

Die Rolle von NFATc1 bei der molekularen Pathogenese von diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Annette Wolf

aus Shanatas, Kasachstan

2014

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.12.2009 bis 15.01.2014 unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. med. Georg Lenz am Molekularen Krebsforschungszentrum der Charité - Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Lenz

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rupert Mutzel

Disputation am: 22.04.2015

Danksagung

Ein Dankeschön gilt meinem Betreuer Prof. Dr. med. Georg Lenz für die Themenvergabe der Promotionsarbeit und die Möglichkeit an hochrangigen Publikationen mitzuwirken.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Rupert Mutzel möchte ich ganz besonders für die Unterstützung, die Einschätzung meiner Daten sowie für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit danken.

Einen großen Dank möchte ich Prof. Dr. Peter Lenz und insbesondere Michael Grau aus dem Fachbereich Physik der Philipps-Universität Marburg für die bioinformatischen Berechnungen und Interpretationen der in dieser Arbeit enthaltenen aCGH und Microarray Daten aussprechen.

Ich bedanke mich weiterhin bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Lenz, insbesondere bei Sören, Hendrik, Matthias und André für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Bei Mareike möchte ich mich besonders für die Zeit bedanken, die wir zusammen an dem NFATc1 Projekt gearbeitet und uns gegenseitig unterstützt haben. Danke auch für die Herstellung der Proben für die die Arrays mit der *NFATc1* shRNA #2. Andreas und Kerstin danke ich für die Klonierung der *NFATc1* shRNAs und die ersten Experimente zur Identifikation der „Richtigen“. Sören möchte ich zusätzlich für die Messung der Apoptose bei HBL-1 danken.

Meinen Freundinnen Tine, Kerstin, Babs und Sara möchte ich für ihre Unterstützung und die aufbauenden Worte der letzten Jahre danken. Marek und dem Rest des Teams danke ich für die Ablenkung zu den richtigen Zeitpunkten.

Meinen Eltern Lydia und Alexander Wolf sowie meiner großen Schwester Inge danke ich von ganzem Herzen für ihre bedingungslose Liebe, die Möglichkeit zur Verwirklichung meiner Vorstellungen sowie die finanzielle und seelische Unterstützung während meines Studiums und insbesondere während der Durchführung meiner Promotionsarbeit.

Meinem liebsten Wolfgang möchte ich für alles danken, was er ausgehalten und durchgestanden hat. Für alle liebevollen, aufbauenden und motivierenden Worte, das Trösten während der Durststrecken und das Anfeuern auf den letzten Metern. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis	15
1. Einleitung	16
1.1 Die B-Zell-Entwicklung.....	16
1.1.1 Die Keimzentrumsreaktion.....	17
1.2 B-Zell-Differenzierung und Lymphomagenese	20
1.3 Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome	22
1.4 GCB DLBCL	23
1.5 ABC DLBCL.....	24
1.5.1 Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs.....	24
1.5.2 Läsionen und Mutationen des NF- κ B-Signalwegs bei ABC DLBCL	26
1.5.3 Amplifikation des <i>NFATc1</i> Genlokus bei ABC DLBCL	28
1.6 Die Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren	29
1.6.1 Strukturelle Merkmale von NFATc1	29
1.6.2 Aktivierung von NFATc1 über den Ca ²⁺ -Calcineurin-NFAT-Signalweg.....	31
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	34
2. Material und Methoden	35
2.1 Material.....	35
2.1.1 Antikörper	35
2.1.2 Antibiotika und Inhibitoren.....	35
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	35
2.1.4 Enzyme	37
2.1.5 Geräte	37
2.1.6 Kits	38
2.1.7 qPCR Sonden.....	38
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	38
2.1.9 Zellkulturmedien, -lösungen und -zusätze.....	39
2.1.10 Zelllinien und Kulturbedingungen.....	40
2.1.11 Puffer und Medien	40
2.1.12 Vektoren und Oligonukleotide	41
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	42
2.2.1 Design und Klonierung von shRNA-Konstrukten.....	42

2.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	43
2.2.3	PCR zur Identifikation shRNA-Konstrukt-positiver Bakterienkolonien und Visualisierung mittels Gelelektrophorese	43
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Bakterien	44
2.2.5	RNA-Extraktion aus DLBCL Zelllinien	45
2.2.6	Herstellung von cDNA	45
2.2.7	qPCR mittels TaqMan® Gene Expression Assays	45
2.2.8	Isolierung genomischer DNA	45
2.3	aCGH Analysen	46
2.4	Genexpressionsanalysen nach NFATc1-Herunterregulation bei HBL-1	46
2.5	Retrovirale Transduktion und zellbiologische Untersuchungen	48
2.5.1	Retrovirale Transduktion von DLBCL Zelllinien	48
2.5.2	Selektionierung und Ficoll-Trennung von Zellen	50
2.5.3	Doxycyclin-vermittelte Induktion der shRNA-Expression	50
2.5.4	shRNA-Toxizitätstest	51
2.6	Durchflusszytometrische Analysen	51
2.6.1	Messung und Analyse von transduzierten DLBCL Zellen	51
2.6.2	Messung der Apoptose bei HBL-1	52
2.6.3	Messung der HLA-DR Oberflächenexpression bei HBL-1	52
2.7	Zell-Viabilitätstest mit CsA	52
2.8	Proteinbiochemische Untersuchungen	53
2.8.1	Zellyse und Bestimmung der Proteinkonzentration	53
2.8.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	53
2.8.3	Western Blotting	54
2.8.4	Immundetektion	54
3.	Ergebnisse	55
3.1	NFATc1-Expression bei DLBCL Zelllinien	55
3.2	ABC DLBCL Zelllinien weisen eine 18q Amplifikation auf	56
3.3	NFATc1-Induktion durch chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs	58
3.4	Identifikation spezifischer shRNAs gegen <i>NFATc1</i>	59
3.4.1	Zwei shRNAs bewirken eine spezifische Herunterregulation von NFATc1	62
3.5	Die Herunterregulation von NFATc1 hat einen toxischen Effekt auf zwei der getesteten ABC DLBCL Zelllinien	65
3.6	Die pharmakologische Inhibierung von Calcineurin ist toxisch für NFATc1-abhängige ABC DLBCL Zelllinien	67
3.7	Die Herunterregulation von NFATc1 induziert Apoptose bei HBL-1	69
3.8	Der toxische Effekt ist kein Ergebnis einer <i>NFATc1</i> shRNA-vermittelten Herunterregulation des Onkoproteins MYC	70
3.9	NFATc1 hat globalen Einfluss auf die Genexpression	73

3.9.1	Herstellung von Arrayproben durch shRNA-vermittelte NFATc1-Herunterregulation bei HBL-1	73
3.9.2	Genexpressionsanalysen NFATc1-regulierter Gene	74
3.9.3	<i>Gene Set Enrichment Ananlysis</i> (GSEA) der <i>NFATc1</i> shRNA <i>Down-</i> und <i>Up-</i> Eigensignaturen.....	76
3.10	NFATc1 moduliert den NF- κ B-Signalweg	79
3.11	NFATc1 dereguliert die Expression von MHC Klasse II-Molekülen	81
3.11.1	Differenzielle MHC Klasse II-Molekülexpression nach NFATc1-Herunterregulation mit zwei verschiedenen <i>NFATc1</i> shRNAs	82
3.11.2	Modulierung der MHC Klasse II-Molekülexpression durch die pharmakologische Inhibierung von Calcineurin	84
4.	Diskussion	86
4.1	DLBCL Zelllinien sind ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Rolle von NFATc1 bei der molekularen Pathogenese von DLBCL.....	86
4.2	Zwei shRNAs induzieren eine Herunterregulation von NFATc1	88
4.3	NFATc1 ist essenziell für zwei ABC DLBCL Zelllinien.....	90
4.4	NFATc1 reguliert die Expression pro-proliferativer und anti-apoptotischer Faktoren	92
4.5	NFATc1 moduliert den NF- κ B-Signalweg und die Aktivierung von STAT3.....	95
4.6	Regulation der MHC Klasse II-Molekülexpression durch NFATc1 – mögliche Rolle im <i>Immune Escape</i>	98
4.7	Fazit und Ausblick.....	102
5.	Zusammenfassung.....	104
6.	Summary	105
7.	Literaturverzeichnis.....	106
8.	Publikationen	123
9.	Eidesstattliche Erklärung.....	124
10.	Anhang	125

Abkürzungsverzeichnis

α-	Anti-
ABC	<i>activated B-cell-like</i>
aCGH	<i>Array-based Comparative Genomic Hybridization</i>
AG	Antigen
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
Ampl.	Amplifikation
AP1	<i>Activator Protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
B2M	<i>beta-2 microglobulin</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BCL6/10/2L1	<i>B-cell lymphoma 6/10/2L1</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLIMP-1	<i>B-lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-Terminus
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
CaM	Calmodulin
CARD11	<i>caspase recruitment domain family, member 11</i>
CBM	CARD11, BCL10, MALT1
cDNA	complementäre DNA
CDS	codierende Sequenz
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxy-Doxorubicin, Oncovin und Prednison
CK1	<i>Casein Kinase 1</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CRAC	<i>Ca²⁺-release activated Ca²⁺</i>
CsA	Cyclosporin A
CSR	<i>Class-switch recombination</i>
Cy	Cyanin
D	<i>Diversity Region</i>
DAG	Diacylglycerol
DBD	DNA-Bindedomäne
DLBCL	Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleotid Triphosphat
Dox	Doxycyclin
ds	doppelsträngig
DYRK1	<i>dual-specificity tyrosine regulated protein kinase 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>

ES	<i>Enrichment Score</i>
F	Phenylalanin
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fätales Kälberserum
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FDZ	follikuläre dendritisch Zellen
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene</i>
g	Gramm
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GCB	<i>germinal center-B-cell-like</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GSK3	glycogen synthase kinase 3
H	Histidin
h	Stunden
H-	Hygromycinresistenz ohne EGFP
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hygro	Hygromycin
Hygro ^r	Hygromycin-Resistenzkassette
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin schwere (<i>heavy</i>) Kette
IgL	Immunglobulin leichte Kette
IKK	I κ B-Kinase
IL-4/6/7/10	Interleukin-4/6/7/10
IP ₃	Inositol-3,4,5-Trisphosphat
IRAK1/4	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4</i>
IRF4	<i>interferon regulatory factor 4</i>
ITAM	<i>Immunorezeptor Tyrosine-based activation motif</i>
I κ B	<i>Inhibitor of NF-κB</i>
J	<i>Joining Region</i>
JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
L	Lysin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LMO2	<i>LIM Domain Only 2</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
μ g	Microgramm
μ l	Microliter
μ M	Micomolar
mAb	<i>monoclonal Antibody</i>
MALT1	<i>mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i>

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mbp	Megabasenpaare
MDM2	<i>MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSCV	<i>Murine Stem Cell Virus</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
N-	Amino-Terminus
n.b.	nicht bestimmt
n.s.	nicht signifikant
NCBI	<i>National Center for Biochnology Information</i>
NES	nukleäres Exportsignal
NFATc1	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1</i>
NFKBIZ	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta</i>
NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NHR	NFAT Homologie Region
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nt	Nukleotide
nukl.	nukleäre Proteinfraction
ORAI	benannt nach den Wächtern der Himmelspforten in der griechischen Mythologie
P	Prolin
P-	Puromycin ohne EGFP
p-	Phospho-
pAb	<i>polyclonal Antibody</i>
PARP	Poly-ADP-ribose Polymerase
PAX5	<i>paired box protein 5</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline + Tween</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PG	Puromycin und EGFP
PGK	Phosphoglycerat kinase
PI3K	<i>phosphatidylinositol-4,5-Biphosphate 3-kinase</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat
PKCβ	<i>protein kinase C, beta</i>
PLCγ	<i>phospholipase C, gamma</i>
PP	Polypropylen
PRDM1	<i>PR domain containing 1, with ZNF domain</i>

PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTK	<i>protein-tyrosin kinase</i>
Puro	Puromycin
Puro ^r	Puromycin-Resistenzkasette
qPCR	quantitative PCR
RAG1/2	recombination activating gene 1/2
R-CHOP	Rituximab mit CHOP
Rel	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>
RHR	Rel-Homology-Region
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec.	Sekunden
SFK	SRC-Familie Kinase
SHM	Somatisch Hypermutation
shRNA	<i>short haipin RNA</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth + 10mM Glucose</i>
SP	Serin, Prolin
SPIB	<i>Spi-B transcription factor</i>
SRR	Serin-reiche Region
STAT3/6/10	<i>signal transducer and activator of transcription 3/6/10</i>
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
t	Translokation
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Tet	Tetracyclin
TRAF4/6	<i>TNF receptor-associated factor 4/6</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	variable Region
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
zyt.	zytosolische Proteinfraktion

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Die B-Zell-Entwicklung bis zum Stadium der naiven B-Zelle	17
Abbildung 1.2:	Die Keimzentrumsreaktion und terminale Differenzierung von B-Zellen. ...	19
Abbildung 1.3:	Genetische Läsionen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs bei ABC DLBCL	27
Abbildung 1.4:	Häufig beobachtete Amplifikationen des Chromosomenabschnitts 18q bei ABC DLBCL Patienten.....	28
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Primärstruktur des NFATc1 Proteins.....	30
Abbildung 1.6:	Aktivierung und Deaktivierung von NFATc1	32
Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung der verwendeten shRNA-Expressionsvektoren.....	42
Abbildung 2.2:	Schematischer Verlauf einer retroviralen Transduktion.....	49
Abbildung 3.1:	<i>NFATc1</i> mRNA-Expression bei DLBCL Zelllinien.....	55
Abbildung 3.2:	Western Blot Analyse der basalen NFATc1-Proteinexpression bei DLBCL Zelllinien.....	56
Abbildung 3.3:	aCGH Analysen des humanen Chromosomenabschnitts 18q bei DLBCL Zelllinien.....	57
Abbildung 3.4:	Die Herunterregulation von CD79A hat Einfluss auf NFATc1 bei HBL-1	59
Abbildung 3.5:	Identifikation wirksamer shRNAs gegen <i>NFATc1</i>	60
Abbildung 3.6:	Bindung der <i>NFATc1</i> shRNA #1 und #2 am Beispiel der <i>NFATc1</i> Transkriptvariante F/6	61
Abbildung 3.7:	Detektion der shRNA-vermittelten <i>NFATc1</i> mRNA-Reduktion mittels qPCR	63
Abbildung 3.8:	Nachweis der shRNA-vermittelten NFATc1-Proteinreduktion mittels Western Blot	64

Abbildung 3.9: Die Ko-Expression beider <i>NFATc1</i> shRNAs reduzierte weiterhin die <i>NFATc1</i> mRNA-Expression.....	64
Abbildung 3.10: Nachweis der NFATc1-Proteinreduktion mittels Western Blot nach Expression beider shRNAs.....	65
Abbildung 3.11: Die NFATc1-Herunterregulation hat einen selektiven toxischen Effekt auf zwei ABC DLBCL Zelllinien.....	66
Abbildung 3.12: CsA verringert die Zell-Viabilität NFATc1-abhängiger DLBCL Zelllinien	67
Abbildung 3.13: Verteilung des NFATc1 Proteins bei nukleären und zytosolischen Fraktionen mit und ohne CsA-Behandlung	68
Abbildung 3.14: Detektion von Apoptose durch Annexin V-PE Färbung bei HBL-1 Zellen nach Expression beider <i>NFATc1</i> shRNAs für acht Tage	70
Abbildung 3.15: Die shRNA-vermittelte MYC-Herunterregulation induziert einen toxischen Effekt bei HBL-1 und TMD8	71
Abbildung 3.16: Western Blot Analysen von MYC nach NFATc1-Herunterregulation.....	72
Abbildung 3.17: qPCR der Herunterregulation von <i>NFATc1</i> bei HBL-1-Arrayproben nach shRNA #1-Expression	74
Abbildung 3.18: Top regulierte Gene bei HBL-1 nach NFATc1-Herunterregulation mit angegebener shRNA.....	75
Abbildung 3.19: <i>NFATc1</i> Down-Eigensignaturen werden nach NFATc1-Herunterregulation mit der jeweils anderen <i>NFATc1</i> shRNA angereichert.....	77
Abbildung 3.20: Hochregulation und Anreicherung der <i>NFATc1</i> Up-Eigensignaturen durch Expression der jeweils anderen <i>NFATc1</i> shRNA.....	78
Abbildung 3.21: Eine vordefinierte NF-κB-Zielgensignatur (MLN120B Signatur) wird nach NFATc1-Herunterregulation signifikant angereichert	80
Abbildung 3.22: Western Blot Analysen bekannter NF-κB-Zielgene und NF-κB-aktivierender Faktoren nach NFATc1-Herunterregulation	81

Abbildung 3.23: Divergierende Anreicherung einer MHC Klasse II-Signatur nach Expression von zwei <i>NFATc1</i> -spezifischen shRNAs	83
Abbildung 3.24: Die Herunterregulation von NFATc1 beeinflusst die HLA-DR-Oberflächenexpression	84
Abbildung 3.25: Modulierung der HLA-DR-Expression durch pharmakologische Inhibierung von Calcineurin	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Beschriebene genetische Aberrationen bzw. Mutationen bei GCB und ABC DLBCL.....	23
Tabelle 2.1:	Verwendete DLBCL Zelllinien mit Angaben zu ihrem molekularen Subtyp und Kulturbedingungen.....	40
Tabelle 2.2:	Verwendete shRNA Sequenzen	42
Tabelle 2.3:	Verwendete Antibiotika und die jeweils eingesetzte finale Konzentration für die Selektionierung der angegebenen, transduzierten Zelllinien.....	50
Tabelle 3.1:	Zusammenfassung der NFATc1-Analysen bei DLBCL Zelllinien	58
Tabelle 3.2:	Bekannte <i>NFATc1</i> Transkriptvarianten, Anzahl ihrer Aminosäuren, die kalkulierte Molekülmasse und Angaben zur Bindung durch identifizierte shRNAs.....	62
Tabelle 10.1:	Signifikant herunterregulierte Gene nach <i>NFATc1</i> shRNA #1 Expression.....	125
Tabelle 10.2:	Signifikant hochregulierte Gene nach <i>NFATc1</i> shRNA #1 Expression.....	128
Tabelle 10.3:	Signifikant herunterregulierte Gene nach <i>NFATc1</i> shRNA #2 Expression.....	129
Tabelle 10.4:	Signifikant hochregulierte Gene nach <i>NFATc1</i> shRNA #2 Expression.....	134
Tabelle 10.5:	Differenziell regulierte Gensignaturen nach NFATc1 shRNA #1-Expression	136
Tabelle 10.6:	Differenziell regulierte Gensignaturen nach NFATc1 shRNA #2-Expression	137
Tabelle 10.7:	Weitere NF- κ B-Signaturen werden in der GSEA nicht angereichert	137

1. Einleitung

B-Zell-Lymphome sind Tumore, die sich aus deregulierten B-Lymphozyten im lymphatischen System etablieren^{1,2}. Das lymphatische System ist ein Netzwerk aus Lymphgefäßen und lymphatischen Organen, wie der Milz und den Lymphknoten, die eine wichtige Funktion in der Entwicklung und Differenzierung von Zellen des Immunsystems einnehmen^{3,4}. Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor Krankheitserregern zu schützen bzw. eingedrungene Pathogene zu erkennen und eine entsprechende Reaktion zu ihrer Eliminierung einzuleiten. Höheren Organismen stehen für diese Reaktion das angeborene sowie das adaptive Immunsystem zur Verfügung. Zu den wichtigsten zellulären Komponenten des adaptiven Immunsystems gehören B- und T-Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche hoch-spezialisierte Rezeptoren (B- bzw. T-Zell-Rezeptoren) tragen, mit deren Hilfe sie spezifisch Pathogene (Antigene) erkennen. Eine weitere Grundlage für eine adaptive Immunantwort ist die Produktion hoch-affiner, spezifischer Antikörper, die das Antigen binden und neutralisieren können. Diese Antikörper werden von Plasma-B-Zellen sezerniert, die sich während eines mehrstufigen Differenzierungs- und Spezialisierungsprozesses, der sogenannten B-Zell-Entwicklung, etablieren⁵.

1.1 Die B-Zell-Entwicklung

Die B-Zell-Entwicklung beginnt mit pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen in der fetalen Leber bzw. im Knochenmark und wird durch Zytokine eingeleitet, die von Makrophagen und T-Zellen im Knochenmark ausgeschüttet werden^{6,7}. Jedes Stadium der B-Zell-Entwicklung unterliegt der Kontrolle verschiedener Regulatoren der Genexpression. So ist z.B. der Transkriptionsfaktor PAX5 (*paired box protein 5*) essenziell für die Einleitung der B-Zell-Differenzierung (Abbildung 1.1)^{7,8}. PAX5 fungiert als Aktivator B-Zell-spezifischer Gene und verhindert gleichzeitig als transkriptioneller Repressor eine Differenzierung in eine andere Zelllinie sowie die vorzeitige Ausdifferenzierung der B-Zellen⁹. Das Ziel der B-Zell-Entwicklung ist die Etablierung eines funktionsfähigen, Antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptors (BZR) auf der Oberfläche der B-Zelle. Hauptbestandteil hiervon ist die Immunglobulin (Ig) schwere (*heavy*, H) und leichte (L) Kette, die zusammen die extrazelluläre Komponente des BZR bilden. Die Produktion des BZR beginnt mit der Rekombination und Expression der Gene für die IgH und IgL-Ketten. Die IgH Kette wird aus verschiedenen kurzen V (*variable*), D (*diversity*) und J (*joining*) Segmenten zusammengesetzt, während die IgL Kette aus V und J Elementen assembliert wird, die jeweils auf einem Genlocus codiert werden¹⁰. Während des Rekombinationsprozesses kommt es zu vorübergehenden Brüchen der doppelsträngigen (ds) DNA, die durch die

enzymatische Aktivität der beiden Proteine RAG (*Recombination activating gene*) 1 und RAG2 entstehen (Abbildung 1.1)^{11,12}. In dem Entwicklungsstadium der Pro-B-Zelle beginnt die somatische Umlagerung der D, J und der V Regionen des IgH Genlokus, anschließend findet die VJ-Rekombination der IgL Kette im Prä-B-Zellstadium statt. Sofern die V(D)J-Rekombination erfolgreich verlaufen ist, können die B-Zellen in das Stadium der unreifen B-Zelle eintreten (Abbildung 1.1). Unreife B-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche einen funktionsfähigen (IgH/L-rekombinierten) BZR und wandern aus dem Knochenmark in die sekundären lymphatischen Organe, wie Milz und die Lymphknoten, wo sie zu naiven B-Zellen maturieren. Kommt es jedoch zu Fehlern bei der V(D)J-Rekombination oder der BZR-Expression, leiten unreife B-Zellen die Apoptose ein¹³.

