die absolute Anzahl von miRNA, die in CLL-Zellen exprimiert wird, mit der Anzahl der in peripheren B-Zellen exprimierten miRNAs, so zeigt sich eine geringere miRNA-Expression in CLL-Zellen (Christian Pallasch, persönliche Mitteilung). Betrachtet man die miRNAs, die im Vergleich zu gesunden B-Zellen mindestens um das zweifache dereguliert sind und einen p-Wert kleiner als 0,05 haben, so scheint die Expression von sieben miRNAs signifikant hochreguliert zu werden. Im Gegensatz dazu scheint die Expression von 19 miRNAs herunterreguliert zu werden. Die Ergebnisse zeigen z.B. eine Herabregulation der miR-107, -424, -181a und -181b. Eine erhöhte Expression weisen z.B. miR-141 und -155 auf (Christian Pallasch, persönliche Mitteilung).

4.2.1 Identifizierung von PLAG1 als mögliches Zielgen

MiRNA können durch die Bindung an die 3'UTR die Translationsrate von mRNA herab regulieren (Rana, 2007). Um Zielstrukturen für deregulierte miRNAs in der CLL zu finden, wurde von Christian Pallasch (AG Prof Wendtner) die Datenbank von Targetscan verwendet (www.targetscan.org, Release 4.1).

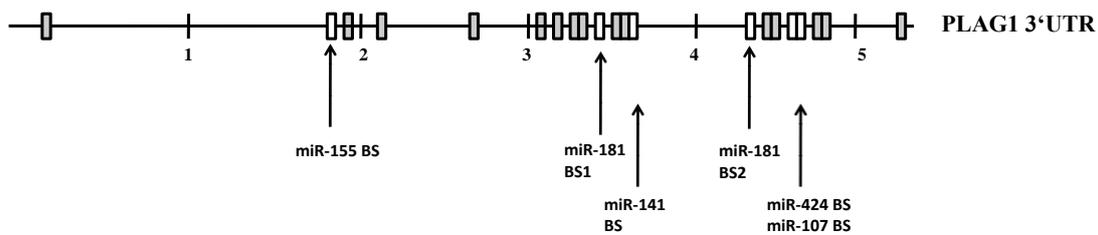


Abbildung 4.17: Der 3'UTR von PLAG1 besitzt mehrere miRNA-Bindestellen. Schematische Darstellung der 3'UTR von PLAG1 und der konservierten Bindestellen (BS) für miRNA (graue Boxen). Die konservierten Bindestellen für miRNAs, die in der CLL dereguliert sind, sind beschriftet (weiße Boxen). Daten aus Targetscan 4.1 und HumanMi_V2. Zahlen: kb der 3'UTR von PLAG1.

Ein mögliches Zielgen von in der CLL deregulierter miRNA ist das Gen für den Transkriptionsfaktor PLAG1 (Pleomorphic adenoma gene 1). PLAG1 ist als Proto-Onkogen beschrieben und in mehreren Tumorarten überexprimiert (Van Dyck et al., 2007). Die 3'UTR von PLAG1 besitzt mehrere hoch und schwach konservierte potentielle Bindestellen für miRNAs (Abbildung 4.17). Von den hochkonservierten miRNA-Bindestellen sind einige für die Regulation der PLAG1-Expression in der CLL besonders bedeutsam, da für diese eine veränderte miRNA-Expression in der CLL gemessen worden sind. Dies sind die Bindestellen für miR-181, -107, -155, -141, -424.

Eine niedrigere Konzentration in CLL-Zellen wird von miR-181, -155, -107 und -424 gemessen. Die Expression der miR-141 ist in CLL-Zellen hochreguliert. Das Vorhandensein von miRNA-Bindestellen für in CLL-Zellen deregulierten miRNAs macht PLAG1 zu einem potentiell verändert exprimierten Protein, welches für die Pathogenese der CLL Bedeutung haben könnte.

4.2.2 PLAG1 ist in CLL-Zellen überexprimiert

Da potentielle Bindestellen für miRNAs an der 3'UTR von PLAG1 vorhanden sind, wurde überprüft, ob in CLL-Zellen PLAG1 verändert exprimiert wird. Aus diesem Grund wurden in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Wendtner aus B-Zellen gesunder Probanden und CLL-Zellen Lysate hergestellt und diese auf die Expression von PLAG1 untersucht.

Hier zeigt sich, dass in gesunden B-Zellen eine deutlich geringere Expressionsrate von PLAG1 zu finden ist. Allerdings ist die Expression von PLAG1 in den CLL-Zellen nicht einheitlich stark exprimiert (Abbildung 4.18). Durch eine geringere Expression von miRNA könnte es zu einer stärkeren Expression von PLAG1 kommen, da weniger mRNA degradiert wird bzw. die Hemmung der Translation aufgehoben wird.

4.2.3 MicroRNAs können an die 3'UTR von PLAG1 binden

PLAG1 ist bei CLL-Patientenzellen überexprimiert. Eine mögliche Ursache für eine veränderte Expression wäre die Regulation der mRNA-Stabilität durch miRNAs. Um zu testen, ob die Bindung von miRNA die Translation von PLAG1 beeinflussen würde, wurden Luziferase-Assays durchgeführt.

Dazu wurde das Ende der 3'UTR von PLAG1 an ein *Renilla*-Luziferase kodierendes Gen fusioniert (Vektor pIS1). Die 3'UTR von PLAG1 beinhaltet zwei Bindestellen für miR-181, eine Bindestelle für miR-141 und eine überlappende Bindestellen der miR-107 und -424 (Abbildung 4.19 B).

In HeLa-Zellen wurde dieser *Renilla*-Luziferase kodierenden Vektor und ein Kontrollvektor, der *Firefly*-Luziferase kodiert (pIS0), transfiziert. Zusätzlich wurde miRNA-Duplex der miR-181a, -181b, -424, -107, -141 oder Kontroll-miR, kotransfiziert. MiR-181a und miR-181b besitzen die gleiche Seed-Sequenz, haben aber Unterschiede in der restlichen Sequenz. Die Auswertung des miRNA-Arrays ergaben eine verminderte Expression von miR-181a und miR-181b. Um evtl. Unterschiede ihrer Regulation der 3'UTR von PLAG1 zu berücksichtigen, wurden diese separat transfiziert. Die Kontroll-miR basiert auf miRNA Sequenzen von *C. Elegans*, die aber keine potentiellen Bindestellen im humanen Genom haben sollten (www.dharmacon.com; Februar 2009).

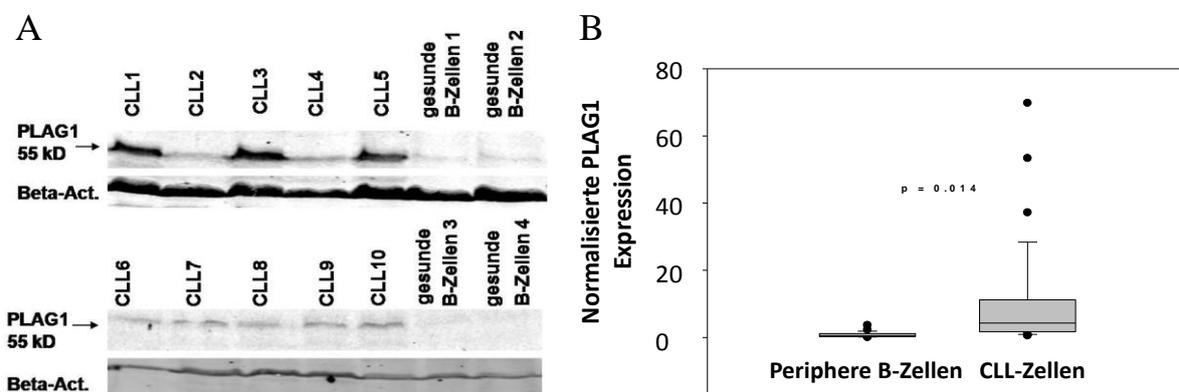


Abbildung 4.18: CLL-Zellen haben eine erhöhte Expression von PLAG1. Gesunde periphere B-Zellen und CLL-Zellen wurden aus Blut isoliert und mit RIPA-Puffer lysiert. A) Lysate wurden ein SDS-PAGE Gel geladen und nach einem Western Blot die Expression von PLAG1 und als Ladekontrolle β -Aktin bestimmt. B) Die normalisierte PLAG1-Expression zu β -Aktin nach densitometrischer Auswertung wurde in einem Box Plot dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem T-Test geprüft.

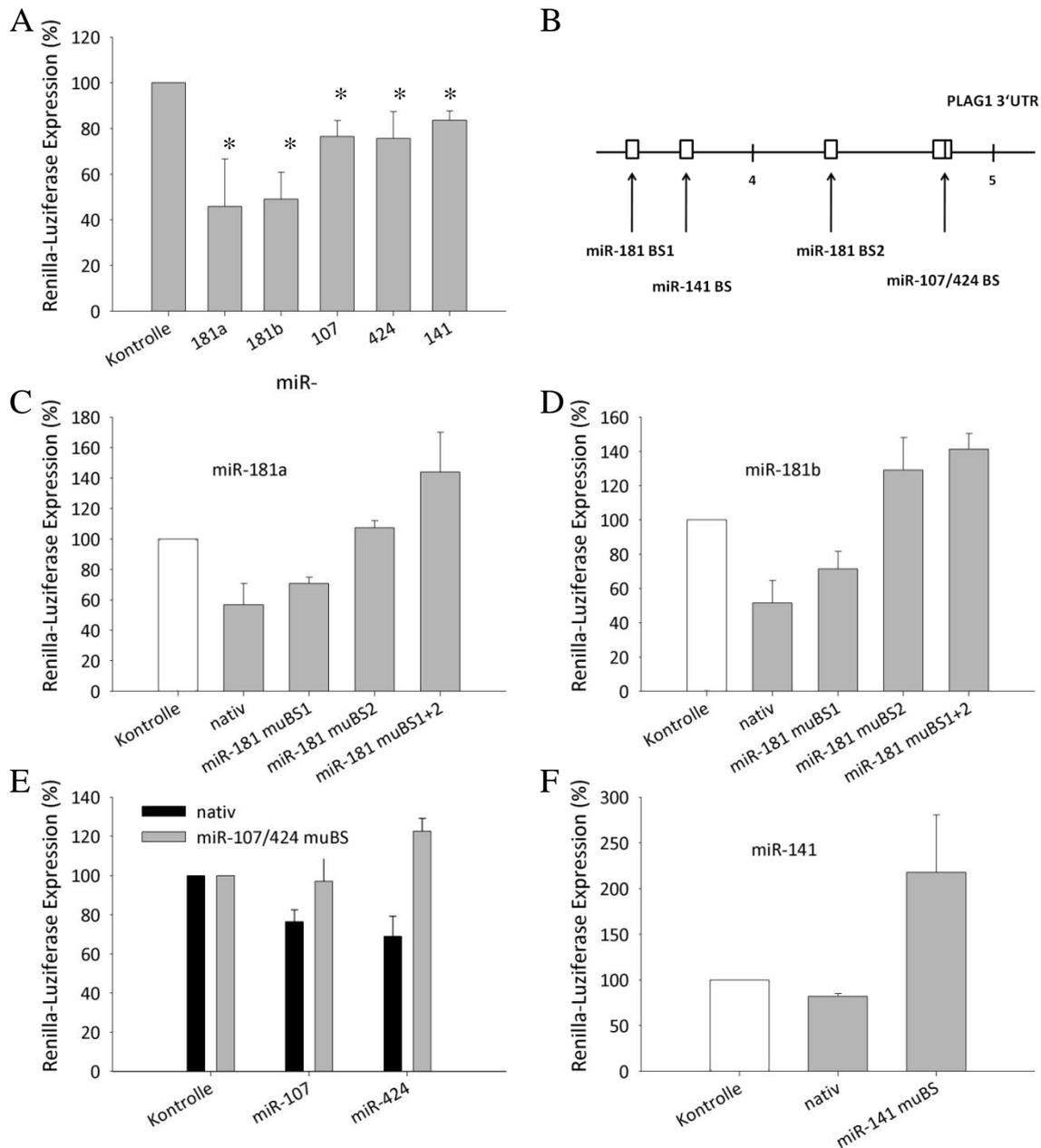


Abbildung 4.19: Die 3'UTR von PLAG1 beinhaltet funktionale Bindestellen für miRNAs. Um deren Funktionalität zu testen, wurden Luziferase-Assays durchgeführt. Hela-Zellen wurden mit einem *Renilla*-Luziferase-3'UTR PLAG1 (nativ oder mutiert), einem *Firefly*-Luziferase Vektor zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und miRNA-Duplex transfiziert. Nach 24 h wurde die Expression der Luziferasen bestimmt, und auf die Kontroll-miR normalisiert. A) Signifikante (*) Deregulationen der Luziferase-Expression nach Transfektion mit 3'UTR PLAG1 (nativ) und miR (T-Test: $p \leq 0,05$). B) Schematische Darstellung der Bindestellen am 3'UTR. Nummern: kbp. MiR-181 besitzt zwei Bindestellen. Bindestelle für miR-107 und -424 sind überlappend. C-E) Um die Spezifität der Bindestellen zu verifizieren wurden die jeweiligen Bindestellen in der 3'UTR mutiert und transfiziert. Verglichen wird die *Renilla*-Expression nach Transfektion von nativer 3'UTR zu den jeweiligen mutierten Bindestellen (muBS) in der 3'UTR. Die Daten wurden jeweils zur Transfektion mit Kontroll-miR normalisiert (weißer Balken). Mutierte miR-181-Bindestellen 1 und/oder 2 kotransfiziert mit miR-181a (C) und mit miR-181b (D). E) Kotransfektionen von miR-107 und -424 zur mutierter 3'UTR miRNA-Bindestelle für miR-107 und -424 oder nativ. F) Kotransfektionen von miR-141 zu 3'UTR mit mutierter miR-141 Bindestelle oder nativ.

