

## Zellzyklus-Deregulation und tumorspezifisch aktivierte Signaltransduktionswege in malignen Lymphomen

Falko Fend  
Leticia Q-M de Fend

### Wissenschaftliche Grundlagen

Unsere Arbeitsgruppe befasst sich mit zwei Typen von Non-Hodgkin-Lymphomen, dem ALK-positiven großzellig-anaplastischen T-Zelllymphom (ALCL) und dem Mantelzelllymphom (MCL), die paradigmatisch für das aktuelle Dilemma der auf molekulare Zielstrukturen ausgerichteten therapeutischen Ansätze stehen. Obwohl bei beiden Lymphomen die primäre, tumordefinierende genetische Aberration bekannt ist, sind die pathogenetischen Mechanismen und ihre Bedeutung für die Tumorentstehung und -progression nur zum Teil entschlüsselt. Beim ALCL identifizierten wir den Transkriptionsfaktor C/EBP als spezifischen Marker und Zielmolekül der onkogenen ALK-Kinase. C/EBP ist von zentraler Bedeutung für Proliferation und Überleben der Tumorzellen und spielt möglicherweise für den eigenartigen Phänotyp dieses Lymphoms mit Verlust von T-Zell- und Hochregulation von Makrophagenmarkern eine wichtige Rolle. Das MCL ist durch die Überexpression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 gekennzeichnet. Die mechanistische Erklärung, dass es dadurch zu einer Deregulation des Zellzyklus mit ungehemmter Proliferation kommt, erklärt die Pathogenese des MCL nur unzureichend. Wir konnten zeigen, dass die spezifische Blockade von Cyclin D1 in MCL-Zelllinien nur geringe Auswirkungen auf Proliferation und Vitalität der Tumorzellen hat, da es zu einer kompensatorischen Hochregulation von Cyclin D2 kommt, was die bisherigen unbefriedigenden Ergebnisse entsprechender klinischer Therapieansätze mit erklären könnte.

### Ziele

Die klinische Wirksamkeit gezielter Therapieansätze bei malignen Lymphomen wird durch redundante Aktivierung von überlebensrelevanten Signalkaskaden, sekundäre genetische Alterationen und Resistenzentwicklung der Tumorzellen beeinträchtigt. Unser Ziel ist es, exemplarisch beim Mantelzelllymphom und beim großzellig-anaplastischen T-NHL durch systematische in vitro Analyse wichtiger Signaltransduktionswege therapeutisch nutzbare Schlüsselmoleküle für die Entstehung und Progression dieser beiden Lymphomtypen zu identifizieren und mögliche

Resistenz- und Ausweichmechanismen aufzudecken. Begleitende Validierung der in vitro erhobenen Befunde am Primärtumormaterial soll sicherstellen, klinisch relevante Kandidatenmoleküle und Signalwege zu erfassen.

### Strategie

Basierend auf unseren Erfahrungen mit lentiviralem Transfer von siRNAs in schwierig transfizierbare Lymphomzelllinien werden wir mit dieser Methode gezielt deregulierte Proteine ausschalten und die Auswirkungen auf Zellzyklusprogression, Apoptose und den Aktivierungsstatus von

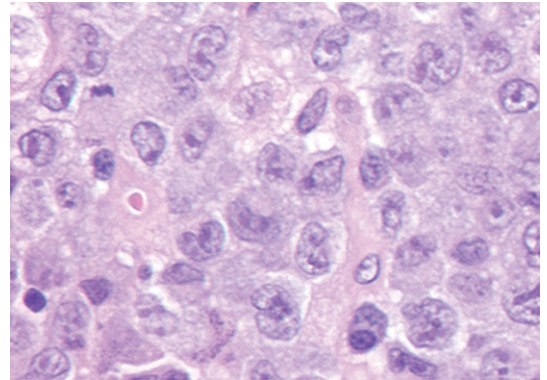


Abb. 1: Großzellig-anaplastisches Lymphom mit typischen, großen blastären Tumorzellen mit oft bohnenförmigen Zellkernen (HE, 400x)

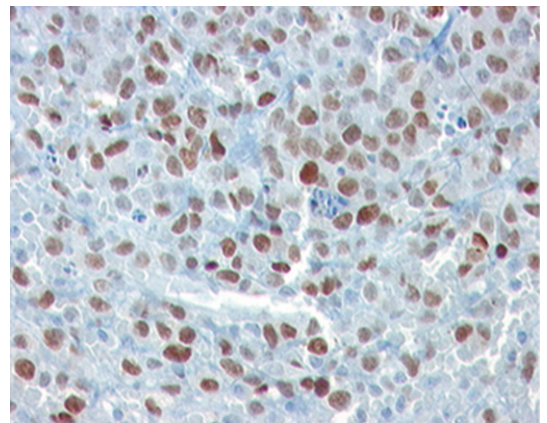


Abb. 2: ALCL mit nukleärer Expression von C/EBP .