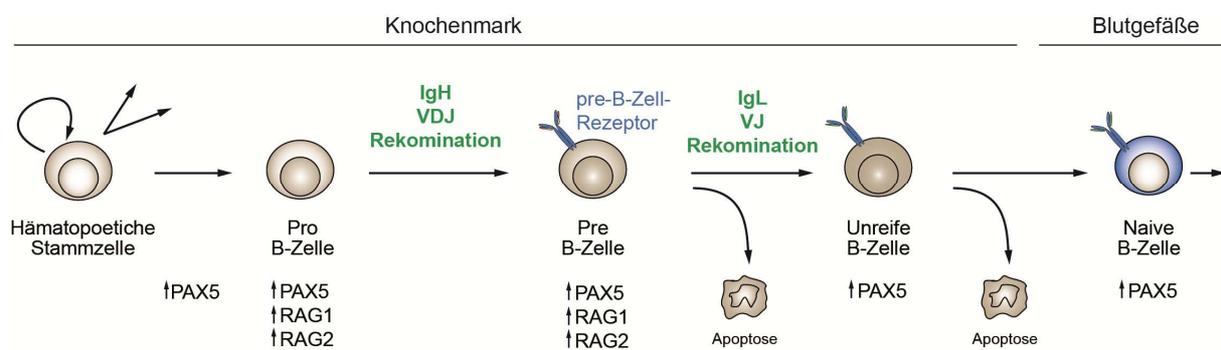


Abbildung 1.1: Die B-Zell-Entwicklung bis zum Stadium der naiven B-Zelle. B-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen über einen mehrstufigen Differenzierungsprozess, der durch die transkriptionelle Aktivität von PAX5 eingeleitet wird. In dem Pro-B-Zell-Stadium wird durch RAG1 und RAG2 die VDJ-Rekombination des IgH Gens durchgeführt, der sich die VJ-Rekombination der IgL-Kette im Stadium der Prä-B-Zelle anschließt. Unreife B-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche einen IgH/IgL-rekombinierten BZR, der keine Reaktivität gegen körpereigene Strukturen aufweist, andernfalls werden sie durch Einleiten der Apoptose eliminiert. Naive B-Zellen treten schließlich in den Blutkreislauf ein. Modifiziert nach Cobaleda et al., 2007, Litman et al., 2010 und Shapiro-Shelef und Calame, 2005^{5,9,14}.

Im Lymphknoten oder in der Milz wandern die reifen, naiven B-Zellen in gesonderte Nischen ein, die sogenannten primären Follikel, wo sie, umgeben von T-Zellen in der T-Zellzone, bis zum ersten Kontakt mit Antigen verweilen¹⁵. Sobald ein Protein-Antigen durch den Membranständigen BZR gebunden wird, werden die B-Zellen durch Interaktion mit T-Zellen aktiviert und dadurch die Keimzentrumsreaktion eingeleitet (Abbildung 1.2).

1.1.1 Die Keimzentrumsreaktion

Die Keimzentrumsreaktion ist ein entscheidender Prozess für die T-Zell-abhängige Immunantwort und umfasst die sogenannte Affinitäts- (Bindungsstärke-) Reifung von B-Zellen¹⁶. Die Keimzentrumsreaktion findet in den sekundären lymphatischen Organen, wie den Follikeln der Lymphknoten oder der Milz statt¹⁵. Aktivierte B-Zellen differenzieren hier nach T-Zell-Stimulation zu Zentroblasten und beginnen erheblich zu proliferieren. Durch die

hohe Zelldichte wird histologisch die dunkle Zone im Follikel sichtbar wird, während die Region, in der die Zellen nicht proliferieren, hell (helle Zone) erscheint¹⁵. Der transkriptionelle Repressor BCL6 (*B cell lymphoma 6*) ist ein zentraler Regulator der Keimzentrumsreaktion, der die Expression von Genen herunterreguliert, die der klonalen Expansion entgegenwirken oder die Ausdifferenzierung der B-Zellen antreiben (Abbildung 1.2)^{17,18}.

Während der Keimzentrumsreaktion finden zwei DNA-Modifikationen statt, die die Aktivität des B-Zell-spezifischen Enzyms AID (*activation-induced cytidine deaminase*) erfordern; die sogenannte somatische Hypermutation (SHM) und der irreversible Klassenwechsel (*class switch recombination*; CSR) der IgH-Kette^{19,20}. Die SHM dient dazu, die Affinität des BZR zu erhöhen, indem ungerichtet Punktmutationen, Deletionen und Duplikationen in die V-Regionen der IgH/IgL-Gene eingebracht werden²¹. Hierfür produziert AID kurzzeitig DNA-Doppelstrangbrüchen und induziert Basenpaaraustausche der V-Regionen in einer Rate von 1×10^{-3} Mutationen pro Base und Generation, die somit 1×10^6 mal höher ist, als die Mutationsrate von Haushaltsgenen (Abbildung 1.2)^{19,22,23}. Sofern die SHM und gleichzeitige klonale Expansion der Zentroblasten erfolgreich verlaufen und ein modifizierter BZR exprimiert werden kann, differenzieren die Zellen zu Zentrozyten. Ob die Affinität des BZR durch SHM gesteigert werden konnte, testen die nicht länger proliferierenden Zentrozyten in der hellen Zone des Keimzentrums, einem Netzwerk aus follikulären dendritischen Zellen (FDZ), Makrophagen und einigen wenigen follikulären CD4-positiven Helfer-T-Zellen (Abbildung 1.2)^{15,16}. Hier treten die Zentrozyten erneut mit dem Antigen in Kontakt, das ihnen von FDZs präsentiert wird. Die Zentrozyten konkurrieren miteinander um die Bindung an das Antigen und um die Ko-Stimulation durch Helfer-T-Zellen. Durch den hohen Selektionsdruck, erhalten ausschließlich Zentrozyten mit der stärksten Affinität für das Antigen Überlebenssignale in Form von Zytokinen, wie IL- (Interleukin) 4 und IL-21, die von den wenigen CD4-positiven Helfer-T-Zellen ausgeschüttet werden, sowie durch Interaktion mit CD154, das auf ihrer Oberfläche von Helfer-T-Zellen exprimiert wird²⁴⁻²⁶. Sobald jedoch Fehler während der SHM und klonalen Expansion unterlaufen oder die BZR-Affinität nicht gesteigert werden konnte, wird die Apoptose dieser Zellen eingeleitet (Abbildung 1.2)²⁷. Zentrozyten können zum einen erneut in die dunkle Zone des Keimzentrums einwandern, um durch wiederholte SHM und klonale Expansion die BZR-Affinität weiter zu steigern. Zum anderen können Zentrozyten, die weitere Überlebenssignale von Helfer-T-Zellen erhalten haben, zu Gedächtnis-B-Zellen oder Plasma-B-Zellen differenzieren (Abbildung 1.2). Zuvor kann jedoch noch durch die CSR ein Klassenwechsel der konstanten Region von IgM/IgD zu IgG, IgA oder IgE stattfinden. Die Keimzentrums-B-Zelle kann anschließend über das Plasmablast-Stadium terminal zu Plasma-B-Zellen ausdifferenzieren, die hoch-affine Antikörper unterschiedlicher Ig Isotypen in großen Mengen sezernieren (Abbildung 1.2)^{28,29}.

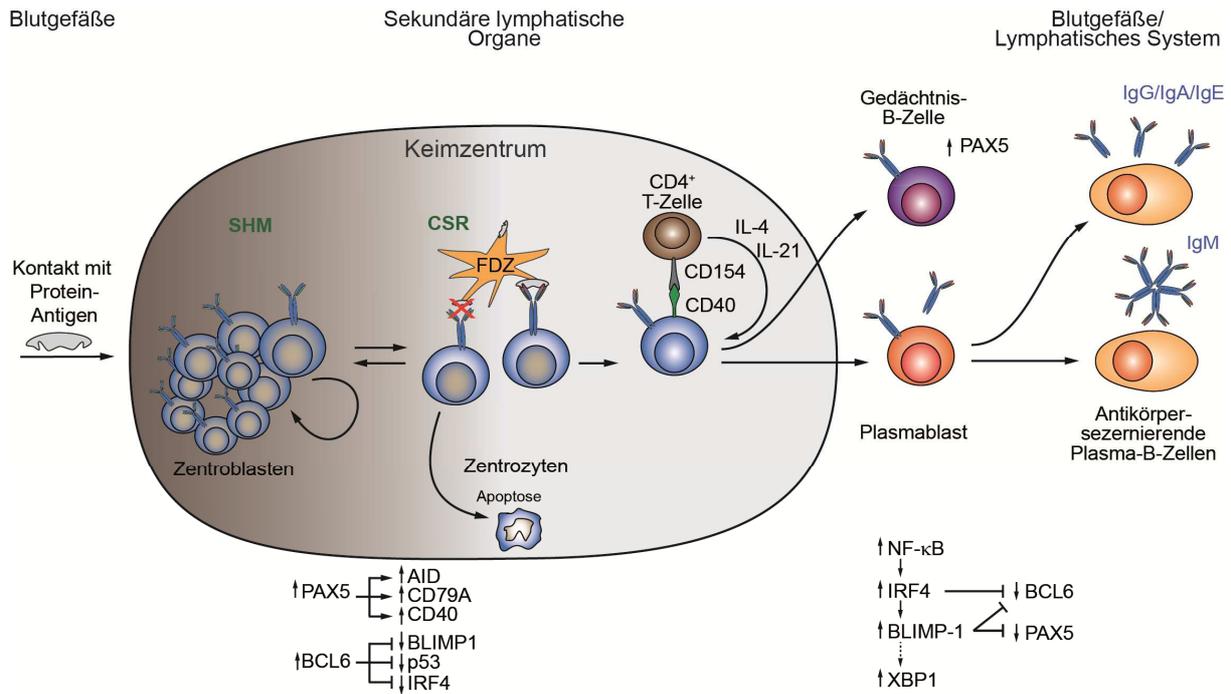


Abbildung 1.2: Die Keimzentrumsreaktion und terminale Differenzierung von B-Zellen. Während der Zirkulation im Blutkreislauf gelangen naive B-Zellen zum ersten Mal in Kontakt mit Antigen und werden dadurch aktiviert. Die aktivierten B-Zellen differenzieren zu Zentroblasten und durchlaufen daraufhin die T-Zell-abhängige Differenzierung in der Keimzentrumsreaktion der sekundären lymphatischen Organe, wie Milz oder Lymphknoten. Keimzentrums-B-Zellen exprimieren weiterhin den B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor PAX5, der die Expression von Proteinen, wie AID, CD40 und CD79A aktiviert. Die enzymatische Aktivität von AID wird für die SHM der V-Region der Ig-Gene benötigt. Zudem exprimieren Keimzentrums-B-Zellen den transkriptionellen Regulator BCL6, der die Expression u.a. von BLIMP-1 und IRF4 unterdrückt, die ansonsten die Differenzierung in Richtung Plasma-B-Zelle vorantreiben würden. BCL6 reprimiert außerdem die Expression von p53, das DNA-Doppelstrangbrüche während der SHM erkennen und sofort reparieren lassen würde. Durch gleichzeitige Proliferation der Zentroblasten entstehen in der dunklen Zone des Keimzentrums neue Klone mit einer modifizierten Antigen-Affinität. Zentroblasten, die einen intakten BZR exprimieren können stellen die Proliferation ein und differenzieren zu Zentrozyten. Die Antigen-Affinität der Zentrozyten wird in der hellen Keimzentrumszone durch Wechselwirkung mit Antigen-präsentierenden FDZ getestet. Autoreaktive Zentrozyten und solche mit schwacher BZR-Affinität werden durch Apoptose eliminiert. Zentrozyten mit gesteigerter Affinität gegen das Antigen erhalten Überlebenssignale (IL-4, IL-21 und CD40/CD154 Interaktion) von CD4-positiven (CD4⁺) Helfer-T-Zellen und können entweder weitere Runden der Proliferation und Affinitätssteigerung durch SHM durchlaufen, gleich als Gedächtnis-B-Zelle die Keimzentrumsreaktion verlassen, durch CSR einen Isotyp-Wechsel der IgH-Kette durchlaufen oder über das Plasmablast-Stadium terminal zu AK-sezierenden Plasma-B-Zellen ausdifferenzieren. Auch die CSR ist ein Prozess, der die enzymatische Aktivität von AID und vorübergehende Doppelstrangbrüche in die DNA erfordert. Siehe Text für Erläuterungen der Abkürzungen. Adaptiert von Lenz und Staudt, 2010 und Klein und Dalla-Favera, 2008^{27,30}.

Die Genexpressionskontrolle während der Keimzentrumsreaktion unterliegt u.a. der Aktivität von PAX5 und BCL6. Während PAX5 bei Keimzentrums-B-Zellen die Expression von AID fördert sowie die von Elementen des BZR-Signalwegs, wie z.B. CD79A und CD40, unterdrückt BCL6 die Expression des Proteins BLIMP-1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*), dem Masterregulator in der Ausdifferenzierung aktivierter B-Zellen zu Antikörper-sezierenden Plasmazellen, und hält dadurch die Zentroblasten in der Keimzentrumsreaktion fest (Abbildung 1.2)^{9,18,31,32}. Die durch SHM und CSR induzierten

Doppelstrangbrüche der DNA würden sofort erkannt und behoben werden, sofern die Keimzentrums-B-Zellen ihre DNA-Reparaturmechanismen nicht herunterregulierten³³. BCL6 verhindert hierbei die Expression des Transkriptionsfaktors p53, der DNA-Doppelstrangbrüche erkennt und reparieren lässt³³. Gleichzeitig wird in Keimzentrums-B-Zellen die Expression anti-apoptotischer Faktoren, wie BCL2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) und BCL2L1 (*BCL2-like 1*), unterbunden, während pro-apoptotische Proteine vermehrt exprimiert werden, so dass ein autoreaktiver oder defekter Klon, der aus dieser Reaktion entsteht, durch sofortige Induktion der Apoptose eliminiert werden kann^{17,34}.

Der spezifische Antigen-Kontakt aktiviert den CD40/CD154- sowie den BZR-Signalweg, wodurch die Ausdifferenzierung von Zentrozyten zu Plasma-B-Zellen veranlasst wird, indem der Transkriptionsfaktor-Komplex NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) aktiviert und die Inaktivierung von PAX5 sowie die Herunterregulation von BCL6 eingeleitet wird³⁵⁻³⁷. Die Aktivierung von NF- κ B induziert unter anderem die Expression des BCL6-inhibierenden Proteins IRF4 (*interferon regulatory factor 4*), das zuvor selbst durch BCL6 reprimiert worden ist^{38,39}. Des Weiteren aktivieren NF- κ B und IRF4 die Expression des Plasma-B-Zell-Masterregulators BLIMP-1. BLIMP-1 wiederum inhibiert BCL6 und PAX5 und leitet somit die Ausdifferenzierung in Richtung von AK-sezernierenden Plasmazellen ein⁴⁰⁻⁴². Daraufhin kommt es zu der Expression von XBP1 (*X-box binding protein 1*), einem Plasma-B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor⁴². XBP1 reguliert die Aktivität von Genen des sekretorischen Signalwegs und unterstützt somit die Ausdifferenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasma-B-Zellen⁴³.

1.2 B-Zell-Differenzierung und Lymphomagenese

Die im Vorfeld beschriebenen genetischen Modifikationen während der V(D)J-Rekombination sowie der Keimzentrumsreaktion sind von elementarer Bedeutung für die Etablierung einer adäquaten, adaptiven Immunantwort. Sie bringen eine große Variabilität an spezifischen Antikörpern mit der höchsten Affinität gegen das Pathogen hervor. Allerdings bergen diese genetischen Modifikationen auch Risiken, die in den jeweiligen Stadien der normalen B-Zell-Entwicklung die Entstehung maligner B-Zell-Lymphome initiieren können, sobald Fehler auftreten, die nicht sofort erkannt und eliminiert werden. Die für die V(D)J-Rekombination, die SHM und CSR benötigte genetische Instabilität kann, gepaart mit der hohen Proliferationsrate während der Keimzentrumsreaktion, der Ausgangspunkt einer malignen Transformation sein. Daher zählen chromosomale Translokationen sowie aberrante SHM (ASHM), die durch Fehler während der Reorganisation der Ig-Gene eingeführt werden, zu den häufigsten beschriebenen Läsionen bei Lymphomen². B-Zell-Lymphome sind Tumore

des lymphatischen Systems und entwickeln sich aus deregulierten B-Lymphozyten, die die Fähigkeit erlangen, unkontrolliert wachsen und proliferieren zu können. Douglas Hanahan und Robert Weinberg zufolge, entstehen Tumore dadurch, dass normale Zellen im Laufe eines mehrstufigen Prozesses die biologischen Fähigkeiten erwerben, die sie als die zehn Kennzeichen von Krebs (*Hallmarks of Cancer*) bezeichnen^{44,45}. Zu diesen Kennzeichen zählen sie die unbegrenzte Proliferation der Zelle, ihre Unempfindlichkeit gegenüber Signalen, die das Wachstum inhibieren, das Entkommen vor dem programmierten Zelltod, ein unbegrenztes Teilungspotential, die Induktion der Ausbildung neuer Gefäße (Angiogenese) für eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, die Invasion und Metastasierung in andere Gewebe, eine genomische Instabilität, die die Akquise von Mutationen ermöglicht, entzündliche Prozesse in der näheren Umgebung (*Microenvironment*) der Krebszellen die Umstellung des zellulären Energiehaushalts, sowie das Entkommen vor einer Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem.

Vielen B-Zell-Lymphom-Entitäten ist eindeutig das Stadium der B-Zell-Entwicklung nachzuweisen, in dem ihre maligne Transformation eingesetzt hat. So scheint bei Mantelzelllymphomen die Lymphomagenese bereits im Stadium einer reifen prä-Keimzentrums-B-Zelle eingesetzt zu haben, da diese Lymphome zwar einen VDJ-rekombinierten *IgH* Locus aufweisen, der jedoch noch keine Mutationen in den V-Regionen enthält⁴⁶. Eine Vielzahl der aggressiven B-Zell-Lymphome hingegen weist bereits somatisch mutierte *IgV* Gene auf, was darauf hindeutet, dass diese B-Zell-Lymphome die Keimzentrumsreaktion bereits durchlaufen oder diese nicht vollständig abgeschlossen haben^{1,47}. Bei den meisten Fällen von follikulären Lymphomen finden sich t(14;18) Translokationen, die die Expression des anti-apoptotischen BCL2 Proteins unter die Kontrolle des *IgH* Locus verlagern⁴⁸. Das Burkitt Lymphom zeichnet sich in der Regel durch die t(8;14) Translokation des *MYC* Locus auf den *IgH* Locus aus und eine dadurch verursachte onkogene Überexpression des *MYC* Proteins⁴⁹. Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome weisen ebenfalls charakteristische Aberrationen auf, die zu der Entstehung dieser aggressiven Erkrankung beitragen.

1.3 Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) sind Neoplasien reifer B-Zellen und gehören laut 2008 WHO (*World Health Organisation*) Klassifizierung zu den aggressiven B-Zell-Lymphomen^{50,51}. DLBCL sind mit knapp 30-40% die häufigste Lymphom-Erkrankung unter den jährlich neu diagnostizierten Lymphomen und machen den Großteil aller aggressiven Lymphome aus⁵¹⁻⁵⁵. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit Hinblick auf ihre Morphologie, Biologie sowie die Prognose für das Überleben^{52,56}. Mit Hilfe genomweiter Genexpressionsanalysen gelang die Differenzierung der heterogenen DLBCL in mindestens zwei vorherrschende molekulare DLBCL Subgruppen; die ABC (*activated B-cell-like*) und die GCB (*germinal center-B-cell-like*) DLBCL^{57,58}. Diese beiden Subtypen exprimieren unterschiedliche Genprofile, entsprechend den B-Zell-Entwicklungsstadien, in welchen ihre maligne Transformation wahrscheinlich eingesetzt hat^{58,59}. So weist das Genexpressionsprofil der GCB DLBCL Ähnlichkeiten zu dem von Keimzentrums-B-Zellen auf. Im Gegensatz dazu ähnelt das Transkriptionsprofil der ABC DLBCL dem aktivierter post-Keimzentrums-B-Zellen⁵⁸. Wie andere aggressive Lymphome auch zeichnen sich DLBCL durch eine hohe Proliferations- und Wachstumsrate aus und die Erkrankung verläuft meist tödlich, sofern sie unbehandelt bleibt. Die Behandlung der DLBCL erfolgt standardmäßig mit einer Kombinationschemotherapie aus Cyclophosphamid, Hydroxy-Doxorubicin, Oncovin (Vincristin) und Prednison (CHOP) zusammen mit dem monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab (R-CHOP)⁶⁰⁻⁶². Interessanterweise konnten signifikante Unterschiede im Ansprechen auf die R-CHOP Therapie zwischen ABC und GCB DLBCL Patienten beobachtet werden⁵⁶. So wiesen GCB DLBCL Patienten mit ca. 74% ein signifikant besseres progressionsfreies 3-Jahres-Überleben nach R-CHOP Behandlung auf, als ABC DLBCL Patienten mit lediglich 40%^{30,56}. Durch Untersuchung des Genoms von DLBCL Biopsien und Zelllinien konnte in den vergangenen Jahren eine Reihe von Mutationen, genetischen Aberrationen und onkogenen Signalwegen beschrieben werden, die teils charakteristisch für GCB oder ABC DLBCL sind und somit ihre Subtyp-spezifischen Merkmale definieren (Tabelle 1.1)^{63,64}.