24 Stunden nach der Transfektion wurde die Menge der *Renilla*-Luziferase und *Firefly*-Luziferase in den Zellen bestimmt. Um Schwankungen in der Transfektionseffizienz zu berücksichtigen, wurde die ermittelte Menge der *Renilla*-Luziferase mit der gemessenen Menge der *Firefly*-Luziferase normalisiert.

Alle getesteten miRNAs verringerten die Menge an *Renilla*-Luziferase in HeLa-Zellen, jedoch in unterschiedlichen Ausmaß (Abbildung 4.19 A). Am stärksten konnten die miR-181a und miR-181b die Expression beeinflussen, hier zeigte sich eine 50% schwächere Expression. Einen geringeren Einfluss zeigen die miR-107, -424 und -141. Hier wird noch ungefähr 80% der *Renilla*-Luziferase im Vergleich zur Kontrolle exprimiert.

Um zu zeigen, dass die Bindung an die miRNAs wirklich spezifisch ist, wurden jeweils zwei Nukleotide in den potentiellen Bindestellen mutiert. Die Bindestellen für miR-107 und -424 sind an der 3'UTR von PLAG1 überlappend, weswegen hier ein gemeinsames Konstrukt erstellt wurde. Für miR-181 existieren zwei Bindestellen (Bindestelle 1 und 2).

Durch die Mutationen der miRNA-Bindestellen konnte durch Kotransfektion der miRNAs keine verminderte Expression der *Renilla*-Luziferase mehr beobachtet werden. Im Gegenteil ergab sich durch die Mutation eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte *Renilla*-Luziferase-Expression. Möglicherweise liegt dies an weiteren intrazellulären miRNAs, für die die mutierte Bindestelle nicht mehr zur Verfügung steht (Abbildung 4.19 C-F).

MiR-181a und miR-181b besitzen in der 3'UTR von PLAG1 zwei Bindestellen. Hier wurden die Bindestellen einzeln und auch gemeinsam mutiert (Abbildung 4.19 C und D). Durch Mutation der Bindestelle 2 zeigt sich nur eine leichte Verbesserung der Expression im Vergleich zu der Transfektion mit der 3'UTR von PLAG1 ohne Mutation. Hingegen hat die Bindestelle 1 einen stärkeren Effekt auf die Expressionsrate der *Renilla*-Luziferase, da durch die Mutation die Expression der *Renilla*-Luziferase stark ansteigt. Durch die Mutation beider Bindestellen wurde der Effekt nochmals leicht verstärkt. Ein Unterschied zwischen Kotransfektion von miR-181a und miR-181b ist nicht zu erkennen.

Dies bedeutet, dass alle identifizierten miRNA-Bindestellen auch funktionell miRNA binden können und hierdurch die Expression von PLAG1 reduziert wird.

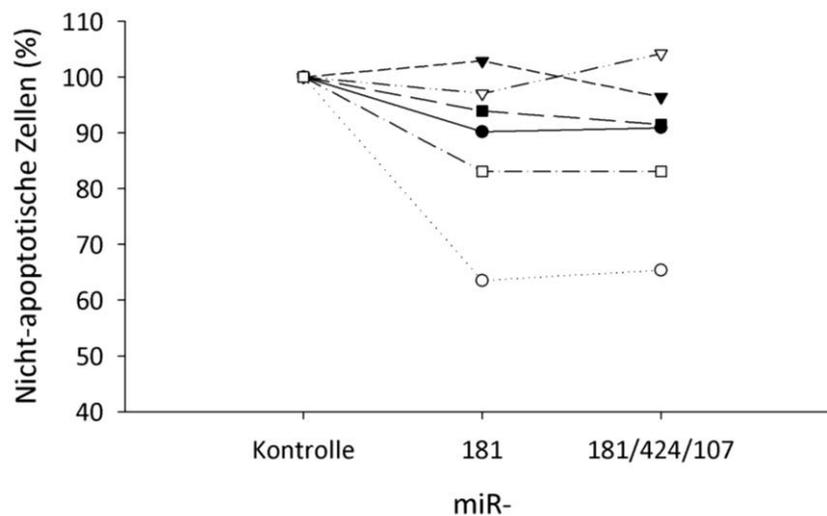


Abbildung 4.20: Nach Retransfektion von miRNA in primäre CLL-Zellen zeigen viele Proben eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen. Primäre CLL-Zellen wurden durch Nukleofektion mit Kontroll-miR (Kontrolle), miR-181 (miR-181a/b) oder miR- 181a/181b/424/107 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde der prozentuale Anteil der nicht-apoptotischen Zellen mit Annexin-V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Auswertung wurden die Proben auf die Kontrolle normalisiert (gepaarter T-Test, $p=0,1$). Jede primäre CLL-Probe wurde mit je einem Symbol gekennzeichnet.

4.2.4 Retransfektion von microRNA in CLL-Zellen kann zu einer verstärkten Apoptoseinduktion führen

Hinweise in der Literatur über miRNA-Expression deuten auf einen Einfluss veränderter miRNA-Expression auf das Überleben von Tumorzellen hin (Zanette et al., 2007). Da in CLL-Zellen eine verringerte miRNA-Expression im Vergleich zu peripheren B-Zellen vorkommt, wurden einige miRNAs in primäre CLL-Zellen transfiziert und nach 24 h die Apoptoseinduktion in den Zellen gemessen.

MiR-181a/b wird in Glioblastoma-Zellen eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben, die Apoptose in Zellen induzieren kann. Ähnlich wie in CLL, ist in Glioblastoma-Tumoren die Expression von miR-181a/b herabgesetzt (Marton et al., 2008; Shi et al., 2008). Eine Retransfektion von miR-181a/b sollte zeigen, ob hierdurch auch in CLL-Zellen eine apoptotische Wirkung erzielt werden kann. Da mehrere miRNAs in der CLL dereguliert sind, wurden in einem Ansatz vier miRNAs, miR-181a/b, -424 und -107, in CLL-Zellen retransfiziert. Die Retransfektion dieser miRNAs könnte sich auch auf die PLAG1-Expression auswirken.

Mit Hilfe von Transfektionen mit Amaxa Nukleofektion konnte eine Transfektionseffizienz von ca. 20% erzielt werden. 24 h nach Transfektion wurde die Apoptoserate der Zellen mit Annexin-V/7AAD gemessen. Die Zahl der nicht-apoptotischen Zellen nahm in 4 von 6 getesteten primären CLL-Zellen zwischen 5% und 40% nach Retransfektion von miRNA ab ($p=0,01$; siehe Abbildung 4.20). Dabei war der Effekt der Transfektion von miR-181a/b alleine und miR-181a/b mit -107 und -424 vergleichbar.

Die hier dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass eine miRNA-bedingte Störung der PLAG1-Expression an der Pathogenese der CLL beteiligt sein könnte.

5 Diskussion

Die Diskussion gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Abschnitt werden Ergebnisse, die eine Beteiligung von CD5 an der Pathogenese der CLL klären sollen, diskutiert (Abschnitt 5.1). In dem zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse erörtert, die den Einfluss von miRNA und die Bedeutung von PLAG1 in der CLL beschreiben (Abschnitt 5.2).

5.1 Beteiligung von CD5 an der Pathogenese der CLL?

CD5 ist ein Transmembranrezeptor, der auf CLL-Zellen, im Gegensatz zu normalen peripheren B-Zellen hoch exprimiert wird (Lozano et al., 2000). Die Beteiligung von CD5 in der Pathogenese von CLL ist unklar. Erschwert wird die Ergründung der Funktion von CD5 in CLL-Zellen durch die Tatsache, dass kein physiologischer Ligand von CD5 bekannt ist. Bis jetzt haben Stimulierungen von CD5 in CLL-Zellen mit Hilfe von Antikörpern stattgefunden (Cioca and Kitano, 2002; Perez-Chacon et al., 2007b; Renaudineau et al., 2005). Es ist bekannt, dass Antikörper nicht nur mit ihrer FAB-Domäne spezifisch an Zellen binden. Auch Bindungen der FC-Domäne des Antikörpers an FC-Rezeptoren können erfolgen. Dies kann zur Induktion von Apoptose, oder auch zur Proliferation der Zelle führen (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Andere Ansätze Rezeptoren zu stimulieren, von denen kein Ligand bekannt ist, ist das Benutzen von chimären Rezeptoren, die dann durch Zugabe eines Liganden spezifisch stimuliert werden können (Hausherr et al., 2007; Riedel et al., 1986; Schaeffer et al., 2001).

5.1.1 Stimulierung des chimären Rezeptors in Mec1-Zellen als Modell zur Klärung der Funktion von CD5 in CLL

Um die Beteiligung von CD5 an der Pathogenese der CLL näher untersuchen zu können, wurde in eine CLL-ähnliche Zelllinie ein chimärer Rezeptor transfiziert. In dieser Arbeit wurde ein chimärer Rezeptor aus der cytoplasmatischen Domäne und Transmembran-Domäne von CD5 und der extrazellulären Domäne des EGFR in Mec1-Zellen zur Expression gebracht. Nach Zugabe von EGF sollte CD5 stimuliert werden, und die CD5-abhängigen Signalkaskaden untersucht werden.

Die Expression von CD5-EGFR auf der Zellmembran von Mec1-Zellen konnte nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war für die Durchführung der folgenden

Experimente sehr wichtig. Für einen zuvor gebauten chimären Rezeptor, der aus der extrazellulären Domäne des EPO (Erythropoetin)-Rezeptors und der intrazellulären und Transmembran-Domäne von CD5 bestand, konnte dieser Nachweis nicht gelingen. Für die durchflusszytometrische Bestimmung war kein Antikörper verfügbar. Eine fehlende Stimulierbarkeit nach EPO-Zugabe wurde daher auf eine nicht ausreichende Expression auf der Zellmembran zurückgeführt (Günter Krause, persönliche Mitteilung).

Ebenfalls gelang der Nachweis, dass die Zugabe des Liganden EGF zu einer Dimerisierung des chimären Rezeptors führt (Abschnitt 4.1.2). Eine Aktivierung von Signalkaskaden durch CD5-Dimerisierung konnte nicht nachgewiesen werden.

Als mögliche Ursachen für das Fehlen einer spezifischen Antwort nach CD5-Stimulation kommen unter anderem eine unpassende Übertragung des extrazellulären Signals der Ligandenbindung in das Zellinnere oder ein nicht hinreichend passender Zusammenhang mit der Signaltransduktion in Mec1-Zellen in Betracht.