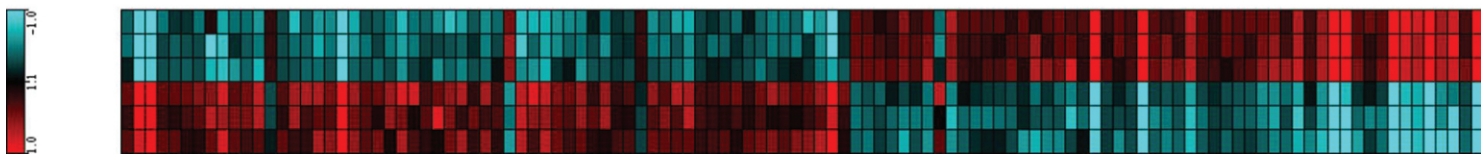


Abb. 3: Heatmap der unterschiedlich exprimierten Gene bei vergleichender Genexpressionsanalyse vor und nach siRNA Knockdown von CEBP $\beta$  in einer ALCL-Zelllinien; Affymetrix Plattform.

Signalmolekülen analysieren. Durch vergleichende Genexpressionsanalyse mittels Mikroarrays von siRNA-behandelten und unbehandelten Zelllinien werden potentielle Zielgene identifiziert und auf Proteinebene und im Primärtumormaterial validiert. Für Transkriptionsfaktoren wie C/EBP kommt auch die Chromatin-Immunopräzipitation zum Nachweis von Promoterbindungsstellen zum Einsatz. Diese Ansätze werden durch pharmakologische Inhibitoren als Brücke zu präklinischen Therapiestrategien ergänzt.

### Cell cycle deregulation and activated signal transduction pathways in malignant lymphoma

The work of our hematopathology research group focuses on two malignant lymphomas, ALK+ anaplastic large cell lymphoma (ALCL) and mantle cell lymphoma (MCL). These neoplasms highlight the current dilemma which hampers progress in targeted therapies: although the primary, disease-defining genetic alterations are well known, their precise pathogenetic mechanisms and relevance for tumor cell survival and proliferation are only partly understood. In previous work, we identified the transcription factor C/EBP as a central target of ALK kinase and a specific marker for ALCL. C/EBP not only is necessary for growth and survival of ALCL cell lines, but possibly is also responsible for the peculiar hybrid phenotype of this lymphoma. Currently, we are investigating the role of this transcription factor and its downstream targets in ALCL cell lines with an array of techniques, including siRNA-mediated gene knockdown, comparative expression profiling and chromatin immunoprecipitation. The hallmark of MCL is the overexpression of the cell cycle protein cyclin D1 through the translocation t(11;14). However, the mechanistic hypothesis,

that this results in deregulation of the cell cycle and unimpeded proliferation, is insufficient to explain MCL pathogenesis. Using lentiviral transfection of specific siRNA, we demonstrated that knockdown of cyclin D1 has only mild effects on cell proliferation and survival, probably due to compensatory upregulation of cyclin D2. Using a similar approach as described above, we plan to dissect the functional role of cyclin D1 in MCL to identify key molecules for MCL pathogenesis which might represent potential targets for specific therapies.

#### Projektleitung

Prof. Dr. med. Falko Fend  
PD Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend

Eberhard Karls Universität Tübingen  
Institut für Pathologie  
Liebermeisterstr. 8  
72076 Tübingen

Tel.: 0049/(0)7071/29 82266  
Fax: 0049/(0)7071/29 2258

falko.fend@med.uni-tuebingen.de  
Leticia.Quintanilla-Fend@med.uni-tuebingen.de

www.medizin.uni-tuebingen.de  
/pathologie/