Tabelle 1.1: Beschriebene genetische Aberrationen bzw. Mutationen bei GCB und ABC DLBCL.

Aberration oder Mutation bei GCB DLBCL	Häufigkeit	Literatur
<i>BCL2</i> Translokation t(14;18)	45%	65
<i>BCL2</i> Amplifikation	16%	66
<i>REL</i> Amplifikation	28%	66
<i>BCL6</i> Translokation	10%	67
<i>MDM2</i> Amplifikation	12%	66
PTEN Verlust	55%	68
<i>miR-17-92</i> Amplifikation	13%	66
Aberration oder Mutation bei ABC DLBCL	Häufigkeit	Literatur
Homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	20%	66
<i>SPIB</i> Hinzugewinn oder Amplifikation	26%	66
<i>PRDM1</i> (BLIMP-1) Mutation oder Deletion	25%	69
<i>MCL-1</i> Hinzugewinn oder Amplifikation	26%	70
<i>CD79B</i> Mutationen	21%	71
Aktivierende <i>CARD11</i> Mutationen	10%	72
<i>NFKBIZ</i> Amplifikation	10%	66,73
<i>BCL6</i> Mutation	74%	67
<i>BCL6</i> Translokation	24%	67

1.4 GCB DLBCL

Die GCB DLBCL weisen in ihrem Genexpressionsprofil die Hochregulation Keimzentrums-B-Zell-typischer Gene auf, wie *LMO2* (*LIM Domain Only 2*) oder *BCL6*, dem Masterregulator der Keimzentrumsreaktion^{58,74}. GCB DLBCL sind außerdem durch die Inhibierung von *BCL6*-Zielgenen gekennzeichnet, wie sie bei Keimzentrums-B-Zellen typischerweise vorzufinden ist⁶⁷. Die pathogene Rolle von *BCL6* liegt bei GCB DLBCL unter anderem in der Unterdrückung von Inhibitoren der Zellzyklusprogression, wie z.B. p53, das normalerweise ein sofortiges Stoppen des Zellzyklus und die Induktion der Apoptose einleitet, sobald Fehler in der genomischen DNA vorliegen^{33,75}. Des Weiteren weisen GCB DLBCL häufig eine t(14;18) Translokation auf, die das *BCL2* Gen unter die Kontrolle des *IgH* Promoters bringt. Dadurch findet eine verstärkte Expression des anti-apoptotischen *BCL2* Proteins statt, die das Überleben der Lymphome sichert^{57,65}. Diese Translokation wurde bei bis zu 45% der GCB DLBCL Biopsien, jedoch nie bei ABC DLBCL beobachtet^{57,65}. Eine ebenfalls häufig gemachte Beobachtung bei GCB DLBCL betrifft die Deregulation des PI3K/AKT-Signalwegs. Heterozygote Deletionen von *PTEN*, einem Antagonisten des onkogenen PI3K/AKT Signalwegs, wurden bei ca. 11% der GCB DLBCL Fälle detektiert⁶⁶. Bei ca. 13% der GCB DLBCL Biopsien wurde eine Amplifikation des *miR-17-92* Locus beobachtet, einem

mikroRNA Cluster, der die Synthese des Tumorsuppressors PTEN supprimiert^{66,76}. Mutationen in der codierenden *PTEN* Sequenz sind ebenfalls mit einem Funktionsverlust dieser Phosphatase assoziiert⁶⁸. Darüber hinaus konnte der Verlust von PTEN, der bei knapp 55% der GCB DLBCL beobachtet wurde, mit einer Modulierung der PI3K/AKT-vermittelten Aktivierung des MYC Onkogens bei DLBCL in Zusammenhang gebracht werden⁶⁸. Weitere genetische Läsionen sowie Mutationen, die bei GCB DLBCL beobachtet wurden, sind in Tabelle 1.1 aufgelistet.

1.5 ABC DLBCL

Das Transkriptom der ABC DLBCL weist Parallelen zu einer aktivierten post-Keimzentrums-B-Zelle auf, die im Prozess der Plasmazelldifferenzierung blockiert ist^{30,58,77}. Ein Grund für diese Blockade liegt möglicherweise in der Inaktivierung des *PRDM1* Gens, das den Masterregulator der Plasmazelldifferenzierung BLIMP-1 codiert. Inaktivierende Mutationen und Deletionen des *PRDM1* Gens sind bei ca. 25%, Deletionen des gesamten 6q Chromosomenarms, auf dem der *PRDM1* Locus liegt, sogar bei knapp 40% der ABC DLBCL Patienten beobachtet worden^{66,69,78}. Zusätzlich finden sich bei ca. 24% der ABC DLBCL Fälle *BCL6* Translokationen, die ebenfalls die Unterdrückung der BLIMP-1-Expression fördern⁶⁷. Das wahrscheinlich wichtigste Charakteristikum des ABC DLBCL Subtyps ist dessen Abhängigkeit von einer fortwährenden Signalweiterleitung über den NF- κ B-Signalweg. Diese konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs wird durch verschiedene erworbene Läsionen ermöglicht^{79,80}.

1.5.1 Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B besteht aus einem Homo- oder Heterodimer von Proteinen der NF- κ B Familie⁸¹. Im Folgenden wird das Dimer bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, die das am besten charakterisierte klassische NF- κ B Dimer bilden, als NF- κ B bezeichnet. Im inaktiven Zustand liegt NF- κ B gebunden durch I κ B (*Inhibitor of NF- κ B*) im Zytosol vor. Durch ein geeignetes Signal, wird I κ B durch den IKK- (I κ B-Kinase) Komplex phosphoryliert, was eine Polyubiquitinierung und eine proteasomale Degradation des Inhibitors nach sich zieht^{81,82}. Das freie NF- κ B Dimer wird daraufhin in den Nukleus transloziert, wo es alleine oder in Kooperation mit weiteren Transkriptionsfaktoren bzw. Ko-Faktoren durch Bindung an sogenannte κ B-Bindestellen die Expression NF- κ B-abhängiger Zielgene induziert⁸². Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs kann auf verschiedenen Wegen, u.a. nach Aktivierung des BZR, erfolgen (Abbildung 1.3). Der BZR ist zusammengesetzt aus einem Membran-gebundenen Immunglobulin (mIg) mit einer kurzen zytoplasmatischen

Domäne, die nicht-kovalent mit einem CD79A/CD79B Heterodimer assoziiert ist⁸³. Sowohl CD79A als auch CD79B weisen konservierte Protein-Bindemotive (*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*; ITAM) auf, die für die intrazelluläre Signalweiterleitung von essenzieller Bedeutung sind⁸⁴. Sobald der extrazelluläre Teil des BZR ein Antigen bindet, werden im Zellinneren die ITAM-Tyrosinreste von CD79A und CD79B durch Protein-Tyrosinkinase (PTK) der SRC-Familie (SFK) phosphoryliert^{85,86}. Diese Phosphorylierung der CD79A und CD79B ITAMs dient als Andockstelle für die anschließende Rekrutierung der Kinase SYK (*spleen tyrosine kinase*), die an den aktivierten BZR binden und weitere Faktoren phosphorylieren und somit aktivieren kann⁸⁷. Über eine Signalkaskade wird schließlich PLC γ (*phospholipase C, gamma*) aktiviert, die PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu DAG (Diacylglycerol) und IP₃ (Inositol-3,4,5-Trisphosphat) hydrolysiert, die als sekundäre Botenstoffe die weitere intrazelluläre Signalweiterleitung übernehmen^{88,89}. IP₃ wird insbesondere für die Freisetzung von Ca²⁺ (Calcium-Ionen) aus intrazellulären Speichern benötigt und ist somit mitverantwortlich für die Aktivierung des Ca²⁺-Calcineurin-NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) –Signalwegs (1.6.2)^{90,91}. Das DAG hingegen aktiviert in stimulierten B-Zellen die Kinase PKC β (*protein kinase C beta*), die die Aktivierung des BZR an die des kanonischen NF- κ B Signalwegs koppelt⁹². Hierfür phosphoryliert PKC β das zytoplasmatische Gerüstprotein CARD11 (*caspase recruitment domain family, member 11*), das sich nach einer Konformationsänderung in die Nähe der Plasmamembran begeben und dort zusammen mit BCL10 (*B-cell CLL/lymphoma 10*) und der Paracaspase MALT1 (*mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*) den CBM-Komplex bilden kann⁹³⁻⁹⁵. Dieser CBM-Komplex kann nun auch die Ubiquitin-Ligase TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase*) rekrutieren⁹⁶. MALT1 aktiviert TRAF6 welches anschließend IKK γ (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma*; IKBKG), MALT1 und sich selbst polyubiquitiniert⁹⁷⁻⁹⁹. Das ubiquitinierte TRAF6 bindet das Adapterprotein TAB2 (*TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2*), was zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung der TAB2-assoziierten Kinase TAK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7; MAP3K7*) führt, das wiederum IKK β (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*), eine Untereinheit des IKK-Komplexes phosphoryliert^{97,100-102}. Diese Modifikation fördert die Aktivierung des IKK-Komplexes, bestehend aus den beiden katalytisch aktiven Untereinheiten IKK α und IKK β sowie dem katalytisch inaktiven IKK γ und ermöglicht schließlich die IKK β -vermittelte Phosphorylierung von I κ B α , das daraufhin polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird, so dass NF- κ B transkriptionell aktiv werden kann^{97,101,103,104}. Eines der NF- κ B-Zielgene ist I κ B selbst, dessen Expression einen Rücktransport von NF- κ B aus dem Nukleus in das Zytosol bewirkt und dadurch für gewöhnlich innerhalb von einigen Minuten die NF- κ B-vermittelte Genexpression beendet¹⁰⁵. Eine konstitutive Aktivierung des

NF- κ B-Signalwegs, wie sie auch für ABC DLBCL beschrieben ist, verhindert eine Beendigung der NF- κ B-vermittelten Genexpression und hält die Expression Proliferations-, Wachstums- und Überlebens-fördernder Zytokine und anti-apoptotischer Faktoren (z.B. *IL-6*, *IL-10*, *BCL2L1*) aufrecht^{106,107}.

1.5.2 Läsionen und Mutationen des NF- κ B-Signalwegs bei ABC DLBCL

Bis heute konnte eine Reihe NF- κ B-aktivierender genetischer Läsionen und Mutationen bei ABC DLBCL beschrieben werden (Abbildung 1.3)¹⁰⁸. Mit Hilfe von RNA Interferenz-Experimenten konnte die Bedeutung eines assemblierten CBM-Komplexes für die NF- κ B-Signalweiterleitung und das Überleben von ABC DLBCL Zelllinien weitgehend aufgeklärt werden^{72,109,110}. Nach Aktivierung des BZR-Signalwegs rekrutiert CARD11 normalerweise transient die beiden weiteren CBM-Komplexmitglieder BCL10 und MALT1. Knapp 10% der ABC DLBCL Fälle tragen jedoch aktivierende CARD11 Mutationen, die eine konstitutive Rekrutierung des CBM-Komplexes vermitteln und somit eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs sowie der NF- κ B-abhängigen Genexpression permanent aufrechterhalten⁷². Die exogene Expression dieser mutierten CARD11 Varianten bei NF- κ B-unabhängigen Lymphom-Zelllinien erzeugte ebenfalls eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs⁷². Der Großteil der ABC DLBCL Fälle weist jedoch keine CARD11 Mutationen auf. Nichtsdestotrotz verfügen diese Lymphome über eine hohe NF- κ B-Aktivität. Knapp 3% bzw. 21% der ABC DLBCL tragen Mutationen in der CD79A- bzw. CD79B- Untereinheit des BZR, die meist im Austausch eines Tyrosin-Rests in der ITAM Region resultieren⁷¹. Diese Mutationen ermöglichen eine erhöhte BZR-Expression auf der Zelloberfläche sowie eine verminderte Aktivierung der LYN Kinase, einem Gegenregulator des BZR-Signalwegs, und begünstigen somit die chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs⁷¹. Bei ca. 30% der ABC DLBCL Fälle liegt eine MYD88 (*myeloid differentiation Primary Response 88*)-aktivierende L265P Mutation vor, die die Formierung eines Multi-Proteinkomplexes begünstigt, der bei einer gewöhnlichen Immunantwort u.a. die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs einleitet¹¹¹. MYD88 fungiert als Adapterprotein in der pro-inflammatorischen Signalweiterleitung zwischen Interleukin 1/18- bzw. Toll-like-Rezeptoren, IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*) 1/2/4 und Effektoren, wie MAP (*mitogen-activated protein*) Kinasen, NF- κ B und IRFs und nimmt somit eine zentrale Rolle in der Regulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems ein¹¹¹⁻¹¹⁴. Die MYD88 L265P Mutation begünstigt die Rekrutierung von IRAK4, welches IRAK1 phosphoryliert^{111,114}. Das phosphorylierte IRAK1 kann daraufhin mit der Ubiquitin-Ligase TRAF6 interagieren und seinerseits durch Aktivierung des IKK-Komplexes den NF- κ B-Signalweg in Gang setzen (Abbildung 1.3)^{114,115}. Die Expression von mutiertem MYD88 ist wegen seiner Rolle in der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs essenziell für das Überleben bei einem großen Teil der ABC DLBCL¹¹¹.

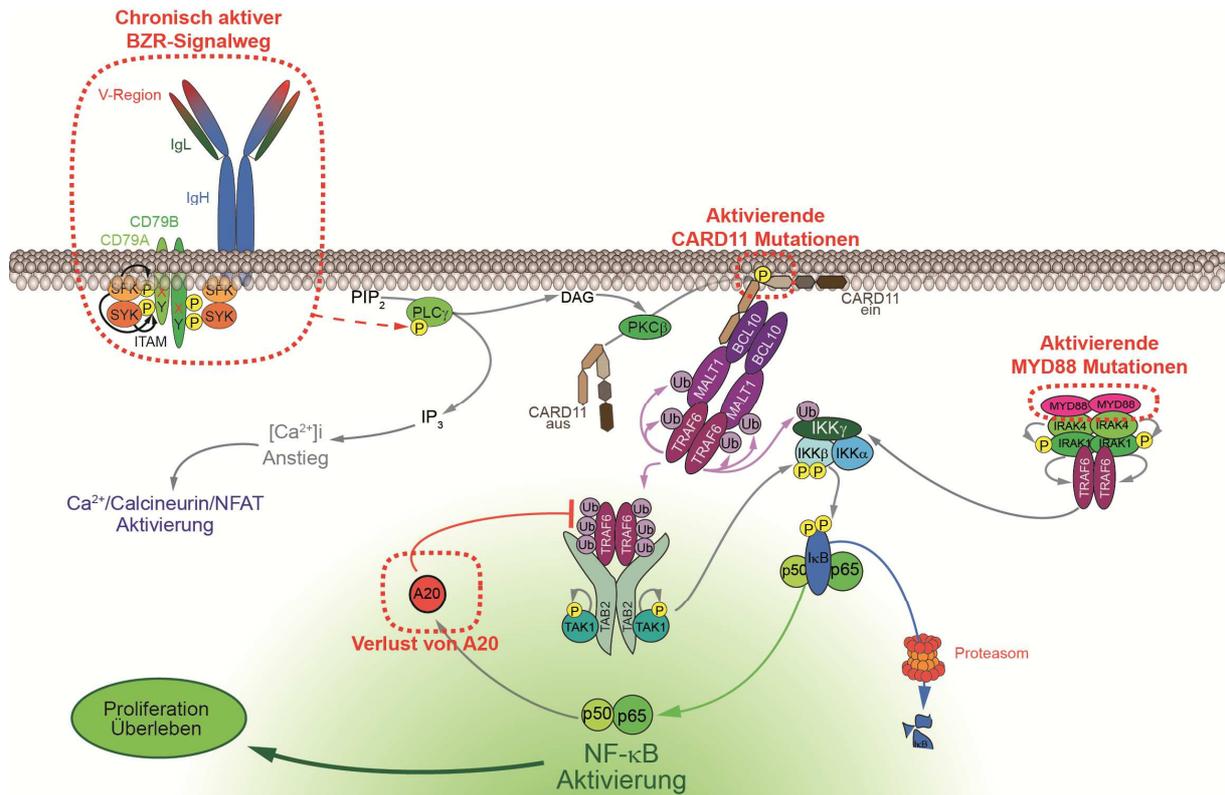


Abbildung 1.3: Genetische Läsionen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des NF-κB-Signalwegs bei ABC DLBCL. Durch ITAM Mutationen der BZR-Untereinheiten CD79A/CD79B liegt der BZR in einer chronisch aktiven Form vor. Über den BZR-Signalweg kann PLCγ aktiviert werden, die die Hydrolyse von PIP₂ zu DAG und IP₃ katalysiert. IP₃ induziert einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) und die damit verbundene Aktivierung des Ca²⁺-Calcineurin-NFAT-Signalwegs. DAG ermöglicht eine PKCβ-vermittelte Phosphorylierung des Gerüstproteins CARD11, das zusammen mit BCL10-assoziiertem MALT1 den CBM Komplex bildet, der schließlich die Ubiquitin-Ligase TRAF6 induziert. Aktivierende CARD11 Mutationen können eine kontinuierliche Rekrutierung des CBM Komplexes begünstigen, unabhängig von PKCβ. TRAF6 ubiquitiniert u.a. sich selbst und die regulatorische IKKγ Untereinheit des IKK-Komplexes. Das Protein A20 deubiquitiniert sie wieder und wirkt somit der Aktivierung des NF-κB-Signalwegs entgegen. Der A20 Locus ist bei ABC DLBCL häufig deletiert oder das Protein liegt inaktiviert vor, so dass es der IKK-Komplex-aktivierenden Modifikation nicht entgegenwirken kann. Das Adapterprotein TAB2 vermittelt eine TRAF6-abhängige Autophosphorylierung und Aktivierung der Kinase TAK1, die daraufhin das katalytisch aktive IKKβ phosphoryliert. Aktivierende MYD88 Mutationen begünstigen die Interaktion mit IRAK4, das wiederum IRAK1 phosphoryliert. TRAF6 assoziiert mit phosphoryliertem IRAK1 und fördert weiterhin die Aktivierung des IKK Komplexes. Dieser phosphoryliert IκBα und leitet somit die Polyubiquitinierung und proteasomale Degradation des NF-κB-Inhibitors ein. Der Transkriptionsfaktor NF-κB (dargestellt als Heterodimer der NF-κB-Familienmitglieder p50 und p65) induziert die Expression NF-κB-spezifischer Zielgene, die das Überleben und die Proliferation der ABC DLBCL Zelle sicherstellen. Adaptiert von Lenz und Staudt, 2010, Staudt, 2010 und Shaffer et al., 2012^{30,77,108}.

Weiterhin wurde bei ca. 30% der ABC DLBCL eine gestörte Negativregulation der NF-κB-Signalweiterleitung über biallelische Inaktivierung des A20 Gens durch Mutation bzw. Deletionen seines Genlokus auf dem Chromosomenabschnitt 6q23.3 beschrieben^{116,117}. A20 wirkt der NF-κB-vermittelten Signalweiterleitung entgegen, indem es Komponenten der Signalkaskade, wie IKKγ, MALT1 und TRAF6 deubiquitiniert und diese somit deaktiviert¹¹⁸⁻¹²⁰. Eine Inaktivierung dieses NF-κB-Negativregulators wirkt sich daher förderlich auf die konstitutive Aktivierung des NF-κB-Signalwegs aus. Die exogene Expression von Wildtyp-,

jedoch nicht von mutiertem A20 bei A20-defizienten Zellen, führt zu einer Reduktion der Proliferation und einer vermehrten Apoptose durch Unterbrechung der NF- κ B-Signalweiterleitung¹¹⁷. Da das Fehlen von A20 die Signalweiterleitung jedoch nicht initiieren, sondern lediglich verstärken kann, reicht die Deletion bzw. Inaktivierung von A20 alleine nicht aus, um den NF- κ B-Signalweg zu aktivieren, so dass weitere NF- κ B-aktivierende Läsionen, wie die chronische Aktivierung des BCR-Signalwegs oder Mutationen im MYD88 Protein gleichzeitig präsent sein müssen⁷⁷.