Funktionsweise des chimären Rezeptors

Die fehlende Reaktion der CD5-EGFR exprimierenden Mec1-Zellen auf eine EGF-Behandlung könnte auf einen unpassenden Aufbau des chimären Rezeptors hinweisen. Der unpassende Aufbau könnte zur Folge haben, dass CD5-EGFR durch eine falsche Struktur nicht durch EGF aktivierbar ist, oder CD5-EGFR dauerhaft aktiviert ist, und die zusätzliche Aktivierung durch EGF nicht mehr detektierbar ist.

Gegen einen fehlerhaften Aufbau von CD5-EGFR spricht, dass in Jurkat-Zellen, die CD5-EGFR stabil exprimieren, eine induzierbare Antwort nach EGF-Stimulation festgestellt wurde. Dabei handelt es sich um die Phosphorylierung eines 120 kDa großen Proteins. Die parallelen Versuche mit Anti-CD5 Antikörper in CD5-positiven Jurkat-Zellen zeigten ähnliche Ergebnisse (Aditya Veldurthy, persönliche Mitteilungen). Die Beobachtungen an Jurkat-Zellen wurden nicht weiter verfolgt, weil von der Charakterisierung dieser T-Zell-Lymphom-Zelllinie keine weiteren Erkenntnisse über die Pathogenese der CLL erwartet wurden.

Für eine mögliche Daueraktivierung von CD5-EGFR spricht, dass CD5-EGFR auch ohne Zugabe von EGF als Dimer vorlag. Es kann zwar nach der Stimulierung eine verstärkte Dimerisierung von CD5-EGFR nachgewiesen werden, jedoch könnte der Effekt der durch die zusätzliche Dimerisierung von CD5-EGFR erfolgte, zu klein sein, um detektiert zu werden. Ebenfalls spricht für diese Hypothese, dass auch ohne Stimulierung zwischen

CD5-positiven und -negativen Zellen Unterschiede in der Proteinexpression und der Viabilität nachweisbar sind (Abschnitt 4.1.10.).

Dieser Befund scheint nicht mit der klonierungsbedingten Verkürzung des EGFR im Zusammenhang zu stehen. Die Domäne IV des EGFR wurde für die Klonierung verkürzt. Domäne II und IV halten den nativen EGFR in einer inhibierten Konformation, solange keine Stimulation mit EGF durchgeführt wird. Eine Mutation der Domäne IV führt zu einer höheren Ligandenbindeaffinität und zu einer dauerhaft nicht autoinhibierten Konformation von EGFR (Burgess et al., 2003; Ferguson et al., 2003). Ohne die Zugabe von EGF kann aber auch der EGFR mit verkürzter Domäne IV nicht dimerisieren (Elleman et al., 2001). Möglicherweise sind also intrazelluläre Aminosäuren für die dauerhafte Dimerisierung von CD5-EGFR verantwortlich. Um diese Hypothese zu prüfen, müsste die Dimerisierung von nativem CD5 auf Mec1-Zellen näher untersucht werden.

Gegen die Hypothese, dass CD5-EGFR nicht funktioniert spricht, dass die Behandlung mit Anti-CD5 Antikörpern in CD5-positiven Mec1-Zellen ebenfalls keine biologischen Effekte induziert, während die entsprechende Behandlung von primären CLL-Zellen größtenteils zu einem Überlebensvorteil führt. Wenn CD5-Stimulierungen in Mec1-Zellen nicht messbar sind, dann sind vielleicht Mec1-Zellen zur Untersuchung der Funktion von CD5-Signalkaskaden in CLL nicht geeignet.

Es können keine eindeutigen Hinweise gefunden werden, die einen nicht funktionalen chimären Rezeptor als Ursache für die fehlend nachweisbare Stimulierung begründet. Wenn die Stimulierung des chimären Rezeptors funktioniert, könnte die Mec1-Zelle als Modell zur CD5-Stimulierung ungeeignet sein.

Mec1-Zellen als CLL-Modell

Stimulierungen von CD5 und CD5-EGFR führen in Mec1-Zellen zu keiner messbaren induzierten Signaltransduktion. Dies könnte ein Hinweis sein, dass Mec1-Zellen zur Untersuchung von CD5-vermittelten Signalwegen nicht geeignet sind. Eine fehlende Reaktion von Mec1-Zellen auf CD5-Stimulierung kann aber durchaus als CLL-typisch bewertet werden. So zeigen sich bei der Stimulierung von Patientenzellen auch nicht immer nachweisbare Effekte auf eine CD5-Stimulierung (Abschnitt 4.1.7).

Auch in der Literatur werden nur bei einem Teil der *ex vivo*-Proben von CLL-Patienten biologische Effekte nach einer Behandlung mit Anti-CD5 Antikörpern beobachtet (Cioca and Kitano, 2002; Perez-Chacon et al., 2007a; Perez-Chacon et al., 2007b; Pers et al.,

2002; Renaudineau et al., 2005). Die Patientenproben werden in CD5-Responder und CD5-Non-Responder eingeteilt. Bei letzteren wird keine Reaktion auf Anti-CD5 Antikörper Behandlung beobachtet.

Eine Antwort auf CD5-Stimulierung scheint mit dem Vorliegen prognostischer Marker für die aggressive Verlaufsform zu korrelieren (Perez-Chacon et al., 2007b; Renaudineau et al., 2005). Die fehlende Antwort auf CD5-Stimulierung in Mec1-Zellen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese aus einer CLL mit indolenter Verlaufsform entstanden ist. Die CLL-Zellen der indolenten Verlaufsform sind durch eine niedrige ZAP70-Expression und eine mutierte IgVH charakterisiert (Chiorazzi et al., 2005). Gestützt wird diese Hypothese durch die Expression der Marker für eine indolente Verlaufsform in Mec1-Zellen. Mec1-Zellen weisen eine mutierte IgVH und eine niedrigen ZAP70-Expression auf (Rajesh Kumar, persönliche Mitteilung, Alfarano et al., 1999).

Ein weiterer Hinweis, dass Mec1-Zellen aus einem non-Responder gewonnen wurden, erfolgt durch die Analyse der Assoziation von CD5 und SHP1. Die Untersuchung von Signaltransduktionprozessen nach CD5-Stimulierung unter Berücksichtigung des BZR und der BZR-assoziierten Molekülen ergab, dass bei allen CD5-Respondern vor der CD5-Stimulation eine Assoziation von CD5 mit dem BZR sowie mit der Phosphatase SHP1 und CD5 nachzuweisen war. Nach Stimulierung von CD5 ging bei CD5-Respondern diese Assoziation verloren (Renaudineau et al., 2005). Auch andere betrachtete Signalmoleküle zeigten vor und nach dem Crosslinking zwischen den einzelnen CD5-Respondern eine einheitliche Reaktion. Die Resultate der Betrachtung der CD5-Non-Responder sind nicht so einheitlich (Renaudineau et al., 2005).

Die Non-Responder wurden in drei Gruppen, abhängig von den unterschiedlichen Signalantworten, eingeteilt. In einer dieser Gruppen fällt auf, dass eine Dissoziation von SHP1 nach CD5-Stimulierung nicht stattfindet. Auch in den für diese Arbeit Experimenten ist zu erkennen, dass eine Dissoziation von SHP1 von CD5 in Mec1-Zellen nicht stattfindet (Abschnitt 4.1.7). Auf diese Weise könnte eine weitere Signaltransduktion verhindert werden, da SHP1 den Tyrosinrest von Src-Kinasen, der zu deren Aktivierung erforderlich ist, dephosphoryliert (Chiang and Sefton, 2001). Dies würde auch erklären warum Lck in dem Mec1-Klon CD5-EGFR weniger aktiv ist (Abschnitt 4.1.4).

Ein weiterer Hinweis, dass Mec1-Zellen aus Non-Respondern gewonnen wurden, liefert die ebenfalls nicht induzierbare BZR-Stimulation in Mec1-Zellen. Durch eine BZR-

Stimulation kam es in den primären CLL-Zellen meistens zu einer verringerten Apoptoserate, zu stärkerer metabolischer Aktivität und zu einer verstärkten Expression von frühen B-Zell Aktivierungsantigenen. In Mec1-Zellen wurde das nicht beobachtet (Abschnitt 4.1.6).

Primäre CLL-Zellen reagieren nicht in allen Fällen auf eine BZR-Stimulation (Allsup et al., 2005; Lankester et al., 1995; Nedellec et al., 2005). Die unterschiedliche Antwort der Zellen auf die BZR-Stimulation korreliert häufig, ähnlich wie bei der CD5-Stimulation, mit der Anwesenheit von prognostischen Markern. Im Allgemeinen steht das Vorliegen der Marker für die aggressive Verlaufsform eher im Zusammenhang mit einer Proliferationsförderung nach BZR-Stimulation, während Zellen, die die Marker der indolenten Verlaufsform tragen, gar nicht auf den Stimulus reagieren oder verstärkt in Apoptose gehen.

Alle, die hier aufgeführten Punkte könnten darauf hinzeigen, dass die fehlende CD5-Stimulierbarkeit in Mec1-Zellen durchaus als CLL-typisch für die indolente Verlaufsform betrachtet werden kann. Über die Beteiligung von CD5-Stimulierungen an der Pathogenese der CLL können in diesem Modell keine neuen Ergebnisse gewonnen werden.

5.1.2 Aktivierung von CD5-Signalkaskaden in primären CLL-Zellen

Da in Mec1-Zellen keine Aktivierung von CD5-induzierten Signalkaskaden nachgewiesen werden konnte, sollte an primären CLL-Zellen eine CD5-Stimulation durchgeführt werden.

In der Literatur ist beschrieben worden, dass die Behandlung mit löslichem Anti-CD5 Antikörper eher zu einem verstärkten Überleben von CLL-Zellen führt (Perez-Chacon et al., 2007b). Apoptose-Induktion zeigt sich erst bei höheren Konzentrationen (10 µg) von Anti-CD5 Antikörpern (Perez-Chacon et al., 2007b; Renaudineau et al., 2005). Da in dieser Arbeit kein Effekt auf Stimulation mit löslichem Antikörper messbar war, wurden ebenfalls mit an Microbeads immobilisierten Anti-CD5 Antikörpern stimuliert (Abschnitt 4.1.7). Für die Stimulierung mit löslichem Anti-CD5 Antikörper wurde exakt der gleiche Kontrollantikörper, die gleiche Inkubationszeit und dieselben Assays wie bei Perez-Chacon benutzt. Aus welchem Grund nicht die gleichen Ergebnisse erhalten wurden ist fraglich (Perez-Chacon et al., 2007b).

In den Experimenten mit gekoppelten Anti-CD5 Antikörpern wurde in acht von zwölf Fällen eine um 15% stärkere metabolische Aktivität gemessen. Dies steht im Gegensatz zu

Berichten über Apoptoseinduktion in CLL-Zellen nach CD5-Stimulierung mit immobilisierten Anti-CD5 Antikörpern (Cioca and Kitano, 2002). Dies könnte auf eine unterschiedliche Stimulierungsmethode und Antikörperkonzentration zurückzuführen sein. Nach Behandlung mit an Microbeads gekoppelten Anti-CD5 Antikörpern konnte beobachtet werden, dass meistens nur ein Bruchteil der Zelloberfläche mit Anti-CD5 gekoppelten Kügelchen bedeckt ist, und somit die CD5-Stimulation nur auf sehr begrenzten Membranbezirken abläuft, was zu einem Überlebensvorteil führt. Bei Stimulation mit gelöstem Antikörper in hohen Mengen, oder mit gecrosslinktem Anti-CD5 Antikörper an eine Zellkulturschale, wie bei Cioca und Kitano, wird ein größerer Teil der Zelloberfläche erfasst, was zur Apoptoseinduktion führen könnte. Es lässt sich vermuten, dass die Behandlung mit geringeren Konzentrationen eher zu einem stärkeren Überleben der Zelle führt.

Experimente mit CD5-Stimulationen wurden in Patientenzellen nicht weiter beobachtet, da schon mehrere Publikationen mit CD5-Stimulation durch Antikörper in CLL-Zellen vorhanden sind. Außerdem ist der Effekt der CD5-Stimulation im Vergleich zu dem Effekt nach BZR-Stimulation relativ gering. Um neue Erkenntnisse über die Funktion von CD5-Stimulation in CLL-Zellen näher erfassen zu können, wären Stimulationen mit dem natürlichen Liganden von CD5 wichtig.