1.5.3 Amplifikation des *NFATc1* Genlokus bei ABC DLBCL

Bei ca. 40-50% der ABC DLBCL Patientenbiopsien konnte eine Amplifikation oder ein Hinzugewinn (*Gain*) des gesamten oder eines Teils des Chromosomenabschnitts 18q beobachtet werden (Abbildung 1.4 A)^{66,121}. Auf diesem Chromosomenabschnitt wird u.a. der Transkriptionsfaktor *NFATc1* (*nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1*) codiert, dessen mRNA-Expression signifikant mit der Amplifikation seines Chromosomenabschnitts korreliert (Abbildung 1.4 B).

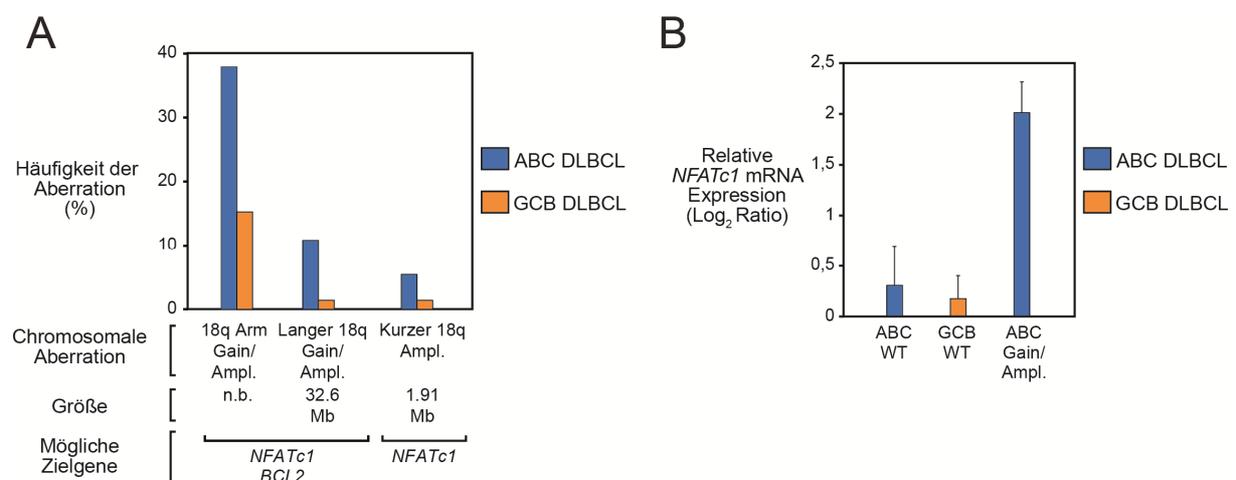


Abbildung 1.4: Häufig beobachtete Amplifikationen des Chromosomenabschnitts 18q bei ABC DLBCL Patienten. **A** Eine Amplifikation (Ampl.) oder ein Hinzugewinn (*Gain*) des gesamten 18q Chromosomenarms ist bei ca. 40% der 74 untersuchten ABC DLBCL Fälle ermittelt worden. Eine Amplifikation oder Hinzugewinn des langen bzw. kurzen 18q Chromosomenabschnitts ist mit 10 bzw. 5% ebenfalls häufiger bei ABC DLBCL Biopsien verzeichnet worden als bei den 72 untersuchten GCB DLBCL Fällen. **B** Eine erhöhte *NFATc1* mRNA-Expression korrelierte mit der 18q Amplifikation bzw. einem Hinzugewinn bei ABC DLBCL Patienten, wurde jedoch nicht bei ABC oder GCB DLBCL Fällen mit einem Wildtyp Chromosom 18 beobachtet. n.b. nicht bestimmt. Adaptiert von Lenz et al., 2008⁶⁶.

Bei ABC DLBCL Biopsien mit einer 18q Amplifikation ließ sich eine ca. 4-mal höhere *NFATc1* mRNA-Expression nachweisen, als bei GCB oder ABC DLBCL Biopsien ohne eine solche Amplifikation⁶⁶. Eine vermehrte Expression und Aktivierung von *NFATc1* ist bereits bei einer Reihe von Neoplasien als onkogen beschrieben worden^{122,123}. Hier reguliert *NFATc1* die Expression von Genen, die Tumor-assoziierte Prozesse, wie z.B. Angiogenese, Proliferation,

Migration und Überleben induziert¹²⁴⁻¹²⁸. Diese Prozesse sind essenziell für die Initiation und Progression der Tumorgenese, daher suggeriert sowohl die häufig beobachtete 18q Amplifikation als auch die vermehrte Expression von *NFATc1* eine Beteiligung von NFATc1 an der molekularen Pathogenese von ABC DLBCL^{45,66}.

1.6 Die Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren

Vor bereits mehr als 20 Jahren ist das erste Mitglied der NFAT Familie als DNA-bindendes Element im IL-2 Promoter aktivierter T-Zellen beschrieben worden^{129,130}. Aufgrund einer hohen Funktions- und Sequenzähnlichkeit konnten kurz darauf drei weitere Familienmitglieder identifiziert werden^{131,132}. Schließlich klonierte die Gruppe um Anjana Rao 1999 das fünfte, noch fehlende NFAT-Familienmitglied¹³³. Schnell war klar, dass die Expression von NFAT Proteinen nicht allein auf T-Lymphozyten beschränkt ist, sondern dass unterschiedliche NFAT Familienmitglieder regulatorische Funktionen in verschiedenen Entwicklungsstadien und in Zellen unterschiedlicher Organe und Gewebe übernehmen, wie z.B. bei der Entwicklung der Herzklappen, Herz- und Skelettmuskulatur, Knochen, Pankreas sowie bei der Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Zellen^{132,134-143}. Gegeben durch das breite Spektrum an biologischen Prozessen der Differenzierung und des Zellwachstums, die NFATs regulieren können, war es nicht überraschend, dass ihre Fehlregulation Einfluss auf die maligne Transformation nehmen und die Entstehung von Brust-, Bauchspeicheldrüsen- oder Darmkrebs sowie von Lymphomen und Leukämien begünstigen kann^{122,123,144-146}.

Zu der Familie der humanen NFAT Transkriptionsfaktoren gehören NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 und NFAT5. Jedes Familienmitglied wird außerdem in mehreren Isoformen exprimiert, die sich in ihrer Größe, dem Vorkommen in unterschiedlichen Geweben und ihrer Funktion unterscheiden können^{147,148}. Laut NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sind für den humanen *NFATc1* Lokus derzeit zehn Transkriptvarianten bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Größe und der translatierten Exone unterscheiden^{149,150}. NFAT5 nimmt bezüglich seiner Expression, Proteinstruktur und Aktivierung eine Sonderrolle innerhalb der NFAT Familie, weshalb es hier außen vor gelassen wird^{123,151,152}.

1.6.1 Strukturelle Merkmale von NFATc1

Charakteristische Merkmale von NFATc1 sind eine amino- (N-) terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), eine regulatorische Domäne, die auch als NFAT Homologie Region (NHR) bekannt ist, eine hoch konservierte DNA-Bindedomäne (DBD) und eine carboxy- (C) terminale Domäne (Abbildung 1.5). Außerhalb der NHR und der DBD ist die

Sequenzähnlichkeit unter den NFAT-Familienmitgliedern schwach konserviert. Die Sequenzen innerhalb der C-terminalen Domäne jedoch weisen kaum Ähnlichkeiten auf (Abbildung 1.5).

Die unter NFAT Proteinen konservierte NHR dient vor allem der Regulation der subzellulären Lokalisation, und somit auch gleichzeitig der Aktivitätsregulation des Transkriptionsfaktors. Sie trägt zwei Serin-reiche Regionen (SRR) und drei Serin-Prolin (SP) Motive, deren Anordnung unter den NFATs konserviert ist. Eine starke Phosphorylierung dieser Serin-Reste maskiert das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) von NFATc1, wodurch es im Zytosol inaktiv vorliegt¹⁵³⁻¹⁵⁶. Zusätzlich verfügt NFATc1 über eine zweite funktionelle NLS, die sich am C-Terminus der DBD befindet¹⁵⁷. Die regulatorische NHR wird auf einem einzigen Exon codiert¹⁵⁸. Am N-Terminus der NHR befindet sich eine Bindestelle für Calcineurin, deren Sequenz (PxIxIxT) unter den NFAT-Familienmitgliedern ebenfalls konserviert ist (Abbildung 1.5). Eine weitere Calcineurin Bindestelle (LxVP) für ist bei NFATc1 direkt hinter dem nukleären Exportsignal (NES) lokalisiert^{159,160}.

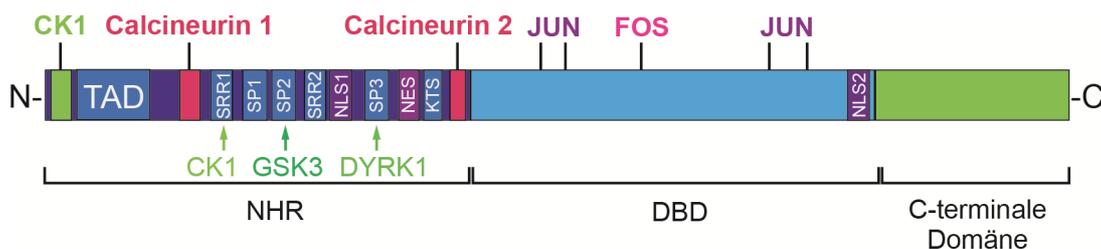


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Primärstruktur des NFATc1 Proteins. Abgebildet ist die Primärstruktur von NFATc1, die in drei Protein-Domänen aufgeteilt werden kann; die NHR, DBD sowie die C-terminale Domäne. In der NHR befinden sich die regulatorischen Elemente von NFATc1, zu denen die phosphorylierbaren SRR- und SP-Motive gehören. Diese können durch die Kinasen CK1, GSK3 und DYRK1 phosphoryliert werden. Die TAD von NFATc1 liegt zwischen der CK1 Bindestelle und der ersten Bindestelle für Calcineurin. Eine weitere Calcineurin-Bindestelle liegt im N-terminalen Bereich der NHR. Die NLS1 sowie die NES befinden sich ebenfalls in der NHR, während sich die zweite NLS in der DBD befindet, kurz vor Beginn der C-terminalen Domäne. Mit Hilfe der DBD geht NFATc1 Interaktionen mit der DNA sowie Mitgliedern der AP-1 Familie, wie JUN und FOS, ein. Adaptiert von Mancici und Toker, 2009, sowie Müller und Rao, 2010^{122,123}.

Die TAD von NFATc1 ist für die Induktion von Zielgenen verantwortlich, indem sie mit Ko-Aktivatoren des Transkriptions-Initiationskomplexes in Kontakt tritt. Sie befindet sich N-terminal von der NHR und besteht hauptsächlich aus sauren Aminosäureseitenketten¹⁴⁸. Die NFATc1 Transkriptionsfaktoren haben eine ca. 300 Aminosäuren lange DBD, die eine starke Strukturähnlichkeit zu der Rel-Homologie-Region (RHR) von Transkriptionsfaktoren der Rel/NF- κ B-Familie aufweist^{131,161-163}. Die DBD lässt sich weiterhin in zwei Domänen einteilen; die N-terminale DNA-Bindedomäne, die die sequenzspezifische DNA-Bindung von NFATc1 erlaubt, und die C-terminale Protein-Bindedomäne, die eine Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren ermöglicht¹⁶⁴. Die Funktion der C-terminalen Region liegt in der

Unterstützung der NFATc1-Transaktivität¹⁶⁵. Aufgrund unterschiedlicher *splicing*-Möglichkeiten unterscheiden sich sowohl die C-terminale als auch N-terminale Domäne innerhalb der NFATc1 Isoformen in ihrer Länge, Zusammensetzung, Aktivierbarkeit und Funktion^{147,150,166}.

1.6.2 Aktivierung von NFATc1 über den Ca²⁺-Calcineurin-NFAT-Signalweg

NFATc1 liegt im inaktiven Zustand stark phosphoryliert im Zytosol vor, kann jedoch Calcineurin-vermittelt dephosphoryliert, somit aktiviert und anschließend in den Nukleus transloziert werden¹⁶⁷. Calcineurin wiederum wird erst aktiv, sobald ein ausreichend starker und langanhaltender Anstieg an Ca²⁺ innerhalb der Zelle vorliegt. Freies, zytoplasmatisches Ca²⁺ ist einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe und kann u.a. durch Aktivierung des BZR-Signalwegs freigesetzt werden (Abbildung 1.6)¹⁶⁸. Die Signalweiterleitung mittels Ca²⁺ wird über die Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) im Zytosol reguliert, die innerhalb von Minuten von dem Niveau einer ruhenden ($[Ca^{2+}]_i$ liegt bei ca. 100nM) auf das einer aktivierten Zelle ($[Ca^{2+}]_i$ steigt auf ca. 1µM) angehoben werden kann^{168,169}. Der am besten untersuchte Weg den zytoplasmatischen Ca²⁺-Spiegel zu erhöhen läuft hauptsächlich über einen Ca²⁺-induzierten Ca²⁺-Einstrom ab, den sogenannten *Store-Operated Ca²⁺ Entry* (SOCE) oder *Capacitative Calcium Entry*^{170,171}. Dieser Prozess koppelt die Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Reserven an das Einströmen von extrazellulärem Ca²⁺ über spezialisierte Ca²⁺-Kanäle, um die $[Ca^{2+}]_i$ in der Zelle zügig anzuheben. Hierfür bindet IP₃ an ubiquitär exprimierte IP₃-Rezeptoren (IP₃R), die sich auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER), einem großen, intrazellulären Ca²⁺-Speicher, befinden und leitet dadurch einen Ca²⁺-Austritt aus dem ER in das Zytosol über Ca²⁺-Kanäle ein^{172,173}. Das freie Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern alleine reicht jedoch für eine Induktion weiterer Effektoren nicht aus. Daher muss zusätzliches Ca²⁺ aus dem Extrazellularraum über Ca²⁺-Kanäle, sogenannte CRAC (*Ca²⁺-release activated Ca²⁺*) -Kanäle in der Plasmamembran, in die Zelle einströmen¹⁶⁹. Dies wird initiiert, indem das ER-gebundene Ca²⁺-Sensorprotein STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) den abfallenden Ca²⁺-Spiegel im ER-Lumen registriert. Es oligomerisiert zu Clustern und bewegt sich entlang der ER-Membran in die Nähe von ORAI1, einem Bestandteil des CRAC-Kanals¹⁷⁴. STIM1 bindet an ORAI1 und aktiviert somit die Öffnung des CRAC-Kanals für einströmendes, extrazelluläres Ca²⁺^{175,176}. Durch die schlagartige Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels wird daraufhin die Ca²⁺/CaM-abhängige Phosphatase Calcineurin aktiviert^{177,178}. Hierfür muss zunächst eine $[Ca^{2+}]_i$ von 500nM überschritten werden, damit CaM freies Ca²⁺ binden und nach einer Konformationsänderung mit CaM-bindenden Proteinen, unter anderem Calcineurin, interagieren¹⁷⁹. Calcineurin bindet freies Ca²⁺ sowie CaM, wodurch sich die auto-

inhibitorische Domäne von Calcineurin verschiebt und NFATc1 gebunden und dephosphoryliert werden kann (Abbildung 1.6)¹⁷⁸.

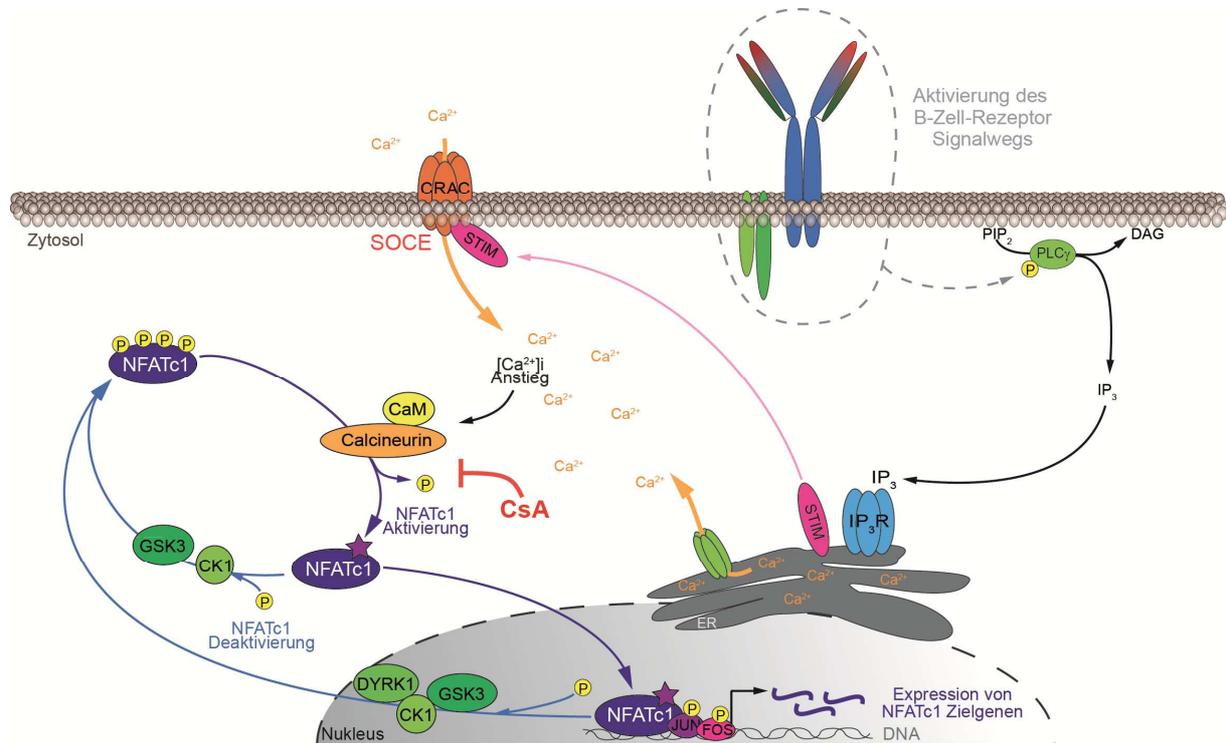


Abbildung 1.6: Aktivierung und Deaktivierung von NFATc1. Die Initiation des BZR-Signalwegs führt zu der Spaltung von PIP₂ zu DAG und IP₃ durch PLC γ . Letzterer sekundärer Botenstoff bindet an IP₃ Rezeptoren (IP₃R), die sich zahlreich auf der ER-Oberfläche befinden und die Öffnung von ER-Ca²⁺-Kanälen vermitteln, so dass Ca²⁺ in das Zytosol entlassen wird. Das Ca²⁺-Sensorprotein STIM1 erfasst die Abnahme der [Ca²⁺]_i im ER und löst sich aus der ER-Membran, um durch Interaktion mit dem Zellmembran-gebundenen CRAC Kanal den Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ einzuleiten. Die Konzentration an intrazellulärem freiem [Ca²⁺]_i steigt an, so dass CaM Ca²⁺ bindet, in Interaktion mit Calcineurin tritt und diese aktiviert. Inaktives NFATc1 liegt stark phosphoryliert im Zytosol vor und wird durch das aktivierte Calcineurin dephosphoryliert, wodurch die NLS (dargestellt als violetter Stern) des Transkriptionsfaktors freigelegt wird. Das aktivierte NFATc1 wird in den Nucleus transloziert, wo es durch Kooperation mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Expression NFATc1-spezifischer Gene induziert. Die Rephosphorylierung von NFATc1 durch NFAT-Kinasen, wie DYRK1 und GSK3, beendet die Transaktivierung und versetzt NFATc1 in den inaktiven Ausgangszustand im Zytosol zurück. *Maintenance* Kinasen sorgen für eine kontinuierliche Phosphorylierung des zytosolischen NFATc1 Proteins. Die Behandlung mit CsA inhibiert Calcineurin und verhindert dadurch die Dephosphorylierung von NFATc1. Adaptiert von Mancini und Toker, 2009¹²².

Um die NFATc1-abhängige Genexpression zu aktivieren, müssen zwei Schritte unternommen werden. Erstens muss das inaktive, stark phosphorylierte NFATc1 im Zytosol der Zelle dephosphoryliert werden. Die Dephosphorylierung ist die wichtigste biochemische NFATc1-Modifikation nach Stimulation der Zelle und wird durch die Ca²⁺/CaM-abhängige Phosphatase Calcineurin katalysiert^{131,154,180,181}. Die Dephosphorylierung durch Calcineurin legt die NLS von NFATc1 frei, mit deren Hilfe der Kernimport von NFATc1 ermöglicht wird. Zweitens muss NFATc1 über Kernporen-Komplexe aus dem Zytosol aktiv in den Zellkern transloziert werden, wo es in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen induziert, wobei es an DNA-Bindemotive mit der Kernsequenz

5'-(T/A)GGAAA-3' bindet^{180,182}. Zu den häufig genannten Transkriptionsfaktoren, die mit NFATc1 zusammen agieren können, gehören unter anderem Komplexe der AP1 (*Activator Protein 1*)-Familie^{183,184}. Die Calcineurin-vermittelte NFATc1 Aktivierung kann unter Verwendung von Inhibitoren, wie Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) blockiert werden (Abbildung 1.6)¹⁸⁵.