5.1.3 Expression von CD5 in Zelllinien zur Klärung der Funktion von CD5 in CLL

Da die Stimulierung von CD5 in Mec1-Zellen zu keiner detektierbaren Aktivierung von CD5-induzierten Signalkaskaden führte, wurden die konstitutiven Einflüsse von CD5 betrachtet. Allein durch das Vorliegen von CD5 in der Zelle könnte die Signaltransduktion und folglich die Genexpression und das Überleben von CLL-Zellen beeinflusst werden, da sich an der cytoplasmatischen Domäne von CD5 Protein-Bindestellen befinden.

Im Einklang mit einem möglichen konstitutiven Effekt der CD5-Expression liegt CD5 auch ohne Stimulierung in CD5-positiven Mec1-Zellen phosphoryliert vor (Abschnitt 4.1.8). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass in Mec1-Zellen mit stabiler CD5-Expression die Phosphatase SHP1 dauerhaft mit CD5 assoziiert ist (Abschnitt 4.1.7). Eine konstitutive Phosphorylierung von CD5, und eine Assoziation von SHP1 an CD5 wurde auch in CLL-Zellen, die die Marker der indolenten Verlaufsform aufweisen, gefunden (Gary-Gouy et al., 2007; Renaudineau et al., 2005). Durch eine Phosphorylierung von CD5 und eine

Assoziation mit SHP1 könnten die laufenden Signalkaskaden in räumlicher Nähe zu CD5 verändert werden. Dies könnte zu einer dauerhaft veränderten Signaltransduktion der Zelle führen.

Um mögliche Effekte in CD5-positiven und -negativen Zellen aussagekräftiger untersuchen zu können, wurden Zelllysate aus unterschiedlichen Zelllinien verglichen, von denen CD5-positive und -negative Zellen verfügbar waren.

In den CD5-positiven Zellen ist insgesamt die Proteinmenge der klassischen Isoformen α , β und γ der Serin-Threonin Kinase PKC herabreguliert (Abschnitt 4.1.10). Da der verwendete Antikörper nicht zwischen den Isoformen α , β und γ unterscheidet, kann hier nicht entschieden werden welcher dieser drei Isoformen für eine verringerte PKC-Expression in CD5-positiven Zellen verantwortlich ist. Auch in CLL-Zellen ist eine veränderte PKC (α, β, γ) Proteinexpression beschrieben worden (Abrams et al., 2007; Alkan et al., 2005). In diesen Publikationen ist berichtet worden, dass CLL-Zellen in Vergleich zu gesunden B-Zellen weniger PKC α , mehr PKC β und genauso viel PKC γ exprimieren (Abrams et al., 2007; Alkan et al., 2005). Wenn eine geringere Expression von PKC (α, β, γ) in CD5-positiven Mec1-Zellen detektierbar ist, während in CLL-Zellen, die ebenfalls CD5-positiv sind, nur eine niedrigere Expression von PKC α zu finden ist, während PKC β und PKC γ gleich oder stärker exprimiert werden, so könnte es sein, dass durch CD5-Expression die Expression von PKC α reduziert wird.

Aus diesem Grund wurde zuerst die Expression von PKC α in mehreren CD5-positiven und -negativen Zellen auf mRNA-Ebene betrachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass in CD5-positiven Zellen weniger PKC α mRNA exprimiert wird als in CD5-negativen Zellen. Dies konnte in drei verschiedenen Zelllinien gezeigt werden. Da die Zelllinien aus verschiedenen Gewebetypen stammen, wie T-Zellen, Nierenepithel-Zellen und CLL-ähnlichen-Zellen, könnte dies ein Hinweis auf eine allgemeingültige Aussage für CD5 sein.

Eine weitere Publikation deutet auf einen wichtigen Zusammenhang zwischen PKC α - und CD5-Expression hin (Nakagawa et al., 2006). Aus B-Zell-Vorläuferzellen, die enzymatisch inaktive PKC α exprimieren, entsteht aufgrund des dominant-negativen Effekts eine B-Zell Population mit CLL-ähnlichem Phänotyp. Wie humane CLL-Zellen exprimieren diese Zellen CD5 und zeigen eine erhöhte BCL2-Expression. Werden diese Zellen aus der Maus isoliert, gehen diese Zellen, ähnlich den CLL-Zellen, in Zell-Zyklus Arrest (Nakagawa et al., 2006). Wenn ein Zusammenhang in CLL-Zellen zwischen PKC α -Expression und dem

Phänotyp von CLL-Zellen gefunden werden könnte, dann liegt es nahe, dass auch CD5 diesen Phänotyp prägt.

Deswegen wurde die Expression von PKC α mRNA in CLL-Zellen mit gesunden peripheren B-Zellen verglichen. Eine Herabregulation von PKC α konnte in Patientenzellen nicht verifiziert werden, obwohl auf Proteinebene Publikationen eine geringere PKC α -Expression in CLL-Zellen beschreiben (Abrams et al., 2007; Alkan et al., 2005). Eine Tendenz zu einer geringeren PKC α -Expression zeigt sich allerdings schon, da nur sechs von zwölf Patienten eine PKC α -Expression oberhalb der Nachweisgrenze aufweisen (Abschnitt 4.1.11). Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf Untergruppen innerhalb der CLL-Patienten. Um zu testen, ob auch auf Proteinebene ein Expressionsunterschied in CLL-Zellen und gesunden Zellen existiert, sollten noch Western Blots gegen PKC α durchgeführt werden.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen CD5 und PKC α gibt die Phosphatase SHP1. SHP1 ist in Thrombozyten ein Substrat von PKC α (Jones et al., 2004). Die Serin-Phosphorylierung von SHP1 durch PKC α inaktiviert die Phosphatase. Folglich könnte eine niedrigere Expression von PKC α zu einer stärkeren Aktivität von SHP1 führen, da diese seltener inaktiviert wird. In weiterer Konsequenz könnte dies die verringerte Lck Aktivität von Mec1-Klon CD5-EGFR (Abschnitt 4.1.4) erklären, da SHP1 Lck in einem inaktiven Zustand hält (Chiang and Sefton, 2001). Da Lck und SHP1 an CD5 binden, könnten sie sich lokal gegenseitig beeinflussen. Eine erhöhte Aktivität von SHP1 in CLL-Zellen ist allerdings nicht detektiert worden (Allsup et al., 2008).

5.1.4 Beeinflusst das Vorliegen der cytoplasmatischen Domäne von CD5 das Überleben der CLL-Zelle?

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Expression von CD5 die Expression von PKC α auf mRNA-Ebene herabreguliert wird. Als nächstes sollte betrachtet werden, ob auch die Viabilität der Zelle durch CD5 beeinflusst werden kann. Dafür wurde die Expression von IL-10, die einen positiven Einfluss auf das Überleben von CLL-Zellen haben soll, und die Proliferation von CD5-positiven Zellen betrachtet (Gary-Gouy et al., 2002).

IL-10 erhöht die Proliferation von B-Zellen (Itoh and Hirohata, 1995). Neuere Publikationen assoziieren eine verstärkte IL-10-Expression mit einem verstärktem Überleben der CLL-Zellen (Gary-Gouy et al., 2002; Perez-Chacon et al., 2007b). Ein

Zusammenhang zwischen CD5 und IL-10 wird diskutiert, da CD5-positive Daudi-Zellen eine erhöhte IL-10-Expression aufweisen (Gary-Gouy et al., 2002). Ein weiterer Zusammenhang zeigt sich zwischen einer niedrigeren PKC α -Expression, die ,wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, in CD5-positiven Zellen herunterreguliert ist, und einer erhöhten IL-10-Expression (Ohkusu et al., 1997). Durch die Hinweise in der Literatur ist die IL-10-Expression ein potentielles weiteres Protein, das durch eine CD5-Expression beeinflusst werden kann.

Deswegen wurde die Expression von IL-10 mRNA in allen CD5-positiven und -negativen Zelllinien untersucht. Eine erhöhte IL-10 mRNA-Expression konnte, wie bereits von Gary-Gouy et al. (2002) publiziert, in CD5-positiven Daudi-Zellen reproduziert werden (Abschnitt 4.1.12). In CD5-positiven JVM3-Zellen zeigte sich eine erniedrigte IL-10 mRNA-Expression. In Mec1-Zellen, die CD5 exprimieren, konnte keine einheitlich veränderte IL-10 mRNA-Expression gemessen werden. Eine allgemeingültige Aussage über CD5-Expression und IL-10 mRNA-Expression war also in Zelllinien nicht möglich. CD5 scheint in Zelllinien die IL-10 mRNA-Expression nicht stark zu beeinflussen.

Allerdings konnte in CD5 exprimierenden CLL-Zellen im Vergleich zu gesunden B-Zellen eine niedrigere IL-10 mRNA-Expression festgestellt werden (Abschnitt 4.1.12). Dieser Zusammenhang kann aber, da in CD5-positiven Zelllinien keine verringerte IL-10 mRNA-Expression gemessen worden ist, nicht nur auf eine CD5-Expression zurückgeführt werden.

Publikationen über die IL-10-Expression in CLL-Zellen sind nicht bekannt. Im Serum von CLL-Patienten konnten erhöhte IL-10 Proteinexpressionen nachgewiesen werden (Fayad et al., 2001). Durch die erhöhte Expression von IL-10 in CD5-positiven peripheren B-Zellen und CD5-positiven Daudi-Zellen im Vergleich zu CD5-negativen peripheren B-Zellen und CD5-negativen Daudi-Zellen wurde die erhöhte Expression im Serum von CLL-Patienten auf die erhöhte IL-10-Expression in CLL-Zellen zurückgeführt (Gary-Gouy et al., 2002; Perez-Chacon et al., 2007b). Die erhöhte Expression von IL-10 im Serum könnte auf die erhöhte Anzahl von B-Zellen, die IL-10 produzieren zurückzuführen sein und nicht auf eine erhöhte Expression von IL-10 in CLL-Zellen durch eine CD5-Expression. Allerdings sollte die IL-10 Produktion in CLL-Zellen noch einmal in einem Elisa gemessen werden, um sicher zu gehen, dass mRNA-Expression und Proteinexpression korrelieren.

Da keine Hinweise für eine durch CD5 beeinflusste IL-10-Expression in Zelllinien gefunden werden konnte, wurde betrachtet, ob sich CD5-positive Zellen von CD5-negativen Zellen in ihrer Viabilität unterscheiden. Dafür wurden CD5-positive und -negative Zellen ausgesät und ihre Proliferation in einem XTT-Assay bestimmt.

Im XTT-Assay ist zu erkennen, dass alle Zellen, die mindestens die cytoplasmatische Domäne von CD5 exprimieren eine verringerte Proliferation zeigen als CD5-negative Zellen. Da in einem XTT-Assay die Proliferation nicht direkt gemessen wird, sondern eher die metabolische Aktivität (Redox-Potential) der Zelle (Berridge et al., 2005), wurde zusätzlich von Mec1-Klon CD5 und Leervektor täglich die Zellzahl bestimmt (Abschnitt 4.1.13). Die gemessene höhere Viabilität der CD5-negativen Zellen scheint nicht nur aus einer unterschiedlichen Zellzahl zu resultieren, da sich bei mikroskopischer Zellzählung erst nach 96 h ein Unterschied zwischen CD5-positiven und -negativen Zellen zeigt, während ein Unterschied im Redox-Potential der Zelle bereits nach 48 h gezeigt werden kann.

Möglicherweise ist für eine verlangsamte Proliferation von CD5-positiven Mec1-Zellen PKC α verantwortlich. Experimente zeigen, dass PKC α durch p21^{Waf1/Cip1} einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation in Glioma-Zellen hat (Besson and Yong, 2000). Um zu zeigen, dass dieser Effekt definitiv von der fehlenden Expression von PKC α resultiert, könnte in den CD5-positiven Zellen PKC α wieder in die Zellen transfiziert werden.

Der Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von CD5 und modulierter PKC α Transkription zeigt, dass evtl. eine dauerhafte Signaltransduktion durch CD5 in CLL-Zellen stattfindet, die eine Änderung der Transkription von PKC α bedingt. Diese könnte möglicherweise für die Pathogenese der CLL eine Bedeutung haben.

5.1.5 Ausblick

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass rekombinante Mec1-Zellen nicht auf eine CD5-Stimulation reagieren. Vermutlich gehören Mec1-Zellen, wenn diese als CLL-Zellen betrachtet werden können, in die Prognostische Gruppe der indolenten Verlaufsform, in der auch in Patientenzellen keine Aktivierung von CD5 messbar war. Die Fragestellung nach der Beteiligung von CD5 durch seine Stimulierung in CLL-Zellen in diesem Modellsystem wurde deswegen nicht weiter verfolgt.

Konstitutive Effekte der CD5-Expression in CLL wurden bisher wenig betrachtet, weswegen sich hier weitere Untersuchungen lohnen könnten. Die Herabregulation von PKC α mRNA ist nur eine von vielen potentiell durch CD5 beeinflussten Zielstrukturen. Mit Hilfe eines mRNA-Arrays könnte man noch weitere veränderte mRNA-Expressionslevel aufdecken, die in RT-PCRs und Western Blots auf ihre Relevanz überprüft werden könnten.

Da PKC α für die Pathogenese der CLL eine wichtige Rolle spielen könnte, sollte ermittelt werden, welcher Teil von CD5 für eine Herabregulation von PKC α zuständig ist, vielleicht könnten durch Mutationen der Phosphorylierungsstellen der Zusammenhang zwischen den zwei Proteinen genauer charakterisiert werden.

Ein neuer Ansatz, um die Funktion von CD5 auf CLL-Zellen zu ergründen, wäre die Transfektion mit siRNA gegen CD5 in CLL-Zellen. Die Transfektionseffizienz von CLL-Zellen ist allerdings noch sehr gering, und Effekte auf das Überleben der Zelle könnten nur mit Zell-Sortierung oder bei einer sehr starken Reaktion von CD5 auf die Zelle erwartet werden.

5.2 Die Beteiligung von microRNA an der Pathogenese der CLL

MiRNA hat einen Einfluss auf die Translationsrate von mRNA. Durch eine veränderte miRNA-Expression kann die Translationsrate von mRNA beeinflusst werden, dies könnte zu einer veränderten Proteinexpression führen.

Mit Hilfe einer neuen Array-Plattform konnte die Expression von 752 hsa-miRNAs untersucht werden. Im Vergleich zu gesunden B-Zellen zeigte sich in dem miRNA-Array (HumanMi_V2) eine verringerte Expression von 19 miRNAs und eine erhöhte Expression von sieben miRNAs (Christian Pallasch, persönliche Mitteilung). Publikationen, die eine veränderte miRNA-Expression in der CLL beschreiben, wurden damit bestätigt (Calin et al., 2005; Fulci et al., 2007).

5.2.1 Überexpression von PLAG1 in CLL

Durch eine Bewertung der möglichen Zielsequenzen für deregulierte miRNAs an 3'UTRs, wurden die Proteine zu den 3'UTRs herausgefiltert, deren Translation durch die hier identifizierten deregulierten miRNAs besonders betroffen sein sollten. Eines dieser Proteine ist der Transkriptionsfaktor PLAG1. In Western Blots konnte gezeigt werden, dass

PLAG1 in CLL-Zellen stärker exprimiert wurde als in gesunden peripheren B-Zellen (Abschnitt 4.2.2).

Die Expression von PLAG1 in CLL-Zellen ist allerdings nicht einheitlich stark. Möglicherweise ist dies ein Hinweis für eine durch prognostische Gruppen oder durch den Verlauf von CLL beeinflusste PLAG1-Expression.

Einen weiteren Hinweis für die Relevanz von PLAG1 in CLL wurde mit Hilfe der Betrachtung von Genen, die durch PLAG1 reguliert werden könnten, gefunden. Gene, die durch den Transkriptionsfaktor PLAG1 reguliert werden können, wurden mit Hilfe eines mRNA-Arrays festgestellt (Voz et al., 2004). Dafür wurde die Expression der mRNA in Speicheldrüsen-Tumoren, in denen PLAG1 erhöht exprimiert wird, verglichen mit gesunden Speicheldrüsen-Zellen. Die gewonnenen Daten wurden durch Transfektionen von Hek293-Zellen mit PLAG1 und durch den Nachweis der Promotor-Bindestelle für PLAG1 verifiziert (Voz et al., 2004). Betrachtet man die mRNA-Expression der vermutlich durch PLAG1 veränderten Gene in CLL-Zellen, so zeigt sich, dass diese mRNAs auch in CLL dereguliert sind (Christian Pallasch, persönliche Mitteilung). Globale Genexpressionsprofile wurden in der Arbeitsgruppe Wendtner produziert (Pallasch et al., 2008).

In der Software Targetscan (Release4.1) wurden konservierte miRNA-Bindestellen für mehrere miRNAs gefunden. Fünf dieser miRNAs wurden in diesem miRNAs-Array als dereguliert beschrieben. Dies sind die miR-155, -181, -424, -107 und -141. MiR-155, -181, -424, -107 wurden in CLL-Zellen signifikant weniger exprimiert als in peripheren B-Zellen. MiR-141 wurde stärker exprimiert. Damit ist eine veränderte Translation der mRNA von PLAG1 durch veränderte miRNA-Expression wahrscheinlich.

5.2.2 Regulation von miRNA an dem 3'UTR von PLAG1

An den 3'UTR von PLAG1 können potentiell mehrere miRNA binden. In einem Luziferase-Assay wurde getestet, ob die miRNA-Bindestellen für miR-181a, -181b, -107, -424 und -141 funktionell sind (Abschnitt 4.2.3). Bei Kotransfektionen von miRNA und der mit einem Gen für das Enzym *Renilla*-Luziferase fusionierten 3'UTR von PLAG1 konnte ein geringerer Umsatz von Luziferin im Vergleich zu Kontroll-miRNA detektiert werden. Die Menge an umgesetztem Luziferin korreliert mit der Enzymmenge der *Renilla*-

Luziferase. Dies bedeutet, dass jede getestete miRNA an die 3'UTR von PLAG1 binden kann, und die Translation des Proteins hemmt.

Durch eine Mutation der betreffenden Bindestelle konnte keine der getesteten miRNAs mehr an der betreffenden Bindestelle binden. Dadurch konnte eine spezifische Bindung und Regulation der miR-181a, -181b, -107, -424, -141 nachgewiesen werden.

Die Stärke der Repression der Translation ist abhängig von der kotransfizierten miRNA. Die miRNA mit dem stärksten Einfluss auf die Translationseffizienz sind miRNAs 181a/181b. In der 3'UTR von PLAG1 existieren zwei Bindestellen für miR-181. Interessanterweise zeigt eine Mutation der Bindestelle 1 einen stärkeren Effekt auf die Translation als eine Mutation an der Bindestelle 2. Mögliche Erklärungen wären, dass entweder die Basensequenzen der mRNA und miRNA an der Bindestelle 1 stärker homolog sind oder, dass diese Bindestelle für den RISC-Komplex besser zugänglich ist. Der RISC-Komplex könnte mit der miRNA besser an diese Stelle binden und es kann häufiger zu einem Translationsstop kommen (Brennecke et al., 2005; Brown et al., 2005; Friedman et al., 2009).

Auffällig ist, dass die Transfektionen von miRNA mit dem Plasmid, das die mutierte miRNA-Bindestelle trägt eine höhere Luziferase-Expression aufweist als die Kontrolle. Eine Erklärung für die verstärkte Luziferase-Expression könnte die Expression von internen miRNAs sein, die ebenfalls nicht mehr an die miRNA-Bindestelle binden können. Dies führt dazu, dass auch in dem Kontrollexperiment mit funktionsfähigen miRNA-Bindestellen und Kontroll-miR, die Translation durch Binden interner miRNAs herabreguliert wird.

5.2.3 Retransfektion von miRNA in CLL-Zellen

Da in CLL-Zellen eine verringerte miRNA-Expression im Vergleich zu peripheren B-Zellen ermittelt wurde, wurden einige miRNAs in primäre CLL-Zellen retransfiziert und nach 24 h die Apoptoseinduktion in den Zellen gemessen. Da CLL-Zellen durch eine langsame Proliferation und eine fehlende Apoptoseinduktion charakterisiert sind, könnte eine Änderung der Expression für das Überleben der CLL-Zelle relevanter miRNAs, Apoptose auslösen (Nicoloso et al., 2007).

Zu den transfizierten miRNAs gehörten miR-181a/b, -107 und -424. In vier von sechs Proben ist eine verringerte Viabilität der CLL-Zellen zu erkennen. Da kein einheitlicher

Effekt auf die Überlebensrate von CLL-Zellen nachzuweisen ist, könnte dies ein Hinweis auf Untergruppen innerhalb der CLL sein.

Der beobachtete Effekt auf die Überlebensrate der CLL-Zellen ist teilweise gering. Vermutlich ist dies auf die schlechte Transfektionseffizienz von CLL-Zellen zurückzuführen, und auf die Tatsache, dass CLL-Zellen *in vitro* auch ohne Transfektion in Apoptose gehen. Um eine Aussage über die Bedeutung von miRNA im Überleben der CLL-Zelle machen zu können, sollte die Transfektion von CLL-Zellen verbessert werden.

5.2.4 Weiterführende Experimente

Um die Pathogenese der CLL besser zu verstehen, sollte die veränderte miRNA-Expression mit den Prognostischen Gruppen korreliert werden. Interessant wäre auch die miRNA-Expression im Verlauf der Erkrankung, also die verschiedenen Binet-Stadien, zu betrachten. Einblicke in die miRNA-Expression könnten so Hinweise auf die Entstehung und Entwicklung der CLL geben.

Auch in Maus-Modellen könnte der Einfluss von PLAG1 näher betrachtet werden. Interessant wäre die Expression von PLAG1 in TCL1-transgenen Mäusen mit der Expression in Wildtyp Mäusen zu vergleichen. Die TCL1-transgenen Mäuse, überexprimieren das Gen für TCL1 in B-Zellen (Bichi et al., 2002). In CLL-Zellen der aggressiven Verlaufsform ist TCL1 überexprimiert (Herling et al., 2006). Mit dieser Überexpression entwickeln die Mäuse zeitabhängig eine CLL-ähnliche Leukämie, die wie bei CLL charakterisiert ist durch eine CD5-Expression. Dies würde einen weiteren Hinweis für die Bedeutung von PLAG1 in CLL geben. In einem weiteren Schritt können TCL1-transgene Mäuse, die PLAG1 überexprimieren generiert werden.

Auf Gen-Ebene zeigt die 3'UTR von PLAG1 mehrere Bindestellen für miRNA. Um zu verstehen, wie die Translation der mRNA durch unterschiedliche Quantität der jeweiligen miRNAs verändert wird, könnten Kombinationen der miRNAs kotransfiziert werden.

Die Rolle von PLAG1 in CLL könnte auch durch siRNA-Transfektionen in primären CLL-Zellen betrachtet werden. Die technische Durchführung der Transfektion dieser Zellen ist allerdings im Moment noch schwierig, da die Transfektionseffizienz lediglich 20% beträgt.

5.3 Ausblick

Die Ursachen für die Entstehung der CLL sind noch ungeklärt. In den letzten Jahren wurden einige Hypothesen zur Entstehung aufgestellt, jedoch war der eindeutige Nachweis dieser Hypothesen noch nicht möglich. Ein Problem in der CLL-Forschung ist sicherlich, dass nicht geklärt werden kann aus welchem Typ von B-Zellen sich CLL-Zellen entwickeln. Eine Möglichkeit die Ursprungszelle von CLL-Zellen zu erfahren könnte durch Microarrays die die Expression von mRNA, miRNA oder die Methylierung der DNA bestimmen, erfolgen. Dafür müssten auch die unterschiedlichen Arten von B-Zellen aufgereinigt und untersucht werden.

Erschwert werden Experimente mit CLL-Zellen durch die hohe Apoptoserate dieser Zellen nachdem diese *in vitro* kultiviert werden. Es existieren verschiedene Ansätze, um CLL-Zellen länger am Leben zu erhalten, eine Proliferation dieser Zellen ist jedoch kaum zu erreichen.