Die Beendigung der NFATc1-vermittelten Genexpression wird durch den Kernexport von NFATc1 vermittelt. Dieser wird durch Phosphorylierung von NFATc1 initiiert, die durch unterschiedliche Kinasen bewerkstelligt wird (Abbildung 1.5 und Abbildung 1.6). Mittlerweile sind unterschiedliche NFAT Kinasegruppen bekannt; die Export Kinasen, *Priming* Kinasen und die sogenannten *Maintenance* (Erhaltungs-) Kinasen. *Maintenance* Kinasen, wie CK1 (*casein kinase 1*), regulieren durch kontinuierliche Phosphorylierung von NFATc1 dessen Verbleiben im Zytosol¹⁵⁶. Demgegenüber können Export Kinasen, wie GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) oder auch DYRK1 (*dual-specificity tyrosin-phosphorylation-regulated kinase 1*), den Export von NFATc1 durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors induzieren^{155,186-189}. Des Weiteren wird an mancher Stelle die Phosphorylierung von NFATc1 durch eine sogenannte *Priming* Kinase benötigt, bevor Export Kinasen anschließend die Möglichkeit haben, NFATc1 zu binden, um es zu phosphorylieren. Die NFATc1-Phosphorylierung durch GSK3 z.B. benötigt eine vorherige Phosphorylierung durch die *Priming* Kinase PKA¹⁸⁶.

Sobald die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung von NFATc1, z.B. durch Beenden des Ca²⁺-Stimulus, unterbunden wird, findet ein zügiger Rücktransport von NFATc1 in das Zytosol statt ($t_{1/2}$ ~15 min.)¹⁹⁰. Die De- und Rephosphorylierung und der daraus folgende nukleäre Import und Export von NFATc1 in einer Zelle kann mehrfach hintereinander erfolgen, was verdeutlicht, wie dynamisch das Zwischenspiel zwischen Calcineurin und konstitutiv aktiven NFAT-Kinasen in der Regulation von NFATc1 ist¹⁸².

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor NFATc1 ist unentbehrlich für die Induktion einer adäquaten Zellantwort auf eine Reihe von Stimuli, bei unterschiedlichen Zelltypen und in verschiedenen Stadien der Entwicklung^{135,137,191}. So wird die transkriptionelle Aktivität von NFATc1 bereits in der frühen Embryogenese für die Entwicklung der Herzklappen benötigt und nimmt eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Haut, Knochen, und Muskulatur sowie in der Differenzierung und Aktivierung von B- und T-Zellen ein^{134,136,141,192,193}. Jedoch kann NFATc1 die Transkription von Onkogenen vermitteln, sobald es übermäßig exprimiert und aktiviert wird^{128,194-196}. Eine signifikant erhöhte *NFATc1* mRNA-Expression konnte häufig bei ABC DLBCL Biopsien beobachtet werden, die eine Amplifikation des *NFATc1* Genlokus auf dem Chromosomenabschnitt 18q aufweisen⁶⁶. Diese Beobachtung suggeriert eine Beteiligung von NFATc1 an der molekularen Pathogenese von ABC DLBCL.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war es zunächst zu ermitteln, ob die Konstitution des *NFATc1* Genlokus und die NFATc1-Expression bei ABC und GCB DLBCL Zelllinien mit Hinblick auf die publizierten Daten aus Patientenbiopsien korrelieren. Hierdurch sollte geprüft werden, ob die zu verwendenden DLBCL Zelllinien geeignete Modelle für eine Untersuchung der Rolle von NFATc1 bei der molekularen Pathogenese von DLBCL darstellen. Des Weiteren sollten *NFATc1*-spezifische shRNAs identifiziert werden, die via RNA-Interferenz eine Herunterregulation von NFATc1 ermöglichen, die sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene detektierbar ist. Mit Hilfe dieser shRNAs sollte anschließend die Rolle von NFATc1 am Überleben und der Proliferation verschiedener DLBCL Zelllinien validiert werden. NFATc1-regulierte Gene und Schlüssel-Signalkaskaden sollten mittels genomweiter Genexpressionsanalysen identifiziert, untersucht und auf eine mögliche Nutzbarkeit bei der Behandlung von DLBCL überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Antikörper

Anti- α -Tubulin Mouse mAb (DM1A)
 Anti-BCL10 Rabbit pAb (H-197)
 Anti-BCL2L1 Rabbit mAb (54H6)
 Anti-CD79A Rabbit pAb
 Anti-MYC Rabbit mAb (Y69)
 Anti-FLAG Mouse mAb (M2)
 Anti-HLA-DR Mouse mAb PE-conjugated (G46-6)
 Anti-IkBa Rabbit mAb (L35A5)
 Anti-Mouse IgG (H+L), HRP-linked Goat Ab
 Anti-NFATc1 Mouse mAb (7A6)
 Anti-PARP Rabbit pAb
 Anti-phospho-IkBa (Ser32) Rabbit mAb (14D4)
 Anti-phospho-STAT3 (Tyr705) Rabbit mAb (D3A7)
 Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP-linked Goat Ab
 Anti-STAT3 Rabbit pAb (K-15)

Hersteller

Sigma-Aldrich
 Santa Cruz
 Cell Signaling
 Cell Signaling
 Epitomics
 Sigma-Aldrich
 BD Biosciences
 Cell Signaling
 Southern Biotech
 Thermo Scientific
 Cell Signaling
 Cell Signaling
 Cell Signaling
 Southern Biotech
 Santa Cruz

2.1.2 Antibiotika und Inhibitoren

Antibiotikum oder Inhibitor

Ampicillin
 Cyclosporin A
 Hygromycin
 Puromycin di-Hydrochlorid

Hersteller

Sigma-Aldrich
 Cell Signaling
 Invitrogen
 Sigma-Aldrich

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie oder Reagenz

10x PCR Puffer
 APS
 Bromphenolblau
 cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten
 di-Natriumhydrogenphosphat

Hersteller

GeneAxxon Biosciences
 New England Biolabs
 Carl Roth
 Roche Applied Science
 Carl Roth

Chemikalie oder Reagenz (Fortsetzung)	Hersteller
DMSO	Merck
dNTPs 10mM	Applied Biosystems
Doxycyclin	Sigma-Aldrich
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth
Eisessig	Carl Roth
Ethanol, 96%	Carl Roth
Ethanol, 99,5%	Carl Roth
Ethidiumbromid-Lösung 1%	Carl Roth
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp	Thermo Scientific
Glycin	Carl Roth
Hexadimethrinbromid	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Ladepuffer, 6x konzentriert	Thermo Scientific
LB-Agar	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
LE Agarose	Biozym
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Applied Science
Magermilchpulver	Sucofin
Methanol, 99,5%	Carl Roth
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Carl Roth
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PhosphoSafe™ Extraction Reagent	Merck Millipore
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich
Rotiphorese® Fertiggellösung 40	Carl Roth
SDS Pellets	Carl Roth
SOC-Medium	New England Biolabs
β-Mercaptoethanol	Merck Millipore
TaqMan GenEx Master Mix, 5 ml	Life Technologies
TEMED	Carl Roth
Tris	Carl Roth
Tween 20	US Biological
Ultraview Universal DAB Detection Kit	Ventana

2.1.4 Enzyme

Enzym

*Bam*HI

*Bgl*II

DreamTaq DNA Polymerase

*Eco*RI

Phusion® High-Fidelity-Polymerase

T4 DNA Ligase

Taq Polymerase X

*Xho*I

Hersteller

New England Biolabs

New England Biolabs

Thermo Scientific

New England Biolabs

Thermo Scientific

New England Biolabs

GeneAxxon Biosciences

New England Biolabs

2.1.5 Geräte

Gerät

Accu-Jet Pro Pipettierhilfe

Alpha-Imager EC Multi Image 1

CO₂ Brutschrank Serie CB

Consort EV265 Power Supply

Eppendorf 5424 R Zentrifuge mit Kühlung

Eppendorf Research® Einkanalpipette, 0,5-10µl

Eppendorf Research® Einkanalpipette, 100-1000µl

Eppendorf Research® Einkanalpipette, 20-200µl

Eppendorf Research® Einkanalpipette, 2-20µl

FACSCalibur™ Durchflusszytometer

Heraeus Pico 17 Zentrifuge

Heraeus® Function Line mikrobiologischer Inkubator

Horizontale Gelelektrophoresekammer

IKAMAG RET Magnetrührer

ImageQuant LAS 4000 Detektionsgerät

Inverses Mikroskop AE-20

KS 4000 i control Inkubationsschüttler

Kühlschrank Profiline 421I

Laborgefrierschrank Forma 905

Mikrowelle

Mini-Protean Tetra Cell Laufkammer

MJ-Mini Personal Thermal Cycler

MSC-Advantage Sicherheitswerkbank

NanoDrop 2000

Pioneer PA413 Präzisionswaage

Rollenmischer SRT-9

Hersteller

Brandt

Alphapha Innotec

Binder

Hofer

Eppendorf

Eppendorf

Eppendorf

Eppendorf

Eppendorf

BD Biosciences

Thermo Scientific

Thermo Scientific

VWR

IKA

GE Healthcare

Motic

IKA

Liebherr

Thermo Scientific

Severin

BioRad

BioRad

Thermo Scientific

Thermo Scientific

Ohaus

Stuart Scientific

Gerät (Fortsetzung)

Rotanta 460R Zentrifuge
 StepOnePlus Real-time-PCR System für qPCRs
 Taumelnder Plattformschüttler Polymax 1040
 Thermomixer mit 1,5/2ml Wechselblock
 Tiefkühlschrank -20°C
 TW8 4l Wasserbad
 Victor™ 3X 1420 Multilabel Plate Counter
 Vortex Genie 2

Hersteller

Hettich Centr Fuges
 Applied Biosystems
 Heidolph Instruments
 Eppendorf
 Siemens
 Julabo
 PerkinElmer
 Scientific Industries

2.1.6 Kits

Kit

GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit
 GeneJET PCR Purification Kit
 GeneJET Plasmid Miniprep Kit
 Nuclear Extract Kit
 NucleoSpin® RNA Kit
 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit
 Pierce™ BCA Protein Assay Kit
 QIAEX II Gel Extraction Kit
 DNeasy Blood & Tissue Kit

Hersteller

Life Technologies
 Thermo Scientific
 Thermo Scientific
 Active Motif
 Macherey-Nagel
 DB Pharmingen
 Thermo Scientific
 Qiagen
 Qiagen

2.1.7 qPCR Sonden

qPCR-Sonde TaqMan® Gene Expression Assay

B2M, Hs00984230_m1
 GAPDH, Hs02758991_g1
 NFATc1, Hs00542678_m1

Hersteller

Life Technologies
 Life Technologies
 Life Technologies

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

Adhesive PCR Foil Seal
 Chromatography Paper, 3mm
 DB Discardit™ II Spritzen, 10ml
 DB Falcon Konische PP Röhrchen, steril, 15ml
 DB Falcon Konische PP Röhrchen, steril, 50ml
 DB Falcon PP Rundboden Röhrchen, 5ml
 Filtropur S 0,45 Spritzenfilter
 Gestopfte Pipettenspitzen, 10µl
 Gestopfte Pipettenspitzen, 1000µl

Hersteller

Thermo Scientific
 Whatman
 BD Biosciences
 BD Biosciences
 BD Biosciences
 BD Biosciences
 Sarstedt AG
 Sarstedt AG
 Sarstedt AG

Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

Gestopfte Pipettenspitzen, 20µl	Sarstedt AG
Gestopfte Pipettenspitzen, 200µl	Sarstedt AG
Immobilon-P Transfer Membrane, PVDF, 0,45µm	Merck Millipore
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies
Petrischale, 92x16mm mit Nocken	Sarstedt AG
Reaktionsgefäß, 1,5ml	Sarstedt AG
Reaktionsgefäß, 2ml	Sarstedt AG
Serologische Pipetten, 10ml	Sarstedt AG
Serologische Pipetten, 1ml	Sarstedt AG
Serologische Pipetten, 25ml	Sarstedt AG
Serologische Pipetten, 2ml	Sarstedt AG
Serologische Pipetten, 50ml	Sarstedt AG
Serologische Pipetten, 5ml	Sarstedt AG
Zellkulturflaschen, 25cm ²	Falcon
Zellkulturflaschen, 75cm ²	Falcon
Zellkulturplatten, 12-well	Falcon
Zellkulturplatten, 24-well	Falcon
Zellkulturplatten, 6-well	Falcon
Zellkulturplatten, 96-well, flacher Boden	Falcon
Zellkulturplatten, 96-well, runder Boden	Falcon

2.1.9 Zellkulturmedien, -lösungen und -zusätze

Zellkultur-Medien, Lösungen und Zusätze

BD FACS Clean Solution	BD Biosciences
BD FACSTFlow Sheath Fluid	BD Biosciences
BD FACSRinse Solution	BD Biosciences
β-Mercaptoethanol, ≥99%	Sigma
DMEM, high glucose, Medium	Invitrogen
Fätales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Heparin	Biochrom
Humanes Plasma	Deutsches Rotes Kreuz
IMDM Medium	Invitrogen
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Life Technologies
OPTI-MEM® I reduced Serum Medium	Invitrogen
PBS pH 7,4	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml, 10.000µg/ml)	Biochrom
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX Supplement	Invitrogen
Trypsin-EDTA, 0,05%	Invitrogen

2.1.10 Zelllinien und Kulturbedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neun humane DLBCL Zelllinien verwendet, die anhand ihres Genexpressionsprofils zuvor dem ABC oder GCB DLBCL Subtyp zugeordnet werden konnten^{58,79}. Die Zelllinien sind zuvor bereits gentechnisch modifiziert worden, so dass sie auf ihrer Oberfläche einen ekotropen retroviralen Rezeptor exprimieren, der die Effizienz einer retroviralen Transduktion erhöht¹⁹⁷. Anschließend wurden die Zellen mit retroviralen Viroinen transduziert, die den bakteriellen Tetracyclin Repressor exprimierten¹⁰⁹. Des Weiteren wurde für die Produktion retroviraler Virionen die humane, 293TCeB Zelllinie verwendet, die zuvor gentechnisch so verändert worden ist, dass sie für die Produktion und das Verpacken von Virionen eingesetzt werden konnte^{109,197,198}. Die verwendeten Zelllinie und weitere Informationen sind in Tabelle 2.1 gelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete DLBCL Zelllinien mit Angaben zu ihrem molekularen Subtyp und Kulturbedingungen.

Zelllinie	molekularer Subtyp	Kulturbedingungen	Literatur
OCI-Ly3	ABC DLBCL	OCI-Medium	58
OCI-Ly10	ABC DLBCL	OCI-Medium	58
TMD8	ABC DLBCL	OCI-Medium	71
HBL-1	ABC DLBCL	RPMI mit 10% FCS	109
U2932	ABC DLBCL	RPMI mit 10% FCS	109
OCI-Ly2	GCB DLBCL	IMDM mit 10% FCS	79
OCI-Ly7	GCB DLBCL	IMDM mit 10% FCS	79
OCI-Ly19	GCB DLBCL	IMDM mit 10% FCS	199
HT	GCB DLBCL	RPMI mit 10% FCS	79

2.1.11 Puffer und Medien

Blotting-Puffer

3,03g Tris
14,41g Glycin
200ml 96% Ethanol
Ad 1l H₂O

Laemmli-Probenpuffer 5x konzentriert

1,5ml β -Mercaptoethanol
1,5g SDS
0,015g Bromphenolblau
5,75ml 87% Glycerin
Ad 10ml Sammelgel-Puffer

PBST

1l PBS
5ml Tween 20

Sammelgel-Puffer

60,6g Tris
40ml 10% (w/v) SDS
Ad 1l H₂O
pH 6,8

SDS-Laufpuffer

3,02g Tris
 14,4g Glycin
 1g SDS
 Ad 1l H₂O

Trenngel-Puffer

181,8g Tris
 40ml 10% (w/v) SDS
 Ad 1l H₂O
 pH 8,8

TAE-Laufpuffer

4,84g Tris
 5,72ml Eisessig
 2ml 0,5M EDTA
 Ad 1l H₂O

RPMI-Medium

1l RPMI
 110ml FCS
 11ml Pen/Strep
 1ml 50mM β -Mecaptoethanol

DMEM-Medium

1l DMEM
 110ml FCS
 11ml Pen/Strep

IMDM-Medium

1l IMDM
 110ml FCS
 11ml Pen/Strep
 1ml 50mM β -Mecaptoethanol

OCI-Medium

800ml IMDM
 200ml Humanes Plasma
 4ml 5000U/ml Heparin
 1ml 50mM β -Mecaptoethanol

2.1.12 Vektoren und Oligonukleotide

Die Helferplasmide pHIT/60 und pHIT/EA6x3 codieren für das *Env*-Protein EA6 bzw. die retroviralen *Gag* und *PoI*-Proteine und wurden während der Transfektion der shRNA-Expressionsvektoren in 293TCeB Zellen ko-transfiziert. Sie ermöglichen ein optimales Verpacken der Virionen und liefern die benötigten Enzyme für die Integration in das Zielgenom sowie die reverse Transkription¹⁰⁹. Die shRNA-Oligos wurden in den pRSMX Vektor kloniert (Abbildung 2.1). Dieser basiert auf dem retroviralen pSuper-Vektor, der um den RNA-Polymerase II *H1*-Promoter erweitert worden ist^{109,200,201}. Zudem befindet sich zwischen dem Promoter und der shRNA-Sequenz ein Tetracyclin (Tet)-Operator, der eine Bindestelle für den Tet-Repressor trägt. Dieser verhindert durch die Bindung an den Tet-Operator die Expression der shRNA, löst sich jedoch in Anwesenheit von Doxycyclin ab, so dass die shRNA exprimiert wird²⁰¹. Zusätzlich wurde der pRSMX-Vektor mit einer *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*) cDNA zusammen mit einer *Puromycin-*

Resistenzkassette (pRSMX_PG) ausgestattet bzw. mit einem Puromycin- (pRSMX_P-) oder *Hygromycin* (pRSMX_H-) -Resistenzgen alleine (Abbildung 2.1).

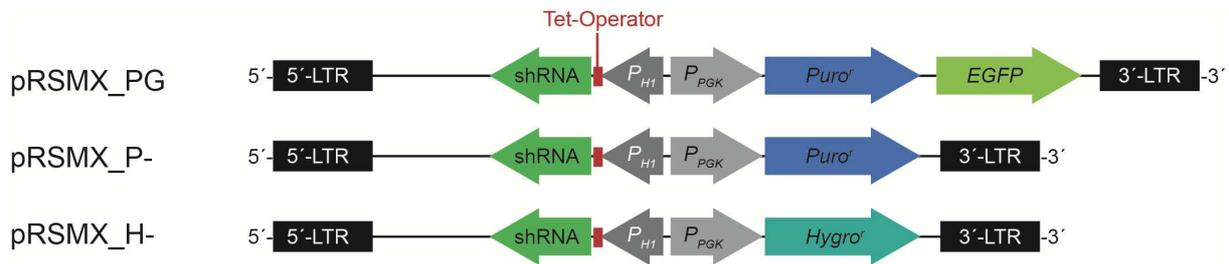


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der verwendeten shRNA-Expressionsvektoren. Mit dem pRSMX Vektor als Basis wurden im pRSMX_PG Konstrukt das *Puromycin*-Resistenzgen (*Puro^r*) und das Reportergen *EGFP* exprimiert. Bei den Vektoren pRSMX_P- und pRSMX_H- wurde nur das *Puro^r* - oder das *Hygromycin*-Resistenzgen (*Hygro^r*) konstitutiv und getrieben durch den *PGK*-Promoter (*P_{PGK}*) exprimiert. Die *H1*-Promoter (*P_{H1}*) -getriebene Expression der shRNA konnte erst nach Doxycyclin-vermittelter Freigabe des dazwischengeschalteten Tet-Operators erfolgen.

Die Expression des EGFPs sowie der Antibiotika-Resistenzgene erfolgte konstitutiv getrieben durch den davorgeswitcheten *PGK*-Promoter (*P_{PGK}*). Die shRNA Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten shRNAs sind in Tabelle 2.2 gelistet. Die gegen *NFATc1* gerichteten shRNAs wurden von Herrn Dr. Andreas Enns identifiziert und im Rahmen dieser Arbeit bezüglich ihres Effekts verifiziert sowie für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Tabelle 2.2: Verwendete shRNA Sequenzen.

Zielgen der verwendeten shRNA	Bindungssequenz der shRNA (5' zu 3')	Literatur
Negativkontrolle <i>MSMO1</i> NM_006745.4_831	CTCTCAACCCTTTAAATCTGA	71
<i>CD79A</i> shRNA #1 NM_001783_962	GGGGCTTCCTTAGTCATATTC	71
<i>CD79A</i> shRNA #2 NM_001783_1135	CAGCGGGTAATGAGCCCTTAA	71
<i>MYC</i> Positivkontrolle NM_002467_bp1940	CCTATGAACTTGTTTCAAATG	202
<i>CARD11</i> Positivkontrolle NM_032415_998	GGACGACAACACTACAACCTTAGC	109
<i>NFATc1</i> shRNA #1 NM_001278669.1_4791	GCGTCTCTTGTGTCTCACTCA	Vorliegende Arbeit
<i>NFATc1</i> shRNA #2 NM_001278669.1_831	GGGCCTGTACCACAACAATAA	Vorliegende Arbeit

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Design und Klonierung von shRNA-Konstrukten

Die shRNA-Oligonukleotide wurden als zwei zueinander komplementäre Sequenzen von je 62 Basen von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt. Die shRNA-Oligonukleotide

wurden so designet, dass der Forwärts- und Rückwärtsstrang der jeweiligen siRNA-Sequenz durch eine *Loop*-Sequenz getrennt wurden. Nach Hybridisierung beider shRNA-Oligonukleotide im MJ-Mini Personal Thermal Cycler entsprechend des unten aufgeführten Protokolls, lagen am 5'- und 3'- Ende Überhänge vor, die die Ligation der dsDNA in einen *HindIII/BglII*-linearisierten pRSMX-Vektor ermöglichten. Vor der Ligation wurde eine 1:200 Verdünnung der hybridisierten shRNA-Inserts in H₂O vorgenommen.