In dieser Arbeit wurden zwei mögliche Aspekte, die die Pathogenese der CLL beeinflussen könnten, behandelt. Die Rolle der Stimulierung des Transmembranrezeptors CD5 in der CLL scheint im Vergleich zur BZR-Stimulation, soweit die experimentellen Rahmenbedingungen physiologische Verhältnisse widerspiegeln, einen geringen Einfluss auf die Biologie der Zelle zu haben. Hier wäre es wichtig Stimulierungen mit dem physiologischen Liganden durchzuführen.

Die Anwesenheit von CD5 zeigt in Vergleich zu CD5-negativen Zellen einen Einfluss auf die Proteinexpression in Zelllinien und auf die Proliferation dieser Zellen. Möglicherweise könnten diese Erkenntnisse durch einen mRNA-Array weiter ausgebaut werden.

Die Quantifizierung von miRNA in CLL-Zellen gibt einen neuen Ansatzpunkt, um die veränderte Proteinexpression in CLL zu verstehen. So konnte gezeigt werden, dass die 3'UTR von PLAG1 durch miRNA reguliert werden kann. Durch eine verminderte Expression dieser miRNAs in CLL-Zellen kann so die Überexpression von PLAG1 in CLL-Zellen erklärt werden. Da PLAG1 bereits als Proto-Onkogen charakterisiert ist, könnte auch in CLL-Zellen eine Deregulation von PLAG1 einen Beitrag zur Pathogenese der CLL beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Abram, C.L., and Courtneidge, S.A. (2000) Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res*, 254(1), 1-13.

Abrams, S.T., Lakum, T., Lin, K., Jones, G.M., Treweeke, A.T., Farahani, M., Hughes, M., Zuzel, M., and Slupsky, J.R. (2007) B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase CbetaII. *Blood*, 109(3), 1193-1201.

Alberola-Ila, J., Places, L., Lozano, F., and Vives, J. (1993) Association of an activation inducible serine kinase activity with CD5. *J Immunol*, 151(9), 4423-4430.

Alkan, S., Huang, Q., Ergin, M., Denning, M.F., Nand, S., Maududi, T., Paner, G.P., Ozpuyan, F., and Izban, K.F. (2005) Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukemia and determination of isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition. *Am J Hematol*, 79(2), 97-106.

Allsup, D., Harris, R., Baker, P., and Cawley, J. (2008) Protein-tyrosine phosphatase activity maintains the viability of hairy cells and modulates their response to interferon-alpha. *Leuk Lymphoma*, 49(12), 2351-2358.

Allsup, D.J., Kamiguti, A.S., Lin, K., Sherrington, P.D., Matrai, Z., Slupsky, J.R., Cawley, J.C., and Zuzel, M. (2005) B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, 65(16), 7328-7337.

Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.

Bernal, A., Pastore, R.D., Asgary, Z., Keller, S.A., Cesarman, E., Liou, H.C., and Schattner, E.J. (2001) Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood*, 98(10), 3050-3057.

Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 127-152.

Besson, A., and Yong, V.W. (2000) Involvement of p21(Waf1/Cip1) in protein kinase C alpha-induced cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, 20(13), 4580-4590.

- Bi, Y., Liu, G., and Yang, R. (2009) MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *J Cell Physiol*, 218(3), 467-472.
- Biancone, L., Bowen, M.A., Lim, A., Aruffo, A., Andres, G., and Stamenkovic, I. (1996) Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J Exp Med*, 184(3), 811-819.
- Bichi, R., Shinton, S.A., Martin, E.S., Koval, A., Calin, G.A., Cesari, R., Russo, G., Hardy, R.R., and Croce, C.M. (2002) Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10), 6955-6960.
- Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J.R., Tarakhovsky, A., and Bondada, S. (1996) CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science*, 274(5294), 1906-1909.
- Bikah, G., Lynd, F.M., Aruffo, A.A., Ledbetter, J.A., and Bondada, S. (1998) A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *Int Immunol*, 10(8), 1185-1196.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), 185-191.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12), 1097-1101.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3), e85.
- Brown, K.M., Chu, C.Y., and Rana, T.M. (2005) Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat Struct Mol Biol*, 12(5), 469-470.
- Brown, M.T., and Cooper, J.A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*, 1287(2-3), 121-149.
- Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*, 12(3), 541-552.

- Burgess, K.E., Yamamoto, M., Prasad, K.V., and Rudd, C.E. (1992) CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor complex comprising T-cell receptor zeta chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(19), 9311-9315.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957-1966.
- Caligaris-Cappio, F., and Ghia, P. (2008) Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol*, 26(27), 4497-4503.
- Calin, G.A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Shimizu, M., Taccioli, C., Zanesi, N., Garzon, R., Aqeilan, R.I., Alder, H., Volinia, S., Rassenti, L., Liu, X., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., and Croce, C.M. (2008) MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(13), 5166-5171.
- Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6(11), 857-866.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and Croce, C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15524-15529.
- Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., and Croce, C.M. (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 353(17), 1793-1801.
- Calvo, J., Places, L., Padilla, O., Vila, J.M., Vives, J., Bowen, M.A., and Lozano, F. (1999) Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *Eur J Immunol*, 29(7), 2119-2129.
- Calvo, J., Vilda, J.M., Places, L., Simarro, M., Padilla, O., Andreu, D., Campbell, K.S., Aussel, C., and Lozano, F. (1998) Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J Immunol*, 161(11), 6022-6029.

- Cartwright, R.A., Gurney, K.A., and Moorman, A.V. (2002) Sex ratios and the risks of haematological malignancies. *Br J Haematol*, 118(4), 1071-1077.
- Ceuppens, J.L., and Baroja, M.L. (1986) Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J Immunol*, 137(6), 1816-1821.
- Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2002) Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(13), 4609-4614.
- Chiang, G.G., and Sefton, B.M. (2001) Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*, 276(25), 23173-23178.
- Chiorazzi, N. (2007) Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20(3), 399-413.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 352(8), 804-815.
- Cioca, D.P., and Kitano, K. (2002) Apoptosis induction by hypercross-linking of the surface antigen CD5 with anti-CD5 monoclonal antibodies in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 16(3), 335-343.
- Contri, A., Brunati, A.M., Trentin, L., Cabrelle, A., Miorin, M., Cesaro, L., Pinna, L.A., Zambello, R., Semenzato, G., and Donella-Deana, A. (2005) Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*, 115(2), 369-378.
- Daley, G.Q., and Baltimore, D. (1988) Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23), 9312-9316.
- Damle, R.N., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Fais, F., Yan, X.J., Sison, C.P., Allen, S.L., Kolitz, J., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Budde, P., Frey, J., Rai, K.R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2002) B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*, 99(11), 4087-4093.

- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1840-1847.
- Declercq, J., Van Dyck, F., Braem, C.V., Van Valckenborgh, I.C., Voz, M., Wassef, M., Schoonjans, L., Van Damme, B., Fiette, L., and Van de Ven, W.J. (2005) Salivary gland tumors in transgenic mice with targeted PLAG1 proto-oncogene overexpression. *Cancer Res*, 65(11), 4544-4553.
- Deglesne, P.A., Chevallier, N., Letestu, R., Baran-Marszak, F., Beitar, T., Salanoubat, C., Sanhes, L., Nataf, J., Roger, C., Varin-Blank, N., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (2006) Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*, 66(14), 7158-7166.
- Deng, S., Calin, G.A., Croce, C.M., Coukos, G., and Zhang, L. (2008) Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle*, 7(17), 2643-2646.
- Dennehy, K.M., Ferris, W.F., Veenstra, H., Zuckerman, L.A., Killeen, N., and Beyers, A.D. (2001) Determination of the tyrosine phosphorylation sites in the T cell transmembrane glycoprotein CD5. *Int Immunol*, 13(2), 149-156.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343(26), 1910-1916.
- Elleman, T.C., Domagala, T., McKern, N.M., Nerrie, M., Lonnqvist, B., Adams, T.E., Lewis, J., Lovrecz, G.O., Hoyne, P.A., Richards, K.M., Howlett, G.J., Rothacker, J., Jorissen, R.N., Lou, M., Garrett, T.P., Burgess, A.W., Nice, E.C., and Ward, C.W. (2001) Identification of a determinant of epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using a truncated, high-affinity form of the ectodomain. *Biochemistry*, 40(30), 8930-8939.
- Engels, B.M., and Hutvagner, G. (2006) Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene*, 25(46), 6163-6169.

- Fayad, L., Keating, M.J., Reuben, J.M., O'Brien, S., Lee, B.N., Lerner, S., and Kurzrock, R. (2001) Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*, 97(1), 256-263.
- Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.S., Leahy, D.J., and Lemmon, M.A. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell*, 11(2), 507-517.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19(1), 92-105.
- Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavolaro, S., Castellano, L., Magrelli, A., Citarella, F., Messina, M., Maggio, R., Peragine, N., Santangelo, S., Mauro, F.R., Landgraf, P., Tuschl, T., Weir, D.B., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Guarini, A., Foa, R., and Macino, G. (2007) Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 109(11), 4944-4951.
- Gary-Gouy, H., Bruhns, P., Schmitt, C., Dalloul, A., Daeron, M., and Bismuth, G. (2000) The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling. *J Biol Chem*, 275(1), 548-556.
- Gary-Gouy, H., Harriague, J., Bismuth, G., Platzer, C., Schmitt, C., and Dalloul, A.H. (2002) Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood*, 100(13), 4537-4543.
- Gary-Gouy, H., Sainz-Perez, A., Marteau, J.B., Marfaing-Koka, A., Delic, J., Merle-Beral, H., Galanaud, P., and Dalloul, A. (2007) Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. *J Immunol*, 179(7), 4335-4344.
- Ghia, P., Chiorazzi, N., and Stamatopoulos, K. (2008) Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*, 264(6), 549-562.

- Ghia, P., Ferreri, A.M., and Galigaris-Cappio, F. (2007) Chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 64(3), 234-246.
- Ghiotto, F., Fais, F., Valetto, A., Albesiano, E., Hashimoto, S., Dono, M., Ikematsu, H., Allen, S.L., Kolitz, J., Rai, K.R., Nardini, M., Tramontano, A., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2004) Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*, 113(7), 1008-1016.
- Griffith, L.C., Schulman, H., and Tagawa, M. (1989) In vivo and in vitro phosphorylation of murine lymphocyte differentiation antigen CD5. *Biochem Biophys Res Commun*, 159(2), 536-541.
- Hamblin, A.D., and Hamblin, T.J. (2008) The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br Med Bull*, 87, 49-62.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1848-1854.
- Hausherr, A., Tavares, R., Schaffer, M., Obermeier, A., Miksch, C., Mitina, O., Ellwart, J., Hallek, M., and Krause, G. (2007) Inhibition of IL-6-dependent growth of myeloma cells by an acidic peptide repressing the gp130-mediated activation of Src family kinases. *Oncogene*, 26(34), 4987-4998.
- Hensen, K., Van Valckenborgh, I.C., Kas, K., Van de Ven, W.J., and Voz, M.L. (2002) The tumorigenic diversity of the three PLAG family members is associated with different DNA binding capacities. *Cancer Res*, 62(5), 1510-1517.
- Herling, M., Patel, K.A., Khalili, J., Schlette, E., Kobayashi, R., Medeiros, L.J., and Jones, D. (2006) TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia*, 20(2), 280-285.
- Hunter, T. (1987) A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell*, 49(1), 1-4.
- Imyanitov, E.N. (2009) Gene polymorphisms, apoptotic capacity and cancer risk. *Hum Genet*, 125(3), 239-246.
- Ingle, E. (2008) Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1784(1), 56-65.

- Itoh, K., and Hirohata, S. (1995) The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol*, 154(9), 4341-4350.
- Jiang, A., Craxton, A., Kurosaki, T., and Clark, E.A. (1998) Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Exp Med*, 188(7), 1297-1306.
- Jones, M.L., Craik, J.D., Gibbins, J.M., and Poole, A.W. (2004) Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J Biol Chem*, 279(39), 40475-40483.
- Jopling, C.L. (2008) Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 6), 1220-1223.
- June, C.H., Rabinovitch, P.S., and Ledbetter, J.A. (1987) CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J Immunol*, 138(9), 2782-2792.
- Kas, K., Voz, M.L., Hensen, K., Meyen, E., and Van de Ven, W.J. (1998) Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem*, 273(36), 23026-23032.
- Kas, K., Voz, M.L., Roijer, E., Astrom, A.K., Meyen, E., Stenman, G., and Van de Ven, W.J. (1997) Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nat Genet*, 15(2), 170-174.
- Kefalas, P., Brown, T.R., and Brickell, P.M. (1995) Signalling by the p60c-src family of protein-tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 27(6), 551-563.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 15(20), 2654-2659.
- Kim, S.Z., Chow, K.U., Kukoc-Zivojnov, N., Boehrer, S., Brieger, A., Steimle-Grauer, S.A., Harder, L., Hoelzer, D., Mitrou, P.S., and Weidmann, E. (2004) Expression of ZAP-70 protein correlates with disease stage in chronic lymphocytic leukemia and is associated with, but not generally restricted to, non-mutated Ig VH status. *Leuk Lymphoma*, 45(10), 2037-2045.

- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., Neri, A., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2001) Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*, 194(11), 1625-1638.
- Lankester, A.C., van Schijndel, G.M., van der Schoot, C.E., van Oers, M.H., van Noesel, C.J., and van Lier, R.A. (1995) Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 86(3), 1090-1097.
- Lecomte, O., Bock, J.B., Birren, B.W., Vollrath, D., and Parnes, J.R. (1996) Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes. *Immunogenetics*, 44(5), 385-390.
- Lehvaslaiho, H., Lehtola, L., Sistonen, L., and Alitalo, K. (1989) A chimeric EGF-R-neu proto-oncogene allows EGF to regulate neu tyrosine kinase and cell transformation. *EMBO J*, 8(1), 159-166.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15-20.
- Lin, S.L., Miller, J.D., and Ying, S.Y. (2006) Intronic MicroRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol*, 2006(4), 26818.
- Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L., Gallart, T., and Vives, J. (1990) Phosphorylation-mediated changes in the electrophoretic mobility of CD5 molecules. *Eur J Biochem*, 193(2), 469-477.
- Lozano, F., Simarro, M., Calvo, J., Vila, J.M., Padilla, O., Bowen, M.A., and Campbell, K.S. (2000) CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Crit Rev Immunol*, 20(4), 347-358.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., and Golub, T.R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834-838.
- Majolini, M.B., D'Elis, M.M., Galieni, P., Boncristiano, M., Lauria, F., Del Prete, G., Telford, J.L., and Baldari, C.T. (1998) Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 91(9), 3390-3396.

- Martin, F., and Kearney, J.F. (2001) B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol*, 13(2), 195-201.
- Marton, S., Garcia, M.R., Robello, C., Persson, H., Trajtenberg, F., Pritsch, O., Rovira, C., Naya, H., Dighiero, G., and Cayota, A. (2008) Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia*, 22(2), 330-338.
- Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007) Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*, 315(5818), 1576-1579.
- Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.S., Tam, W.L., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, 126(6), 1203-1217.
- Monroe, J.G. (2006) ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol*, 6(4), 283-294.
- Mustelin, T., Rahmouni, S., Bottini, N., and Alonso, A. (2003) Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation. *Immunol Rev*, 191, 139-147.
- Nakagawa, R., Soh, J.W., and Michie, A.M. (2006) Subversion of protein kinase C alpha signaling in hematopoietic progenitor cells results in the generation of a B-cell chronic lymphocytic leukemia-like population in vivo. *Cancer Res*, 66(1), 527-534.
- Nedellec, S., Renaudineau, Y., Bordron, A., Berthou, C., Porakishvili, N., Lydyard, P.M., Pers, J.O., and Youinou, P. (2005) B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol*, 174(6), 3749-3756.
- Nicoloso, M.S., Kipps, T.J., Croce, C.M., and Calin, G.A. (2007) MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 139(5), 709-716.
- Nihiro, H., and Clark, E.A. (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*, 2(12), 945-956.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008) Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 8(1), 34-47.

Ohkusu, K., Du, J., Isobe, K.I., Yi, H., Akhand, A.A., Kato, M., Suzuki, H., Hidaka, H., and Nakashima, I. (1997) Protein kinase C alpha-mediated chronic signal transduction for immunosenescence. *J Immunol*, 159(5), 2082-2084.

Orom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 30(4), 460-471.

Pallasch, C.P., Schwamb, J., Konigs, S., Schulz, A., Debey, S., Kofler, D., Schultze, J.L., Hallek, M., Ultsch, A., and Wendtner, C.M. (2008) Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 22(3), 585-592.

Pandiella, A., Lehvaslaiho, H., Magni, M., Alitalo, K., and Meldolesi, J. (1989) Activation of an EGFR/neu chimeric receptor: early intracellular signals and cell proliferation responses. *Oncogene*, 4(11), 1299-1305.

Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A., and Kosik, K.S. (2008) MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res*, 68(19), 8164-8172.

Papavasiliou, F., Jankovic, M., Suh, H., and Nussenzweig, M.C. (1995) The cytoplasmic domains of immunoglobulin (Ig) alpha and Ig beta can independently induce the precursor B cell transition and allelic exclusion. *J Exp Med*, 182(5), 1389-1394.

Payelle-Brogard, B., Magnac, C., Alcover, A., Roux, P., and Dighiero, G. (2002) Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 118(4), 976-985.

Pekarsky, Y., Santanam, U., Cimmino, A., Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Volinia, S., Alder, H., Liu, C.G., Rassenti, L., Calin, G.A., Hagan, J.P., Kipps, T., and Croce, C.M. (2006) Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*, 66(24), 11590-11593.

Perez-Chacon, G., Vargas, J.A., Jorda, J., Alvarez, N., Martin-Donaire, T., Rosado, S., Losada-Fernandez, I., Rebolleda, N., and Perez-Aciego, P. (2007a) CD5 does not regulate the signaling triggered through BCR in B cells from a subset of B-CLL patients. *Leuk Lymphoma*, 48(1), 147-157.

Perez-Chacon, G., Vargas, J.A., Jorda, J., Morado, M., Rosado, S., Martin-Donaire, T., Losada-Fernandez, I., Rebolleda, N., and Perez-Aciego, P. (2007b) CD5 provides viability

signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leuk Res*, 31(2), 183-193.

Perez-Villar, J.J., Whitney, G.S., Bowen, M.A., Hewgill, D.H., Aruffo, A.A., and Kanner, S.B. (1999) CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol*, 19(4), 2903-2912.

Pers, J.O., Berthou, C., Porakishvili, N., Burdjanadze, M., Le Calvez, G., Abgrall, J.F., Lydyard, P.M., Youinou, P., and Jamin, C. (2002) CD5-induced apoptosis of B cells in some patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 16(1), 44-52.

Pers, J.O., Jamin, C., Le Corre, R., Lydyard, P.M., and Youinou, P. (1998) Ligation of CD5 on resting B cells, but not on resting T cells, results in apoptosis. *Eur J Immunol*, 28(12), 4170-4176.

Petlickovski, A., Laurenti, L., Li, X., Marietti, S., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2005) Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 105(12), 4820-4827.

Piccinini, G., Bacchiocchi, R., Serresi, M., Vivani, C., Rossetti, S., Gennaretti, C., Carbonari, D., and Fazioli, F. (2002) A ligand-inducible epidermal growth factor receptor/anaplastic lymphoma kinase chimera promotes mitogenesis and transforming properties in 3T3 cells. *J Biol Chem*, 277(25), 22231-22239.

Queimado, L., Lopes, C., Du, F., Martins, C., Bowcock, A.M., Soares, J., and Lovett, M. (1999) Pleomorphic adenoma gene 1 is expressed in cultured benign and malignant salivary gland tumor cells. *Lab Invest*, 79(5), 583-589.

Raab, M., Yamamoto, M., and Rudd, C.E. (1994) The T-cell antigen CD5 acts as a receptor and substrate for the protein-tyrosine kinase p56lck. *Mol Cell Biol*, 14(5), 2862-2870.

Rana, T.M. (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1), 23-36.

Redaelli, A., Laskin, B.L., Stephens, J.M., Botteman, M.F., and Pashos, C.L. (2004) The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 13(3), 279-287.

- Renaudineau, Y., Nedellec, S., Berthou, C., Lydyard, P.M., Youinou, P., and Pers, J.O. (2005) Role of B-cell antigen receptor-associated molecules and lipid rafts in CD5-induced apoptosis of B CLL cells. *Leukemia*, 19(2), 223-229.
- Riedel, H., Dull, T.J., Honegger, A.M., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1989) Cytoplasmic domains determine signal specificity, cellular routing characteristics and influence ligand binding of epidermal growth factor and insulin receptors. *EMBO J*, 8(10), 2943-2954.
- Riedel, H., Dull, T.J., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1986) A chimaeric receptor allows insulin to stimulate tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor. *Nature*, 324(6092), 68-70.
- Riese, D.J., 2nd, van Raaij, T.M., Plowman, G.D., Andrews, G.C., and Stern, D.F. (1995) The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol*, 15(10), 5770-5776.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 14(10A), 1902-1910.
- Rozman, C., and Montserrat, E. (1995) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 333(16), 1052-1057.
- Rudich, S.M., Winchester, R., and Mongini, P.K. (1985) Human B cell activation. Evidence for diverse signals provided by various monoclonal anti-IgM antibodies. *J Exp Med*, 162(4), 1236-1255.
- Schaeffer, M., Schneiderbauer, M., Weidler, S., Tavares, R., Warmuth, M., de Vos, G., and Hallek, M. (2001) Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk kinases. *Mol Cell Biol*, 21(23), 8068-8081.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19(5), 621-626.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58-63.

- Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, C., and Bondada, S. (1999) Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol*, 29(10), 3319-3328.
- Shaffer, A.L., Rosenwald, A., and Staudt, L.M. (2002) Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 2(12), 920-932.
- Shi, L., Cheng, Z., Zhang, J., Li, R., Zhao, P., Fu, Z., and You, Y. (2008) hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res*, 1236, 185-193.
- Simarro, M., Pelassy, C., Calvo, J., Places, L., Aussel, C., and Lozano, F. (1997) The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J Immunol*, 159(9), 4307-4315.
- Spertini, F., Stohl, W., Ramesh, N., Moody, C., and Geha, R.S. (1991) Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD5. *J Immunol*, 146(1), 47-52.
- Stacchini, A., Aragno, M., Vallario, A., Alfarano, A., Circosta, P., Gottardi, D., Faldella, A., Rege-Cambrin, G., Thunberg, U., Nilsson, K., and Caligaris-Cappio, F. (1999) MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res*, 23(2), 127-136.
- Su, X., Lucas, D.M., Zhang, L., Xu, H., Zabrouskov, V., Davis, M.E., Knapp, A.R., Young, D.C., Payne, P.R., Parthun, M.R., Marcucci, G., Grever, M.R., Byrd, J.C., and Freitas, M.A. (2009) Validation of an LC-MS based approach for profiling histones in chronic lymphocytic leukemia. *Proteomics*, 9(5), 1197-1206.
- Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., and Kurosaki, T. (1994) Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J*, 13(6), 1341-1349.
- Tedder, T.F., Inaoki, M., and Sato, S. (1997) The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity*, 6(2), 107-118.
- Teh, Y.M., and Neuberger, M.S. (1997) The immunoglobulin (Ig)alpha and Igbeta cytoplasmic domains are independently sufficient to signal B cell maturation and activation in transgenic mice. *J Exp Med*, 185(10), 1753-1758.

- Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 513-609.
- Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J.P., and Tybulewicz, V.L. (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today*, 21(3), 148-154.
- Unkeless, J.C., and Jin, J. (1997) Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr Opin Immunol*, 9(3), 338-343.
- Van de Velde, H., and Thielemans, K. (1996) Native soluble CD5 delivers a costimulatory signal to resting human B lymphocytes. *Cell Immunol*, 172(1), 84-91.
- Van Dyck, F., Declercq, J., Braem, C.V., and Van de Ven, W.J. (2007) PLAG1, the prototype of the PLAG gene family: versatility in tumour development (review). *Int J Oncol*, 30(4), 765-774.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858), 1931-1934.
- Vella, M.C., Choi, E.Y., Lin, S.Y., Reinert, K., and Slack, F.J. (2004) The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev*, 18(2), 132-137.
- Vila, J.M., Gimferrer, I., Padilla, O., Arman, M., Places, L., Simarro, M., Vives, J., and Lozano, F. (2001) Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol*, 31(4), 1191-1198.
- Voz, M.L., Agten, N.S., Van de Ven, W.J., and Kas, K. (2000) PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res*, 60(1), 106-113.
- Voz, M.L., Mathys, J., Hensen, K., Pendeville, H., Van Valckenborgh, I., Van Huffel, C., Chavez, M., Van Damme, B., De Moor, B., Moreau, Y., and Van de Ven, W.J. (2004) Microarray screening for target genes of the proto-oncogene PLAG1. *Oncogene*, 23(1), 179-191.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., and Harrison, S.C. (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell*, 3(5), 629-638.