Hybridisierungsreaktion	Hybridisierungsprotokoll		
5µl 100µM shRNA Forwärtsstrang	1.	95°C	9min.
5µl 100µM shRNA Rückwärtsstrang	2.	85°C	9min.
10µl 10x PCR Puffer	3.	75°C	9min.
Ad 100µl H ₂ O	4.	65°C	9min.
	5.	55°C	9min.
	6.	45°C	9min.
	7.	35°C	9min.
	8.	25°C	9min.
	9.	15°C	10min.
	10.	4°C	∞

Für die Ligationsreaktion wurden 0,5µl des *HindIII/BglII*-linearisierten pRSMX-Vektors zusammen mit 1µl Insert, 2,7µl H₂O, 0,5µl 10xPuffer sowie 0,3µl Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend in Transformations-kompetente Bakterien eingebracht.

2.2.2 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden OneShot® TOP10 *E.coli* Bakterien (Life Technologies) verwendet. Diese wurden zunächst für 30min. auf Eis mit der zu transformierenden Plasmid-DNA inkubiert und anschließend für 45sec. einem Hitzeschock im 42°C heißen Wasserbad unterzogen. Nach Abkühlung auf Eis für 2min. wurden die Bakterien mit SOC-Medium versetzt, 1h bei 37°C und 220rpm im Inkubationsschüttler inkubiert und anschließend auf Ampicillin-haltigen (10µg/ml) Agar-Platten ausgesät. Nach einer Inkubation bei 37°C für 12-16h konnten Bakterienkolonien für die weitere Verarbeitung gepickt werden.

2.2.3 PCR zur Identifikation shRNA-Konstrukt-positiver Bakterienkolonien und Visualisierung mittels Gelelektrophorese

Nach Transformation der ligierten shRNA-Konstrukte in Transformations-kompetente Bakterien und Inkubation bei 37°C wurden mehrere Bakterienkolonien einer LB-Platte gepickt und einer PCR zur Identifikation shRNA-Konstrukt-positiver Klone unterzogen. Die

PCR-Reaktion wurde anhand des aufgeführten Protokolls mit Standard-pMSCV-Primern durchgeführt.

Primersequenzen

5'-pMSCV-Primer: 5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTTCGACC-3'

3'-pMSCV-Primer: 5'-GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC-3'

PCR-Reaktion

1µl Bakterienkolonie
 1µl 10µM 5'-pMSCV Primer
 1µl 10µM 3'-pMSCV Primer
 0,25µl 5U/µl Taq Polymerase S
 0,25µl 10µM dMTPs
 2,5µl 10x PCR Puffer
 Ad 100µl H₂O

PCR-Protokoll

1. Denaturierung	95°C	7min.
2. Denaturierung	94°C	20sec.
3. Annealing	58°C	20sec.
4. Elongation	72°C	30sec.
29x Wiederholung der Schritte 2. bis 4.		
5. Finale Elongation	72°C	7min.
6. Kühlung	4°C	∞

Nach Abschluss der PCR wurden jeweils 5µl jeder Reaktion zusammen mit 1µl 6x Ladepuffer gemischt und auf einem 1,5% (w/v) Agarosegel in TAE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die mittels Ethidiumbromid-Lösung angefärbten DNA-Banden wurden im Alpha-Imager UV-Detektor visualisiert. Bakterienkolonien, die shRNA-Konstrukt-Bande der korrekten Größe (ca. 400bp) aufwiesen, wurden der Isolierung von Plasmid-DNA unterzogen.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien

Bakterien, die zuvor mit dem gewünschten Plasmid-Konstrukt transformiert worden sind, wurden in 10µg/ml Ampicillin-haltigem LB-Medium inokuliert und für 12-16h bei 37°C und 220rpm inkubiert. Nach Sedimentation der Bakterien, wurde die Plasmid-DNA mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit gemäß der Angaben des Herstellers isoliert. Die Messung der isolierten DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 2000-Messgerät durchgeführt. Zur Verifizierung der DNA-Sequenzen wurde der Sequenzierservice und die zur Verfügung gestellten pMSCV-Primer der Firma Eurofins MWG Operon in Anspruch genommen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm FinchTV. Sequenzabgleiche sowie Sequenz-Alignments wurden mit dem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Programm des NCBI durchgeführt. Korrekte pRSMX-Konstrukte konnten gleich für die retrovirale Transduktion verwendet werden.

2.2.5 RNA-Extraktion aus DLBCL Zelllinien

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA Kit entsprechend des Standard-Protokolls des Herstellers für kultivierte Zellen. Die Konzentrationsmessung der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop 2000-Messgerät durchgeführt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwertung bei -80°C gelagert.

2.2.6 Herstellung von cDNA

Nach Isolierung der RNA aus DLBCL Zelllinien erfolgte die cDNA Synthese aus 1µg gesamt RNA mit Hilfe des GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kits entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.7 qPCR mittels TaqMan® Gene Expression Assays

Die Detektion der mRNA von *NFATc1* sowie die der Haushaltsgene *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) und *B2M* (*beta-2 microglobulin*) erfolgte mit Hilfe von TaqMan® Gene Expression Assays. Die Sonde des *NFATc1* TaqMan® Gene Expression Assays bindet in der *NFATc1* mRNA zwischen Exon 7 und 8 (2416bp) und amplifiziert ein Produkt von 92bp Länge. Das verwendete System detektiert alle zehn möglichen *NFATc1* Transkriptvarianten. Die Verwendung des Assays erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit der Variation, dass die Messungen mit jeweils der Hälfte des vorgeschriebenen Reaktionsvolumens angesetzt wurden. Die qPCR und Messung wurde am StepOnePlus Real-time-PCR System mit dem Standard-Protokoll vorgenommen. Durch Mitführen eines Standards konnte für jede Messung die relative Expression der jeweiligen mRNA kalkuliert werden. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Durchführung eines einfachen, ungepaarten t-Tests.

2.2.8 Isolierung genomischer DNA

Für die Durchführung einer Array-basierten komparativen Genomhybridisierung (*array-based Comparative Genomic Hybridization; aCGH*) wurde genomische DNA aus DLBCL Zelllinien und den PBMCs eines männlichen Spenders mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die genomische DNA wurde entsprechend der Instruktionen für die Probenvorbereitung von NimbleGen auf eine Konzentration von 250ng/ml eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3 aCGH Analysen

Die aCGH Methode ermöglicht es, chromosomale Veränderungen einer Probe im Vergleich zu einer Kontrollprobe, die keine genetischen Alterationen aufweist, zu untersuchen. Für die Durchführung von aCGH Analysen wurde der aCGH Komplett-Service der Firma Source BioScience imaGenes GmbH Berlin in Anspruch genommen. Es wurden 2,5µg genomischer DNA aus DLBCL Zelllinien sowie aus den PBMCs eines gesunden männlichen Spenders für das Durchlaufen der Qualitätskontrolle und die Hybridisierung auf human CGH 3x720K WG-Tiling v3.0 NibleGene Whole Genome Arrays verwendet. Die Ergebnisse dieser Hybridisierung sind bereits publiziert und in einer öffentlich zugänglichen Datenbank der NCBI GEO (*Gene Expression Omnibus*) hinterlegt (GEO Accession No. GSE43272)⁷⁰. Der Datensatz enthält Informationen zu chromosomalen Aberrationen von acht der neun in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, die gegen eine gesunde, männliche Kontrolle hybridisiert worden sind⁷⁰. Die bioinformatische Kalkulation dieses Datensatzes sowie die Interpretation der Kopienzahlen des *NFATc1* Lokus erfolgte durch Michael Grau des Fachbereichs Physik der Philipps-Universität Marburg. Die Vorgehensweise bei diesen Berechnungen ist in den Zusatzinformationen der Publikation von Wenzel et al., 2013 anhand des dort untersuchten *MCL1* Lokus erläutert^{66,70}. Kurz zusammengefasst wurden Log_2 Verhältnisse einzelner Sonden am *NFATc1* Lokus auf Chromosom 18, relativ zu der männlichen, gesunden Referenz mit einem Wildtyp *NFATc1* Lokus berechnet. Hierdurch konnte die Kopienzahl des betrachteten Chromosomenabschnitts der jeweiligen Zelllinie kalkuliert werden. Ein Log_2 Wert zwischen 0,5 und -0,5 identifizierte die basale Konstitution eines Segments und somit eine Kopienzahl von 2. Log_2 Ratios zwischen 0,5 und 1,5 deuteten auf einen Hinzugewinn (*Gain*) eines Segments, d.h. es lag eine Kopienzahl von 3 vor, während ein Wert von $\geq 1,5$ eine Amplifikation und somit eine Kopienzahl von ≥ 4 bedeutete. Der Verlust eines *NFATc1* Allels, d.h. eine Kopienzahl von 1, lag bei einem Log_2 Wert von $< -0,5$ vor. Die in dieser Arbeit vorgenommene Auswertung der Daten beinhaltete das Zusammenfassen der Interpretation über eine vorliegende basale Konstitution des *NFATc1* Lokus bzw. einen Verlust eines *NFATc1* Allels, einen Hinzugewinn bzw. eine Amplifikation.

2.4 Genexpressionsanalysen nach *NFATc1*-Herunterregulation bei HBL-1

HBL-1 Zellen wurden mit pRSMX_PG Konstrukten mit der shRNA #1 oder shRNA #2 transduziert und selektioniert. Die Expression der shRNAs wurde für 96h durch Zugabe von Doxycyclin induziert. Alle 24h wurde ein Teil der Zellen entnommen, mit PBS gewaschen und bis zur Extraktion der RNA bei -80°C gelagert. Identisch kultivierte Zellen, die jedoch nicht mit Doxycyclin behandelt worden sind, dienten als Kontrollproben zu jedem Zeitpunkt. Nach

Extraktion der RNA wurde die shRNA-vermittelte *NFATc1* mRNA-Herunterregulation mittels qPCR kontrolliert und schließlich die Doxycyclin-induzierten Proben (Cy5-gelabelt) auf Agilent 4x44k v1 dual-color Chips gegen die jeweilige nicht-induzierte Kontrolle (Cy3-gelabelt) zu jedem Zeitpunkt hybridisiert. Die Herstellung der Arrayproben mit der *NFATc1* shRNA #2 erfolgte durch Frau Dr. Mareike Frick. Für die RNA-Qualitätskontrolle, das Labeling und weiteres Aufbereiten der Proben, sowie die Hybridisierung und das Auslesen der Daten wurde der Service der Firma Source BioScience imaGenes GmbH Berlin in Anspruch genommen. Mit Hilfe des einfachen, gepaarten t-Tests wurde die statistische Signifikanz der gemessenen Veränderung für jedes Gen über die vier Zeitpunkte ermittelt. Durch stringentes Festlegen einer Obergrenze der Signifikanz (gepaarter t-Test; $p < 0,0025$) der hoch- bzw. herunterregulierten Gene nach *NFATc1*-Herunterregulation, konnten die in dieser Arbeit vorgelegten *NFATc1 Up* und *Down*-Eigensignaturen definiert werden. Die Listen der hier enthaltenen Gene sind dieser Arbeit angehängt (Tabelle 10.1, Tabelle 10.2, Tabelle 10.3 und Tabelle 10.4). Die bioinformatische Auswertung der Daten, sowie Korrelationsanalyse beider Array Datensätze erfolgte durch Michael Grau des Fachbereichs Physik der Philipps-Universität Marburg. Eine Korrelation beider shRNA Microarray Datensätze wurde durch Michael Grau in persönlichen Mitteilungen bestätigt.

Ebenso wurde die *Gene Set Enrichment-Analysis* (GSEA) der Daten entsprechend der publizierten Vorgaben von Subramanian et al., 2005 von Michael Grau durchgeführt²⁰³. Hierbei wurden die Daten der Genexpressionsanalysen mit 270 bereits etablierten Signaturen aus dem Labor von Louis M. Staudt (http://lymphochip.nih.gov/cgi-bin/signaturedb/signatureDB_DisplayGenes.cgi?signatureID=) vom National Cancer Institute des National Institute of Health, Bethesda abgeglichen. Der ES (*Enrichment Score*) einer Signatur gibt Auskunft darüber, ob die in der Signatur definierten Gene hoch- (negativer ES Wert; max. -1) oder herunterreguliert (positiver ES Wert; max. 1) werden, während der GSEA p-Wert der jeweiligen Signatur die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der man durch Zufall den gleichen ES für diese Signatur erhalten würde. Die FDR (*False Discovery Rate*) ist ein Hinweis darauf, wie diese Wahrscheinlichkeit bei der insgesamt betrachteten Anzahl an Signaturen in der Datenbank ist. Eine Signatur wurde als angereichert betrachtet, sobald der ES der Signatur niedriger als -0,5 bzw. höher als 0,5 war. Der p-Wert sowie die FDR wurden lediglich für angereicherte Gensignaturen berechnet und angegeben.

2.5 Retrovirale Transduktion und zellbiologische Untersuchungen

2.5.1 Retrovirale Transduktion von DLBCL Zelllinien

Die meisten der in dieser Arbeit durchgeführten zellbiologischen Untersuchungen erforderten die stabile Integration von shRNA-Konstrukten in das Genom der DLBCL Zelllinien (Zielzellen). Hierfür wurden die Zielzellen durch shRNA-Konstrukt-tragenden Virionen infiziert, die zuvor von 293TCeB Zellen (Produzentenzellen) hergestellt wurden und eine transiente Transfektion der entsprechenden shRNA-Expressionsvektoren und Helferplasmide erforderten. Die shRNA-Sequenzen sind zuvor mit Hilfe des von Ngo et al. (2006) verwendeten Algorithmus generiert worden, dessen Programmierung sich an den empfohlenen Regeln für den siRNA Design orientiert^{109,204}. Sofern Zellen hergestellt werden mussten, die zwei verschiedene shRNAs exprimieren (doppelt transduzierte Zellen), wurde zunächst die Transduktion und Selektionierung des ersten und, sobald sich die Zellen erholt hatten, die des zweiten Konstrukts durchgeführt. In Abbildung 2.2 ist der Ablauf einer solchen retroviralen Transduktion schematisch dargestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten *NFATc1* shRNAs wurden von Herrn Dr. Andreas Enns und Frau Kerstin Dietze kloniert. Ebenso wurden die ersten experimentellen Untersuchungen zur Identifikation von *NFATc1* shRNAs, die einen toxischen Effekt induzieren, von Herrn Dr. Andreas Enns durchgeführt. Seine Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden, so dass beide identifizierten *NFATc1* shRNAs für weiterführende Untersuchungen genutzt werden konnten.

Transfektion von 293TCeB Zellen mit retroviralen Konstrukten

Die adhärent wachsenden 293TCeB Zellen wurden mit PBS gewaschen, nach enzymatischem Ablösen mit Trypsin-EDTA in OPTI-MEM® aufgenommen und mittels Zentrifugation bei 1000rpm sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend in frischem OPTI-MEM® auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Jeweils 1ml Zellsuspension ist ausplattiert und mit dem Transduktionsmix, bestehend aus dem gewünschten shRNA-Expressionsvektor (7µg Plasmid) und jeweils 3µg jedes Helferplasmids, die für das ektopre Hüllprotein (pHIT/EA6x3) und die retrovirale Polymerase (pHIT/60) codieren, unter Zuhilfenahme des Lipofektamine 2000 Reagenzes in 2ml OPTI-MEM transduziert worden^{205,206}. Nach 3-5h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit 3ml DMEM versetzt. Die hergestellten Virionen wurden in das Kulturmedium abgedont und konnten durch das Abnehmen des Mediumüberstandes der adhärent wachsenden Produzentenzellen zwei und drei Tage später geerntet werden.

Retrovirale Transduktion von DLBCL Zelllinien mit Virion-Überständen

Die Virion-Überstände wurden durch Filtrapur S 0,45µm Filtereinheiten steril filtriert, mit 8µg/ml Polybrene versetzt und min. 1ml Virion-Überstand auf ca. 400-600µl Zielzellen gegeben, die einen Tag zuvor gesplittet worden sind. Durch mechanischen Druck während der Zentrifugation für 90min bei 2500rpm und RT wurden die Virionen in die Zielzellen eingebracht. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen mit 1ml frischem Medium versorgt. Sofern Zelllinien transduziert worden sind, die in OCI-Medium kultiviert werden, wurde dieses vor der Zentrifugation durch IMDM substituiert und anschließend wieder zugeführt. Am folgenden Tag konnte eine erneute Transduktion erfolgen, wenn die Zellen einer Selektionierung unterzogen werden sollten. Zwei Tage später wurde die Effizienz der Transduktion durch durchflusszytometrische Messung ermittelt.

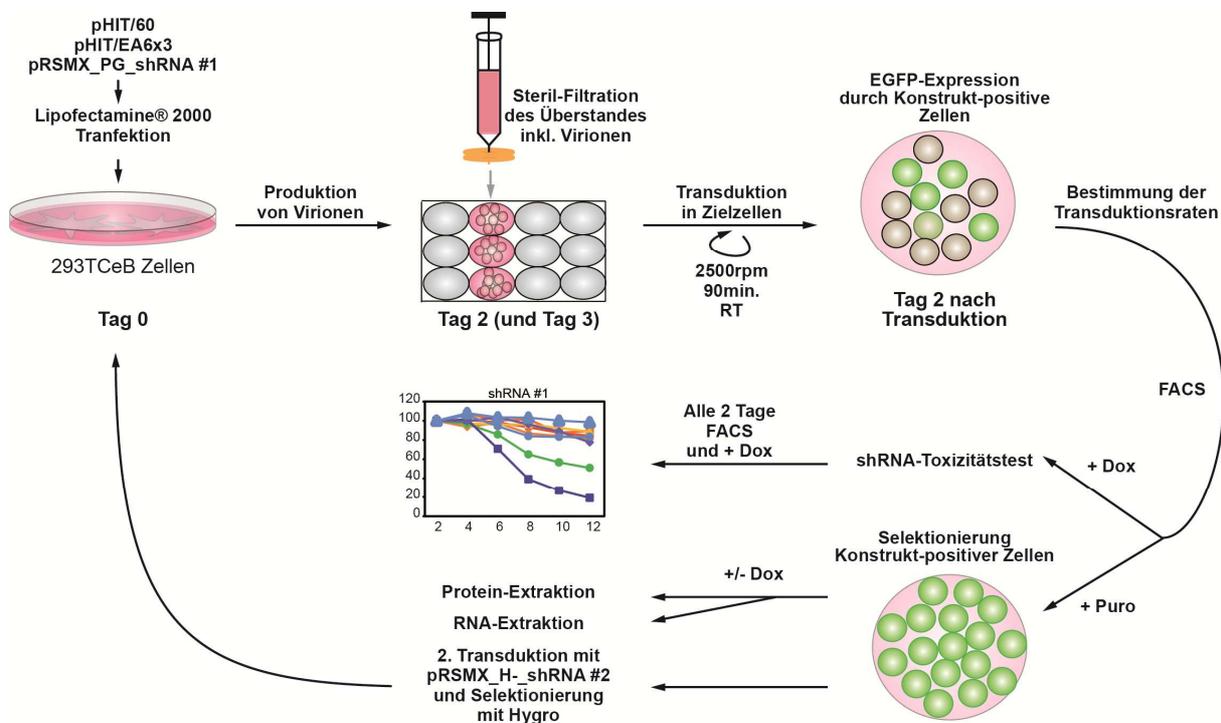


Abbildung 2.2: Schematischer Verlauf einer retroviralen Transduktion. Zu Beginn wurden 293TCeB Zellen mit dem retroviralen shRNA-Konstrukt (pRSMX_PG_shRNA #1) sowie beiden Helferplasmiden (pHit/60 und pHIT/EA6x3) transfiziert. Die Produzentenzellen sonderten anschließend Virionen in das Medium ab. Am Tag 2 und Tag 3 nach Transfektion konnte der Überstand steril-filtrierte und für die Transduktion von DLBCL Zielzellen durch Zentrifugation für 90min bei 2500rpm und RT eingesetzt werden. Zwei Tage nach Transduktion waren die konstrukt-positiven Zellen anhand ihrer EGFP-Fluoreszenz zu erkennen, so dass eine durchflusszytometrische Bestimmung (FACS) der Transduktionsraten möglich war. Anschließend konnten die Zellen zu einem für die Durchführung eines shRNA-Toxizitätstests eingesetzt werden. Hierfür wurde die Größe der EGFP-positiven Zellpopulation alle zwei Tage gemessen und frisches Doxycyclin zum Kulturmedium der Zellen hinzugegeben (+ Dox). Zum anderen konnte eine Selektionierung der konstrukt-positiven Zellen erfolgen, die dann erst mit oder ohne Doxycyclin (+/- Dox) für mehrere Tage inkubiert und schließlich für die Extraktion von Proteinen oder der RNA eingesetzt wurden. Darüber hinaus konnte eine zweite retrovirale Transduktion mit einem weiteren shRNA-Konstrukt erfolgen (pRSMX_H_shRNA #2), um doppelt-transduzierte Zellen zu erhalten. Die konstrukt-positiven Zellen konnten nach der zweiten Transduktion mit Hygromycin (Hygro) selektioniert werden.

2.5.2 Selektionierung und Ficoll-Trennung von Zellen

Sofern eine Zellpopulation benötigt wurde, die annähernd vollständig aus transduzierten Zellen bestehe sollte, wurde den Zellen am Tag 2 nach Transduktion ein Antibiotikum in der in Tabelle 2.3 genannten Endkonzentrationen für 2 bis 4 hinzugefügt. Die Selektionierung der Konstrukt-positiven Zellen wurde für 2-4 Tage durchgeführt. Die hierfür benötigten Antibiotikakonzentrationen wurden zuvor für jede Zelllinie empirisch ermittelt. Sobald die Zellpopulation zu >90% selektioniert war, wurde entweder der Selektionsdruck durch einen einfachen Mediumwechsel genommen oder es wurde eine Ficoll-Trennung zur Isolation der noch lebenden Zellen durchgeführt. Hierfür wurden 4ml Ficoll in ein 15ml Reaktionsröhrchen vorgelegt und anschließend vorsichtig mit 2ml der Zellsuspension beladen. Nach 15min Zentrifugation bei 1000rpm und RT wurden die lebenden Zellen von der Ficoll-Medium-Grenze abgenommen, mit PBS gewaschen und in frischem Medium aufgenommen.

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika und die jeweils eingesetzte finale Konzentration für die Selektionierung der angegebenen, transduzierten Zelllinien.

Antibiotikum	HBL-1	TMD8	HT	OCI-Ly19
Puromycin (µg/ml)	3,5	1,5	3	3
Hygromycin (µg/ml)	400	200	-	-

Eine Ficoll-Trennung ist ebenfalls durchgeführt worden, um mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) eines männlichen Spenders zu isolieren. Aus den PBMCs erfolgte anschließend eine Extraktion der genomischen DNA. Hierfür wurden 10ml EDTA-Blut mit 10ml PBS verdünnt und vorsichtig auf 15ml vorgelegtem Ficoll im 50ml Reaktionsröhrchen beladen. Nach einer Zentrifugation für 45min bei 1000rpm und RT wurde die Schicht aus kernhaltigen Zellen vorsichtig entnommen und mit PBS gewaschen. Anschließend sind die Zellen in PBS auf 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert und für 15min bei 1000rpm und 4°C pelletiert worden. Die Zellpellets wurden bis zur Extraktion der genomischen DNA bei -80°C gelagert.

2.5.3 Doxycyclin-vermittelte Induktion der shRNA-Expression

Nach stabiler Integration der shRNA-Konstrukte im Genom der Zielzelle lag der *H1*-Promoter im inaktiven Zustand vor, da er durch den TET-Repressor inhibiert wurde. Durch Zugabe von Doxycyclin in einer Konzentration von 20µg/ml löste sich der TET-Repressor ab und der *H1*-Promoter wurde aktiv, so dass die Transkription der shRNA-tragenden Sequenz eingeleitet wurde. Zur Aufrechterhaltung einer konstanten und ausreichenden Doxycyclin-Konzentration, wurde dieses alle zwei Tage in einer Konzentration von 20µg/ml hinzugefügt.

2.5.4 shRNA-Toxizitätstest

Mit Hilfe des shRNA-Toxizitätstests sollte überprüft werden, ob die shRNA-vermittelte Herunterregulation eines Gens einen toxischen Effekt auf die Zellen hat, die die shRNA exprimieren^{109,207}. Für die Durchführung eines shRNA-Toxizitätstests wurden DLBCL Zelllinien mit pRSMX_PG_shRNA-Expressionsvektoren transduziert. Nach Ermittlung der Transduktionsraten am Tag 2 durch durchflusszytometrische Messung der EGFP-positiven Zellfraktion, wurde die Doxycyclin-vermittelte Expression der shRNAs in ca. 1,5ml Zellsuspension induziert. Alle zwei Tage wurde erneut die EGFP-positive Zellpopulation gemessen. Etwa 400-800µl der Zellsuspension wurden in neue Kultivierungsgefäße umgesetzt und mit frischem Medium und Doxycyclin versorgt. Die shRNA-Negativkontrolle war gegen das Gen *MSMO1* gerichtet. In Anlehnung an frühere Arbeiten wurde das Proto-Onkogen *MYC* bei den GCB DLBCL Zelllinien herunterreguliert, während bei den NF-κB-abhängigen ABC DLBCL Zelllinien ein etabliertes *CARD11* shRNA-Konstrukt als shRNA-Positivkontrolle gewählt worden ist (Tabelle 2.2)^{70,72,73,202}.

2.6 Durchflusszytometrische Analysen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am FACS Calibur Durchflusszytometer durchgeführt. Die aus den Analysen gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der CellQuest Pro Software prozessiert. Die durchflusszytometrische Messung der Transduktionsraten bzw. der EGFP-positiven Zellfraktion einer Probe wurde in der Regel alle zwei Tage durchgeführt, um den Veränderungen im Laufe eines shRNA-Toxizitätstest bzw. den Erfolg einer Selektionierung Konstrukt-positiver Zellen zu ermitteln. Für den shRNA-Toxizitätstest wurden die Messwerte vom Tag 2 auf 100% gesetzt und alle weiteren Messwerte auf diesen Wert normalisiert.

2.6.1 Messung und Analyse von transduzierten DLBCL Zellen

Die zu messenden Zellproben wurden zunächst mittels Zentrifugation für 5min. bei 1000rpm und RT zentrifugiert und anschließend in 200µl PBS gemischt mit Propidium-Iodid (PI) aufgenommen. Das PI gelangt durch die permeable Membran von apoptotischen Zellen, interkaliert in die DNA und markiert somit diese Zellen. Lebende Zellen haben eine intakte Zellmembran, die nicht permeabel für PI ist. Somit werden die lebenden Zellen im Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) als PI-negatives, und die toten Zellen als PI-positives Messsignal aufgezeichnet. Das Fluoreszenzsignal von EGFP und PI wurde im FL1- bzw. FL2-Kanal gemessen. Pro Probe wurden jeweils 25.000 Zellen gemessen, von denen lediglich die Signale der lebenden Zellen in die Berechnung des

Verhältnisses von EGFP-positiver zu EGFP-negativer Population einbezogen wurden. Sofern die Selektionierung von Zellen kontrolliert werden sollte, die ein EGFP-negatives Konstrukt stabil integriert hatten, musste eine die Transduktion und Selektionierung eines EGFP-positiven Kontroll-Plasmids parallel mitgeführt werden.

2.6.2 Messung der Apoptose bei HBL-1

Die durchflusszytometrische Messung apoptotischer Zellen wurde an doppelt transduzierten HBL-1 Zellen durch Sören Wenzel durchgeführt und erfolgte mit dem Annexin-PE Apoptosis Detection Kit I entsprechend der Herstellerangaben. Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend das Annexin V-PE Signal im FL-2 Kanal sowie die 7-AAD-Fluoreszenz im FL-3 Kanal der lebenden, EGFP-positiven Zellpopulation ermittelt.

2.6.3 Messung der HLA-DR Oberflächenexpression bei HBL-1

Die Veränderungen in der HLA-DR-Expression auf der Oberfläche von HBL-1 Zellen wurde durchflusszytometrisch nach 2 Tagen Behandlung mit CsA bzw. DMSO oder 4 Tagen Doxycyclin-Induktion retroviral-transduzierter Zellen bestimmt. Die retrovirale Konstrukte trugen kein konstitutiv exprimierbares EGFP. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 20min. bei RT im Dunkeln mit 10µl PE-konjugiertem Anti-HLA-DR Antikörper in 200µl PBS gefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die durchschnittliche PE-Fluoreszenz von 30.000 lebenden Zellen im FL-2 Kanal detektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Kalkulation der Ratio von shRNA-transduzierter zu Kontroll-shRNA-transduzierter Zellpopulation und anschließender Normalisierung auf die Kontroll-shRNA Probe. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des einfachen, ungepaarten t-Tests ermittelt.

2.7 Zell-Viabilitätstest mit CsA

Um den Einfluss des immunsupprimierenden Mittels CsA auf die Viabilität der DLBCL Zelllinien HBL-1, TMD8 und HT zu bestimmen, wurden je 100µl Zellsuspension mit einer Zell-Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml auf 96-well Platten ausplattiert und in Duplikaten mit steigenden CsA Konzentrationen bis 7,5µM behandelt. Da das CsA in DMSO gelöst vorlag, wurden Zellen, die die Nullwert-Kontrolle darstellten, äquivalent mit der höchsten eingesetzten Konzentration (0,013% v/v) DMSO behandelt. Ein toxischer Effekt bei dieser DMSO Konzentration ist bei den verwendeten Zelllinien nicht beobachtet worden. Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 2 Tage wurde die Viabilität der DLBCL Zelllinien mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kits entsprechend der Angaben des

Herstellers ermittelt. Es wurden jeweils 50µl Zellsuspension mit gleichem Volumen Cell Titer-Glo® Detektionsreagenz versetzt, für 20min. bei RT inkubiert und die freigesetzte Lumineszenz schließlich am Victor™ 3X 1420 Multilabel Plate Counter ausgelesen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels einfachem, ungepaartem t-Test.

2.8 Proteinbiochemische Untersuchungen

2.8.1 Zellyse und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Extraktion der Gesamtproteine aus DLBCL Zelllinien wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend auf Eis in PhosphoSafe™ Extraction Reagent lysiert, dem zuvor cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten den Herstellerangaben entsprechend beigemischt worden sind. Nach 30min. Inkubation wurden die Lysate für 15min. bei max. Geschwindigkeit und 4°C in der Eppendorf 5424 R Zentrifuge mit Kühlung bei 4°C zentrifugiert. Die Protein-haltigen Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt. Sofern die Fraktionierung von zytosolischen und nukleären Proteinen erforderlich war, wurde die Proteinextraktion mit dem Nuclear Extract Kit den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Vor der Lagerung bei -80°C oder dem Einsatz in der Immundetektion wurden alle isolierten Protein-Lysate einer Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers unterzogen.

2.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (auch SDS-PAGE genannt) erforderte die Herstellung 12%-iger Acrylamid-Trenn- und Sammelgele anhand der unten aufgeführten Rezeptur.

Trenngel	Sammelgel
2,64ml H ₂ O	1,46ml H ₂ O
1,8ml Rotiphorese Fertiggelösung 40	250µl Rotiphorese Fertiggelösung 40
1,5ml Trenngel-Puffer	273µl Trenngel-Puffer
2µl TEMED	2µl TEMED
60µl 10% APS	20µl 10% APS

Die gewünschte Menge an Proteinen wurde in Laemmli-Puffer bei 95°C für 5min. denaturiert und anschließend in Mini-Protean Tetra Cell Laufkammern und SDS-Laufpuffer bei konstanten 100V elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Als Größenkontrolle sind jeweils 5-8µl PageRuler Prestained Protein Ladder mit aufgetragen worden.

2.8.3 Western Blotting

Die im Trenngel aufgetrennten Proteine wurden mit der Western Blot Methode auf eine PVDF-Membran gebracht. Hierfür wurde die Membran nach einer kurzen Inkubation in Methanol zunächst im Blotting-Puffer äquilibriert und anschließend frei von Blasen oder Zwischenräumen zum Trenngel entsprechend der Vorgaben des Herstellers in die Mini-Protean Tetra Cell Laufkammern gestellt. Das Blotten erfolgte unter Kühlung für 1,5h bei konstanten 100V durchgeführt. Anschließend wurde die Membran vorsichtig in PBST gewaschen und in 5% (w/v) Magermilchpulver in PBST (5% Magermilch) geblockt.

2.8.4 Immundetektion

Die geblockten Membranen wurden über Nacht mit 1:1000-verdünntem Primärantikörper in 5% Magermilch bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag 3x5min. mit PBST bei RT gewaschen, bevor sie mit 1:5000-verdünntem Sekundärantikörper in 5% Magermilch für min. 1h auf dem Schüttler bei RT inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen konnte die Detektion der spezifisch durch den Antikörper detektierten Proteinbande unter Zuhilfenahme des Lumi-Light Western Blotting Substrates entsprechend der Herstellerangaben am ImageQuant LAS 400 erfolgen.

3. Ergebnisse

3.1 NFATc1-Expression bei DLBCL Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors NFATc1 bei der molekularen Pathogenese von DLBCL untersucht. Für die folgenden Untersuchungen wurden DLBCL Zelllinien verwendet, die anhand ihres Genexpressionsprofils entweder dem ABC DLBCL (OCI-Ly10, HBL-1, OCI-Ly3, U2932 und TMD8) oder dem GCB DLBCL (OCI-Ly19, HT, OCI-Ly2 und OCI-Ly7) Subtyp zugeordnet werden konnten (Tabelle 2.1). Durch Expressionsanalysen von NFATc1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene sollte überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen der Transkript- und Proteinmenge bei den neun verwendeten DLBCL Zelllinien vorliegt. Die relative Expression der *NFATc1* mRNA wurde mittels qPCR bestimmt und zeigte jeweils Unterschiede innerhalb der fünf ABC und vier GCB DLBCL Zelllinien auf. Die verwendete qPCR-Sonde detektierte dabei alle zehn bekannten *NFATc1* Transkriptvarianten. Die *NFATc1* mRNA-Expression bei HBL-1 und OCI-Ly10 war teilweise doppelt so hoch, wie bei den restlichen drei ABC DLBCL Zelllinien. Ebenso wiesen die GCB DLBCL Zelllinien OCI-Ly19 und HT eine stärkere *NFATc1*-Expression auf, als OCI-Ly2 und OCI-Ly7. OCI-Ly7 exprimierte die niedrigste Menge an *NFATc1* mRNA unter allen untersuchten DLBCL Zelllinien (Abbildung 3.1; Tabelle 3.1).

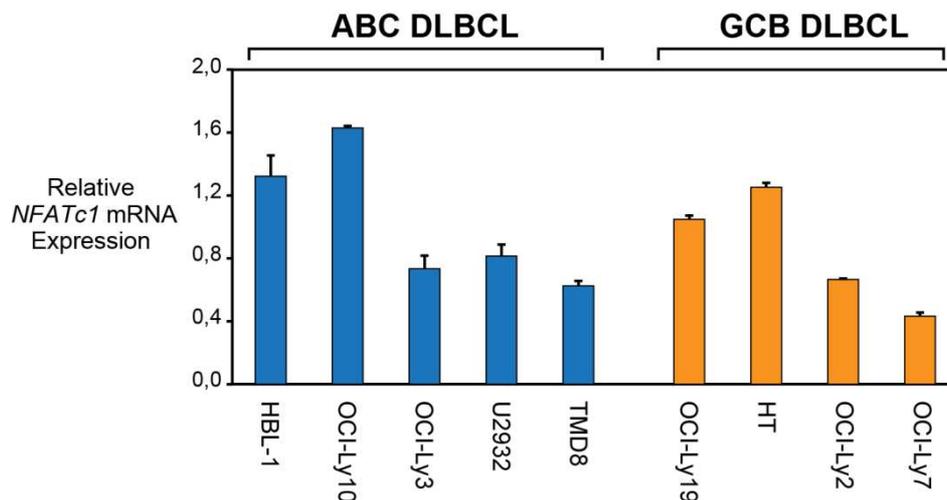


Abbildung 3.1: *NFATc1* mRNA-Expression bei DLBCL Zelllinien. Bei fünf ABC sowie vier GCB DLBCL Zelllinien wurde mittels qPCR die relative Expression der *NFATc1* mRNA bestimmt und auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert. Die Graphen zeigen ein repräsentatives Ergebnis von drei gemessenen Experimenten. Dargestellt ist zudem die Standardabweichung der Duplikate dieses Experiments.

Für die Proteinexpressionsanalyse von NFATc1 wurden Gesamtproteinextrakte der neun DLBCL Zelllinien hergestellt, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot

Transfers auf eine PVDF-Membran gebracht wurden. Bei der ABC DLBCL Zelllinie HBL-1 zeigte sich eine starke basale Expression verschiedener NFATc1 Isoformen mit einer Molekülmasse zwischen 72 und ca. 150kDa (Abbildung 3.2). Bei den ABC DLBCL Zelllinien OCI-Ly10, OCI-Ly3 und U2932, sowie den GCB DLBCL Zelllinien HT und OCI-Ly19 war eine moderate Expression unterschiedlicher NFATc1 Isoformen detektierbar. Die Zelllinien TMD8 und OCI-Ly2 exprimierten nur wenig NFATc1 Protein. Bei der GCB DLBCL Zelllinie OCI-Ly7 konnte keine NFATc1 Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.2; Tabelle 3.1).

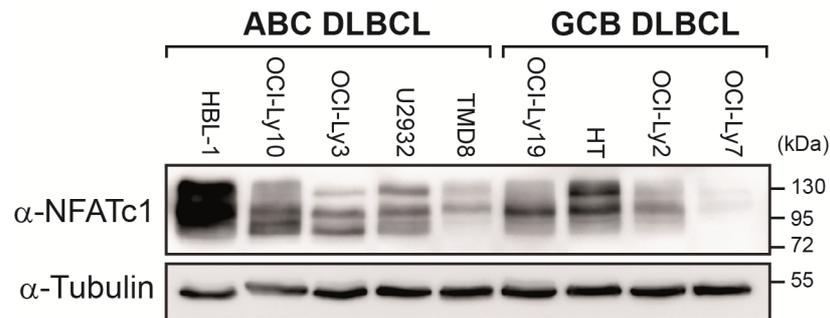


Abbildung 3.2: Western Blot Analyse der basalen NFATc1-Proteinexpression bei DLBCL Zelllinien. Es wurden 50µg Gesamtproteinextrakt aus neun DLBCL Zelllinien aufgetragen und eine SDS-PAGE bzw. ein Western Blot durchgeführt. Auf der PVDF-Membran wurden die exprimierten NFATc1-Isoformen mit einer Größe zwischen 72 und ca. 150kDa, sowie Tubulin als Ladekontrolle bestimmt.

Mit Hinblick auf die tendenziell stärkere (HBL-1, OCI-Ly10, OCI-Ly19 und HT) bzw. schwächste (OCI-Ly7) NFATc1-Expression unter den DLBCL Zelllinien korrelierten die Ergebnisse aus der mRNA- und Proteinexpressionsanalyse weitgehend miteinander. Eine messbare Expression von NFATc1 konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bei allen untersuchten Zelllinien, bis auf OCI-Ly7 detektiert werden. Somit erfüllten die getesteten DLBCL Zelllinien eine erste Voraussetzung, die ein Modellsystem zur Untersuchung von NFATc1 mitbringen sollte.

3.2 ABC DLBCL Zelllinien weisen eine 18q Amplifikation auf

Frühere Arbeiten zeigten, dass eine Amplifikation des Chromosomenabschnitts 18q, auf dem unter anderem *NFATc1* codiert wird, bei knapp 40% der ABC DLBCL Fälle vorkommt und ein möglicher Grund für eine erhöhte Expression von *NFATc1* mRNA ist⁶⁶. Einer aberranten Überexpression bzw. gesteigerten Aktivität von NFATc1 wiederum konnte eine Rolle bei der Tumorentstehung und Metastasierung bei einer Reihe von Krebserkrankungen zugeschrieben werden^{122,123}. Um die zu verwendenden DLBCL Zelllinien als Versuchsmodelle besser zu charakterisieren, wurde zunächst der Status des *NFATc1* Locus auf dem Chromosomenabschnitt 18q23 bei diesen Zelllinien untersucht (Abbildung 3.3 A).

Hierfür wurde auf einen öffentlich zugänglichen aCGH Datensatz der NCBI GEO (*Gene Expression Omnibus*) Datenbank zurückgegriffen (GEO Accession No. GSE43272), der Informationen zu chromosomalen Aberrationen von acht der neun verwendeten Zelllinien liefert⁷⁰. Die GCB DLBCL Zelllinie OCI-Ly19 fehlte in diesem Datensatz.

Durch die aCGH Analysen konnte eine Amplifikation bzw. ein Hinzugewinn (*Gain*) des kurzen 18q23 Arms bei vier (HBL-1, OCI-Ly10, OCI-Ly3 und TMD8) der fünf ABC DLBCL Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch bei keiner GCB DLBCL Zelllinie (Tabelle 3.1). Eine ABC DLBCL Zelllinie (U2932) wies einen Verlust dieses Chromosomenabschnitts auf.

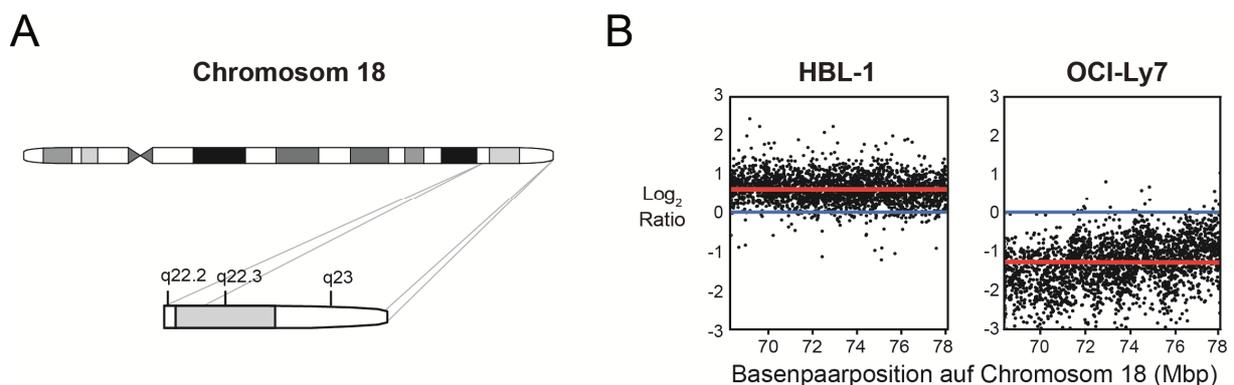


Abbildung 3.3: aCGH Analysen des humanen Chromosomenabschnitts 18q bei DLBCL Zelllinien. **A** Schematische Darstellung des humanen Chromosoms 18 mit einer Vergrößerung des weiterhin in **B** näher betrachteten Chromosomenabschnitts 18q23 und der benachbarten Regionen 18q22.2 und 18q22.3. **B** Repräsentative Darstellungen einer Amplifikation (HBL-1) sowie eines Verlusts (OCI-Ly7) des Chromosomenabschnitts 18q23 sind gezeigt. Jeder Punkt stellt das logarithmische Verhältnis (Log_2 Ratio) eines gemessenen Signals der Zelllinie im Verhältnis zu der Referenz dar. Die blaue Linie läuft bei 0 und veranschaulicht den basalen Verlauf des Messsignals der Referenz, die rote Linie stellt den Durchschnitt des tatsächlich gemessenen Signals der jeweiligen Zelllinie dar. Mbp; Megabasenpaare.