Zanette, D.L., Rivadavia, F., Molfetta, G.A., Barbuzano, F.G., Proto-Siqueira, R., Silva-Jr, W.A., Falcao, R.P., and Zago, M.A. (2007) miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res*, 40(11), 1435-1440.

Zhang, X., Cairns, M., Rose, B., O'Brien, C., Shannon, K., Clark, J., Gamble, J., and Tran, N. (2009) Alterations in miRNA processing and expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland. *Int J Cancer*, 124(12), 2855-2863.

Zomas, A.P., Matutes, E., Morilla, R., Owusu-Ankomah, K., Seon, B.K., and Catovsky, D. (1996) Expression of the immunoglobulin-associated protein B29 in B cell disorders with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Leukemia*, 10(12), 1966-1970.

Zupo, S., Massara, R., Dono, M., Rossi, E., Malavasi, F., Cosulich, M.E., and Ferrarini, M. (2000) Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood*, 95(4), 1199-1206.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonic Acid
bp	Basenpaare
BS3	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BZR	B-Zell-Rezeptor
C	Carboxy-
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler wachstums Faktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EPO	Erythropoetin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Fötale Rinderserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
Hmga2	High Mobility Group 2A
HRP	Horseradish-Peroxidase
HumanMi_V2	Name des in der Medizinischen Klinik 1, Köln durchgeführten miRNA-Arrays
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif
kB	Kilobasenpaare
Lck	Lymphocyte-specific Protein Tyrosine Kinase

miRNA	microRNA
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PKC	Protein Kinase C
pY	Phosphoryliertes Tyrosin
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
RT-PCR	Real-Time PCR
SHP-1	SH2 Containing Protein Tyrosine Phosphatase
SSC	Sideward Scatter
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphin
TGF α	Transforming growth factor α
TZR	T-Zell-Rezeptor
üN	Über Nacht
UTR	Untranslated Region
v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
X	Beliebige Aminosäure
ZAP70	Zeta-Chain-Associated Protein Kinase 70

Nukleotide werden durch die Anfangsbuchstaben der Basen dargestellt:

A: Adenin G: Guanin

C: Cytosin T: Thymin

Aminosäuren werden im Einbuchstabencode dargestellt:

Alanin A; Arginin R; Asparagin N; Asparaginsäure D; Cystein C; Glutamin Q;
Glutaminsäure E; Glycin G; Histidin H; Isoleucin I; Leucin L; Lysin K; Methionin M;
Phenylalanin F; Prolin P; Serin S; Threonin T; Tryptophan W; Tyrosin Y

Abbildungverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der molekularen Umgebung von CD5.....	8
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von CD5 und den möglichen Phosphorylierungs- motiven.....	9
Abbildung 1.3: Biogenese und Funktion von miRNA	15
Abbildung 4.1: Expression von CD5-EGFR auf stabil transfizierten Mec1-Klonen.....	41
Abbildung 4.2: CD5-EGFR dimerisiert nach Zugabe von EGF	43
Abbildung 4.3: Zeitverlauf der Tyrosinphosphorylierung in Mec1-Klonen nach EGF- Behandlung.....	44
Abbildung 4.4: Die Basisphosphorylierung am aktivierenden Tyrosin ist in Mec1-Klon CD5-EGFR herabgesetzt	46
Abbildung 4.5: Die Kinaseaktivität von Lck wird durch Zugabe von EGF im Mec1-Klon CD5-EGFR1 nicht beeinflusst.....	47
Abbildung 4.6: Die Zugabe von EGF zeigt keinen Einfluss auf das Wachstum von Mec1- Klon CD5-EGFR3	49
Abbildung 4.7: Die Zugabe des Liganden EGF induziert in EGFR, aber nicht CD5-EGFR transfizierten BA/F3-Zellen IL-3 unabhängiges Wachstum.....	50
Abbildung 4.8: BZR-Stimulation führt in primären CLL-Zellen zu einem verbesserten Überleben, jedoch nicht in Mec1-Klonen.....	51
Abbildung 4.9: Stimulationen mit Anti-CD5 Antikörpern können in primären CLL-Zellen zu einer verstärkten Viabilität führen	53
Abbildung 4.10: SHP1 ist konstitutiv mit CD5 assoziiert.....	54
Abbildung 4.11: CD5 ist in Mec1-Klonen phosphoryliert	55
Abbildung 4.12: Charakterisierung CD5-positiver und -negativer Zelllinien auf Lysat- Ebene	57
Abbildung 4.13: Die Expression der klassischen PKC-Isoformen ist in CD5-positiven Mec1-Zellen herabgesetzt.....	59
Abbildung 4.14: Das PKC α mRNA-Level ist in CD5-transfizierten Zelllinien herunterreguliert.	60
Abbildung 4.15: Die Expression von CD5 zeigt keinen einheitlichen Einfluss auf die IL-10 mRNA-Expression	63
Abbildung 4.16: Die CD5-Expression zeigt einen Einfluss auf die metabolische Aktivität in Mec1-Zellen.....	64

Abbildung 4.17: Der 3'UTR von PLAG1 besitzt mehrere miRNA-Bindestellen.....	66
Abbildung 4.18: CLL-Zellen haben eine erhöhte Expression von PLAG1	67
Abbildung 4.19: Die 3'UTR von PLAG1 beinhaltet funktionale Bindestellen für miRNAs	68
Abbildung 4.20: Nach Retransfektion von miRNA in primäre CLL-Zellen zeigen viele Proben eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Hersteller benutzter Plastikware, die nicht von Sarstedt bezogen wurden.	21
Tabelle 2.2: Hersteller benutzter Reagenzien	22
Tabelle 2.3: Hersteller benutzter Baukästen	22
Tabelle 2.4: Hersteller benutzter Antikörper	23
Tabelle 2.5: Hersteller verwendeter Restriktionsenzyme	24
Tabelle 2.6: Bezugsquellen benutzter Zelllinien	24
Tabelle 2.7: Bezugsquelle der verwendeten Plasmide.....	24
Tabelle 2.8: Sequenzen der verwendeten Primer.....	25
Tabelle 2.9: Hersteller verwendeter Geräte	26
Tabelle 2.10: Rezeptur verwendeter Puffer	26
Tabelle 3.1: Sequenzen der miRNA und mutierten miRNA-Bindestellen.	30
Tabelle 3.2: Blastizidin-Konzentrationen zur Selektion stabiler Klone.	31
Tabelle 3.3: Verwendete Mengen von Antikörper für Immunopräzipitationen.....	36

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Hallek für die Möglichkeit, in seinem Institut meine Doktorarbeit durchzuführen sowie seinem Interesse an dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Günter Krause für die vielen Diskussionen während der Betreuung in den letzten Jahren und seine unermüdliche Geduld mit mir. Danke auch für die Unterstützungen, um Kongresse und Fortbildungen zu besuchen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. Nischt für ihr Interesse, die Entwicklungen meiner Doktorarbeit mitzuverfolgen und für die Zeit, mich regelmäßig zu treffen und mir neue Denkanstöße zu geben. Vielen Dank auch an Prof. Langer für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Kloppenburg für die Übernahme des Vorsitzes. Nina danke ich für die Übernahme der Beisitzerin.

Bedanken möchte ich mich auch bei Christian Pallasch und Prof. Wendtner für die Möglichkeit an dem PLAG1-Projekt mitzuarbeiten. Die Zusammenarbeit war sehr motivierend. Ein besonderer Dank gilt auch Aditya für die Diskussionen und wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Ein großer Dank geht auch an alle KollegInnen von Haus 16 für die wissenschaftliche und seelische Unterstützung in den letzten Jahren. Tanja, Luise, Alex, Anne, ASV, Sharam, Nadine, Sonja, Nela, Bianka, Janine, Ingrid, Sara, Jens, Mag, Nche, Michael, Eisei, Mirela, Nadia und Lukas. Es war toll im Haus 16 mit so hilfsbereiten Kollegen zu arbeiten. Danke für die vielen abwechslungsreichen Gespräche mit Euch, die lustigen Stammtische, Karneval und auch Diskussionen über Methoden und Theorien unserer Arbeit. Danken möchte ich auch Julia und Reinhild unter anderem für die Aufbereitung der Patientenproben. Bei Sabine möchte ich mich unter anderem für das Korrekturlesen bedanken.

Danken möchte ich auch noch Alea für ihren freundschaftlichen und Amparo für ihren wissenschaftlichen Beistand.

Vielen Dank auch meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit gar nicht möglich gewesen wären, und meiner Schwester für Unterstützungen in jeglicher Hinsicht. Danke auch meinen Großeltern und ihrem Glauben an mich. Bedanken möchte ich mich auch bei Tim für sein Interesse, seit Jahren mit mir über CLL, CD5 und seit kürzerem auch miRNAs zu diskutieren.

DANKE!

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau PD Dr. Nischt und Herrn Dr. Krause betreut worden.

Teilpublikationen (Submitted):

Pallasch CP, Patz M, Hagist S, Schulz A, Claasen J, Kutsch N, Königs SK, Eggle D, Debey S, Krause G, Mayr C, Schultze JL, Hallek M, Wendtner CM. Deregulation of miRNA clusters disrupts suppression of PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. Submitted

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Michaela Gabriele Patz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

Seit 01.2006	Weiterführende Arbeiten in der Arbeitsgruppe „CD5-Signaltransduktion“ von Dr. Krause an der Medizinischen Klinik I, Uniklinik Köln
05.2005-12.2005	Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe „CD5-Signaltransduktion“ von Dr. Krause an dem gsf-Forschungszentrum in München
04.2005	Aushändigung des Diplomzeugnisses (Note: sehr gut)
06.2004-03.2005	Fertigung der Diplomarbeit „Ligandenabhängige Rekrutierung der Corezeptoren LCoR und Alien an den humanen Androgenrezeptor“ am Institut für Genetik, Justus-Liebig-Universität Giessen, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Aria Baniahmad
05.2004	Diplom-Hauptprüfungen
04.2002	Vordiplom an der Justus-Liebig-Universität in Giessen (Note: gut)
10.1999	Beginn des Studienganges Biologie
06.1999	Abitur am Grimmelshausen-Gymnasium Gelnhausen

Fortbildungen/Posterpräsentationen:

Targeting the Kinome, 4-6.12.2006, Basel (Posterpräsentation)

Mini-Symposium „Gene-Silencing“, 27.2.2007, Life&Brain Center, Bonn

European Bioperspectives, 30.05-1.06.2007, Köln

Molecular Mechanism of Signal Transduction and Cancer, FEBS-EMBO Advanced Lecture Course, 15-24.08.2007, Spetses, Griechenland (Posterpräsentation)

Vortrag:

DGHO, 14.10.2008, Wien

Apoptoseinduktion in CLL-Zellen *in vitro* durch Behandlung mit dem Src- und Abl-Kinase-Inhibitor Dasatinib.

Publikationen:

Veldurthy A, Patz M, Hagist S, Pallasch CP, Wendtner CM, Hallek M, Krause G. The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis *in vitro* in chronic lymphocytic leukemia cells with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. *Blood* 2008

Pallasch CP, Patz M, Hagist S, Schulz A, Claasen J, Kutsch N, Königs SK, Eggle D, Debey S, Krause G, Mayr C, Schultze JL, Hallek M, Wendtner CM. Deregulation of miRNA clusters disrupts suppression of PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009

Patz M, Gehrke I, Müller B, Claasen J, Pallasch C, Cielsa M, Kreuzer K-A, Wendtner C, Hallek M, Krause G. *In vitro* assessment of sorafenib effects on CLL cells. In preparation

Patz M, Forcob N, Müller B, Hallek M, Krause G. Comparison of the *in vitro* effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukemia cells. In preparation