Bei zwei der untersuchten GCB DLBCL Zelllinien (HT und OCI-Ly2) lag dieser Chromosomenabschnitt in seinem Basiszustand vor, während bei OCI-Ly7 ebenfalls ein Verlust des 18q23 Arms detektiert wurde (Abbildung 3.3 B; Tabelle 3.1). Somit bestätigten die aCGH Untersuchungen der DLBCL Zelllinien eine vorwiegend bei dem ABC DLBCL Subtyp auftretende Amplifikation des *NFATc1* Locus auf dem Chromosomenabschnitt 18q23. Da dies die bei Patientenbiopsien gemachten Beobachtungen widerspiegelt, sind die zu untersuchenden Zelllinien auch im Hinblick auf das Vorkommen der 18q Amplifikation ein repräsentatives Modell zur Untersuchung von *NFATc1* bei ABC und GCB DLBCL.

Die Ergebnisse der *NFATc1*-Expression sowie der aCGH Untersuchungen zu jeder Zelllinie sind in Tabelle 3.1 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der NFATc1-Analysen bei DLBCL Zelllinien

DLBCL Zelllinie	DLBCL Subtyp	NFATc1 mRNA	NFATc1 Protein	NFATc1 Kopienzahl	Interpretation
HBL-1	ABC DLBCL	+++	++++	3	Hinzugewinn
OCI-Ly10	ABC DLBCL	++++	+++	3	Hinzugewinn
OCI-Ly3	ABC DLBCL	++	++	5	Amplifikation
U2932	ABC DLBCL	++	++	1	Verlust
TMD8	ABC DLBCL	+	+	3	Hinzugewinn
OCI-Ly19	GCB DLBCL	+++	+++	n.b.	n.b.
HT	GCB DLBCL	+++	+++	2	Basis
OCI-Ly2	GCB DLBCL	+	+	2	Basis
OCI-Ly7	GCB DLBCL	+/-	+/-	1	Verlust

+ bis ++++ aufsteigende Stärke der NFATc1-Expression; +/- kaum oder keine Expression
n.b. nicht bestimmt

3.3 NFATc1-Induktion durch chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs

Bei zwei der untersuchten ABC DLBCL Zelllinien (HBL-1 und TMD8) konnten Punktmutationen identifiziert werden, die sich in der BZR-Untereinheit CD79B befinden⁷¹. Diese Mutationen betreffen das erste Tyrosin (Y) des CD79B ITAMs und haben einen Y196F (HBL-1) bzw. Y196H (TMD8) Aminosäureaustausch zur Folge, der die BZR-Oberflächenexpression steigert und die Kinaseaktivität von LYN, einem Negativregulator des BZR-Signalwegs, hemmen könnte⁷¹. Die shRNA-vermittelte Herunterregulation der BZR-Untereinheit CD79A erwies sich als toxisch für Zelllinien (unter anderem für HBL-1 und TMD8), die eine solche chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs aufwiesen⁷¹. Die Aktivierung des Ca²⁺-Calcineurin-NFAT-Signalwegs kann ebenfalls über den BZR-Signalweg erfolgen^{208,209}. Daher sollte mit dem nächsten Experiment untersucht werden, ob auch im vorliegenden Zellkulturmodell NFATc1 aktiv und somit dephosphoryliert vorliegt. Diese Frage wurde mittels Western Blot Analysen nach shRNA-vermittelter CD79A-Herunterregulation adressiert. Dabei sollte der Phosphorylierungsstatus von NFATc1 nach CD79A-Herunterregulation indirekt Auskunft über den NFATc1-Aktivitätsstatus geben. Für dieses Experiment wurden zwei publizierte CD79A shRNAs (jeweils einzeln und in Kombination) oder die Kontroll-shRNA in HBL-1 Zellen transduziert und die Konstrukt-positiven Zellen selektioniert⁷¹. Anschließend wurde die Expression der shRNAs durch Zugabe von Doxycyclin für 96h induziert und die gewonnenen Gesamtprotein-Lysate mittels Western Blot analysiert.

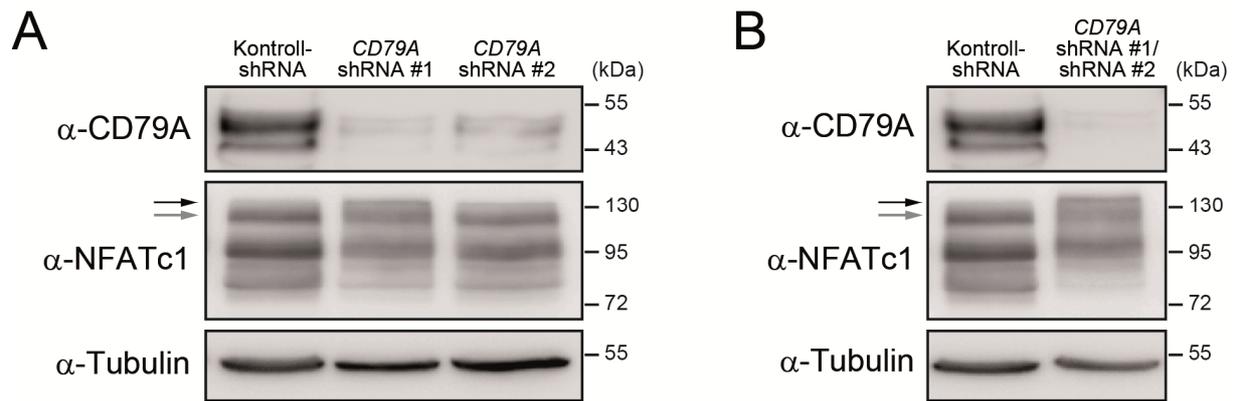


Abbildung 3.4: Die Herunterregulation von CD79A hat Einfluss auf NFATc1 bei HBL-1. A Western Blot Analysen wurden mit 20µg Gesamtprotein-Lysat nach 96h CD79A-Herunterregulation durch *CD79A* shRNA #1 oder shRNA #2 B oder mit beiden shRNAs gleichzeitig durchgeführt. Der Detektion von CD79A folgte die Detektion von NFATc1. Der graue Pfeil deutet auf die Position der längsten NFATc1 Isoform nach Expression der Kontroll-shRNA. Der schwarze Pfeil markiert die Verschiebung der gleichen Isoform in einen höheren molekularen Bereich nach CD79A-Herunterregulation. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von zwei unabhängigen Experimenten.

Eine nahezu vollständige Herunterregulation von CD79A konnte sowohl durch Expression der *CD79A* shRNA #1 als auch mit der *CD79A* shRNA #2 induziert werden (Abbildung 3.4 A). Die *CD79A*-Herunterregulation hatte einen leichten Rückgang der NFATc1-Proteinexpression zufolge (Abbildung 3.4 A). Zudem konnte eine Verschiebung der NFATc1-Proteinbanden in einen höheren molekularen Bereich beobachtet werden (Abbildung 3.4 A und B; grauer und schwarzer Pfeil). Dieser Effekt ist bereits in früheren Studien beschrieben worden und repräsentiert eine stärkere Phosphorylierung der NFATc1 Isoformen, die im SDS-Gel langsamere Laufeigenschaften aufweisen und sich daher im höheren molekularen Bereich präsentieren^{147,210-212}. Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Expression beider *CD79A*-spezifischen shRNAs und eine fast vollständige Herunterregulation von CD79A verstärkt werden (Abbildung 3.4 B). Somit liegt NFATc1 bei HBL-1 offensichtlich aufgrund der Aktivierung des BZR-Signalwegs dephosphoryliert und dementsprechend aktiviert vor.

3.4 Identifikation spezifischer shRNAs gegen *NFATc1*

Die konstitutive Expression und Aktivierung von NFATc1 erwies sich bei anderen Tumoren, wie Haut- oder Bauchspeicheldrüsenkrebs, als pro-proliferativ und anti-apoptotisch^{195,213,214}. Sofern NFATc1 bei DLBCL ebenfalls eine solche Funktion übernimmt, sollte sich die Herunterregulation von NFATc1 negativ auf das Überleben NFATc1-abhängiger DLBCL Zelllinien auswirken. Im nächsten Schritt wurden daher zwölf retrovirale shRNA-Konstrukte kloniert und in eine ABC bzw. GCB DLBCL Zelllinie transduziert, um den Effekt einer NFATc1-Herunterregulation auf das Überleben und die Proliferation der DLBCL Zelllinien zu untersuchen. Die Zelllinien HBL-1 und HT wurden für dieses Experiment als Modelle

gewählt, da sie repräsentativ den ABC bzw. GCB DLBCL Subtyp vertreten und innerhalb der jeweiligen Subgruppe die stärkste NFATc1-Proteinexpression aufwiesen (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2; Tabelle 3.1). Der shRNA-Expressionsvektor codierte zusätzlich für eine *PGK*-Promoter-getriebene *EGFP* cDNA, die konstitutiv exprimiert wurde. Durch durchflusszytometrische Ermittlung der EGFP-positiven Zellfraktion, konnte am Tag 2 nach Transduktion die Transduktionsrate des jeweiligen shRNA-Konstrukts gemessen werden. Die Transduktionsraten erreichten bei HBL-1 bis zu 63% und bis zu 72% bei HT (Abbildung 3.5 A). Die Expression der shRNAs wurde durch Zugabe von Doxycyclin eingeleitet und über einen Zeitraum von 10 Tagen aufrechterhalten. Schließlich wurde am Tag 12 nach Transduktion die EGFP-positive Zellpopulation erneut durchflusszytometrisch gemessen und auf den initialen Wert normalisiert (Abbildung 3.5 B). Der Schwellenwert eines tatsächlichen Effekts wurde als Reduktion der EGFP-positiven Zellpopulation um mindestens 30% definiert, verglichen mit der EGFP-positiven Zellpopulation vom Tag 2.

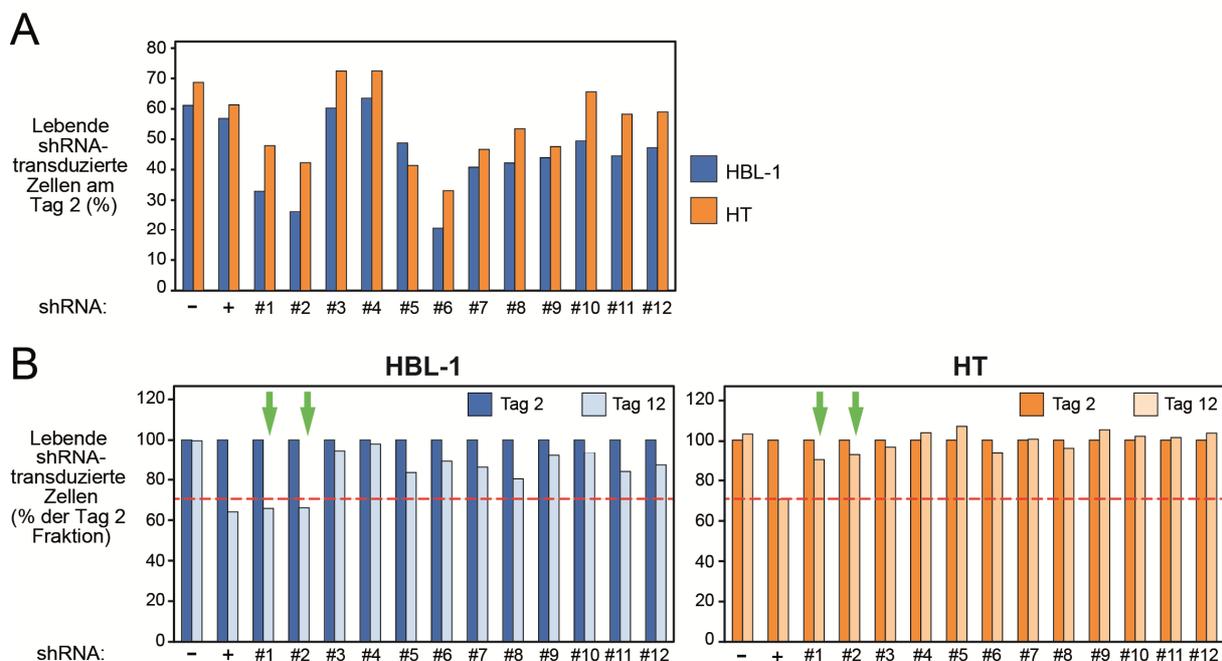


Abbildung 3.5: Identifikation wirksamer shRNAs gegen *NFATc1*. Eine shRNA-Negativ- (-; gegen *MSMO1*) und Positivkontrolle (+; gegen *MYC*), sowie zwölf *NFATc1* shRNA-Konstrukte (#1 - #12) wurden in die ABC bzw. GCB DLBCL Zelllinien HBL-1 und HT retroviral transduziert. Zwei Tage nach Transduktion wurde die relative Transduktionsrate der jeweiligen Konstrukte durch Ermittlung der EGFP-positiven Zellfraktion durchflusszytometrisch bestimmt. **B** Nach 10-tägiger Expression der shRNA wurde die EGFP-positive Zellpopulation erneut ermittelt und normalisiert auf die initiale EGFP-positive Zellpopulation dargestellt. Der Schwellenwert (rot gestrichelte Linie) eines toxischen Effekts wurde als Reduktion der transduzierten Zellpopulation um mehr als 30% nach 10 Tagen shRNA-Expression definiert. Zwei *NFATc1* shRNAs (grüner Pfeil) wiesen eine Reduktion der transduzierten Zellpopulation bei HBL-1, jedoch nicht bei HT auf.

Die Größe der HBL-1 und HT Zellepopulationen, die mit der shRNA-Negativkontrolle transduziert wurden, blieb nach Doxycyclin-Zugabe für 10 Tage unverändert, so dass am Tag 12 noch immer annähernd 100% der am Tag 2 gemessenen, EGFP-positiven Zellfraktion

detektiert werden konnten (Abbildung 3.5 B; -). Die Expression der *MYC* shRNA hingegen hatte einen toxischen Effekt auf beide Zelllinien und zog eine Reduktion der transduzierten Zellpopulation auf ca. 64% bzw. 70% der initialen, transduzierten HBL-1 bzw. HT Zellpopulation nach sich (Abbildung 3.5 B; +). Neben der shRNA-Positivkontrolle, konnten zwei *NFATc1*-spezifische shRNAs (#1 und #2) identifiziert werden, die eine Reduktion der EGFP-positiven Zellfraktion bei der ABC DLBCL Zelllinie HBL-1 induzierten (Abbildung 3.5 B; grüne Pfeile). Somit hatte die Herunterregulation von *NFATc1* durch Expression der *NFATc1* shRNA #1 und shRNA #2 für 10 Tage einen toxischen Effekt auf diese Zelllinie. Die transduzierten Zellpopulationen wurden jeweils auf ca. 66% verglichen mit dem jeweiligen Tag 2-Wert reduziert (Abbildung 3.5 B; rot-gestrichelte Linie). Bei HT wies lediglich die shRNA-Positivkontrolle, jedoch keine der *NFATc1* shRNAs eine Reduktion der EGFP-positiven Zellfraktion am Tag 12 auf, die unter 70% des Tag 2-Wertes sank.

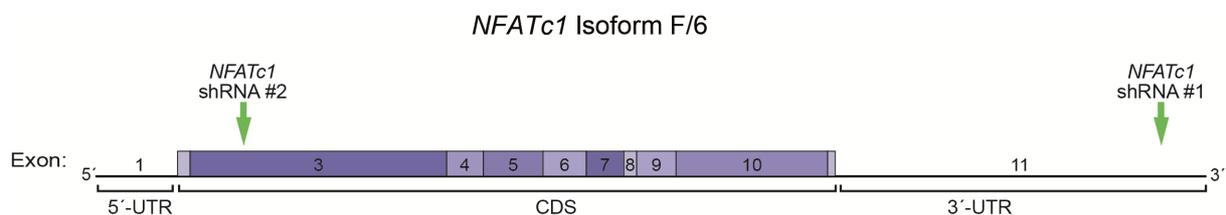


Abbildung 3.6: Bindung der *NFATc1* shRNA #1 und #2 am Beispiel der *NFATc1* Transkriptvariante F/6. Zehn der elf Exone, die auf dem *NFATc1* Locus liegen, werden durch die längste *NFATc1* Transkriptvariante F/6 (NM_001278669.1) genutzt. Die codierenden Exone sind als blaue Boxen dargestellt. Aufgrund von alternativem *splicing* wird das Exon 2 nicht durch die *NFATc1* Isoform F/6 genutzt. *NFATc1* shRNA #1 bindet in der 3'-UTR (Exon 10), während shRNA #2 im codierenden Exon 3 bindet, das für die NHR des *NFATc1* Proteins codiert. UTR untranslatierte Region; CDS codierende Sequenz.

Aufgrund des relativ großen *NFATc1*-Genlokus und der Vielfalt an mRNA-Isoformen, die exprimiert werden können, überschneiden sich die Sequenzen der zehn bekannten *NFATc1*-Transkriptvarianten nur in einem kurzen Bereich von lediglich 865bp. Beide identifizierten *NFATc1* shRNAs binden außerhalb dieses Isoform-übergreifenden Bereichs. Die *NFATc1* mRNA Isoform F/6 ist mit 5031bp die längste *NFATc1* Transkriptvariante und deckt die meisten codierenden Exone (bis auf Exon 2) des Genlokus ab, weshalb die Sequenz der Isoform F/6 (NM_001278669.1) gewählt wurde, um die Bindungsposition der beiden identifizierten *NFATc1* shRNAs zu veranschaulichen (Abbildung 3.6).

Die identifizierten shRNAs erfassen jeweils nicht alle möglichen *NFATc1*-Isoformen. So bindet shRNA #1 in der 3'-UTR der *NFATc1* Isoformen 2-8 und 10, deckt jedoch nicht die beiden *NFATc1* Varianten 1 und 9 ab (Tabelle 3.2). Die shRNA #2 hingegen bindet *NFATc1* Transkripte, die das codierende Exon 3 tragen, d.h. alle *NFATc1* Isoformen bis auf die Varianten 4 und 10 (Tabelle 3.2). Sofern für weitere funktionelle Untersuchungen die

Herunterregulation aller zehn *NFATc1* Isoformen benötigt wurde, mussten daher beide identifizierten *NFATc1* shRNAs zeitgleich in derselben Zelle exprimiert werden.

Tabelle 3.2: Bekannte *NFATc1* Transkriptvarianten, Anzahl ihrer Aminosäuren, die kalkulierte Molekülmasse und Angaben zur Bindung durch identifizierte shRNAs.

<i>NFATc1</i> Variante	A/1	B/2	C/3	D/4	E/5	F/6	G/7	H/8	I/9	J/10
Aminosäuren	716	825	930	353	812	943	713	700	703	471
Detektion durch Antikörper	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
Molekülmasse (kDa)	77,8	88,8	100,3	38,6	87,9	101,2	77,4	76,5	76,8	51,1
Bindung shRNA #1	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja
Bindung shRNA #2	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein

NFATc1 Isoformen, in denen shRNA #1 oder shRNA #2 bindet (Ja) bzw. nicht bindet (Nein) oder *NFATc1* Proteine, die durch den *NFATc1*-Antikörper detektiert (Ja) bzw. nicht detektiert (Nein) werden. Die Nomenklatur der Transkriptvarianten lehnt sich an die NCBI *Reference Sequence (RefSeq)* Datenbank.

3.4.1 Zwei shRNAs bewirken eine spezifische Herunterregulation von *NFATc1*

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt nach Expression der *NFATc1* shRNAs #1 und #2 durch die spezifische Herunterregulation von *NFATc1* hervorgerufen wurde, sollten qPCR und Western Blot Analysen bei jeweils zwei ABC (HBL-1 und TMD8) und zwei GCB (HT und OCI-Ly19) DLBCL Zelllinien nach Expression der shRNA #1 bzw. #2 oder der Kontroll-shRNA durchgeführt werden. Nach retroviraler Transduktion wurden die Konstrukt-positiven Zellpopulationen mit Hilfe des Antibiotikums Puromycin selektioniert. Anschließend wurde die Expression der shRNAs durch Zugabe von Doxycyclin induziert. Nach 48h wurde die Gesamt-mRNA extrahiert und die *NFATc1* mRNA mittels qPCR bestimmt (Abbildung 3.7). Etwa 96h nach Doxycyclin-Zugabe wurden Zellpellets für die Herstellung von Gesamtproteinlysaten entnommen, um die Proteinexpression von *NFATc1* mittels Western Blot zu überprüfen (Abbildung 3.8).

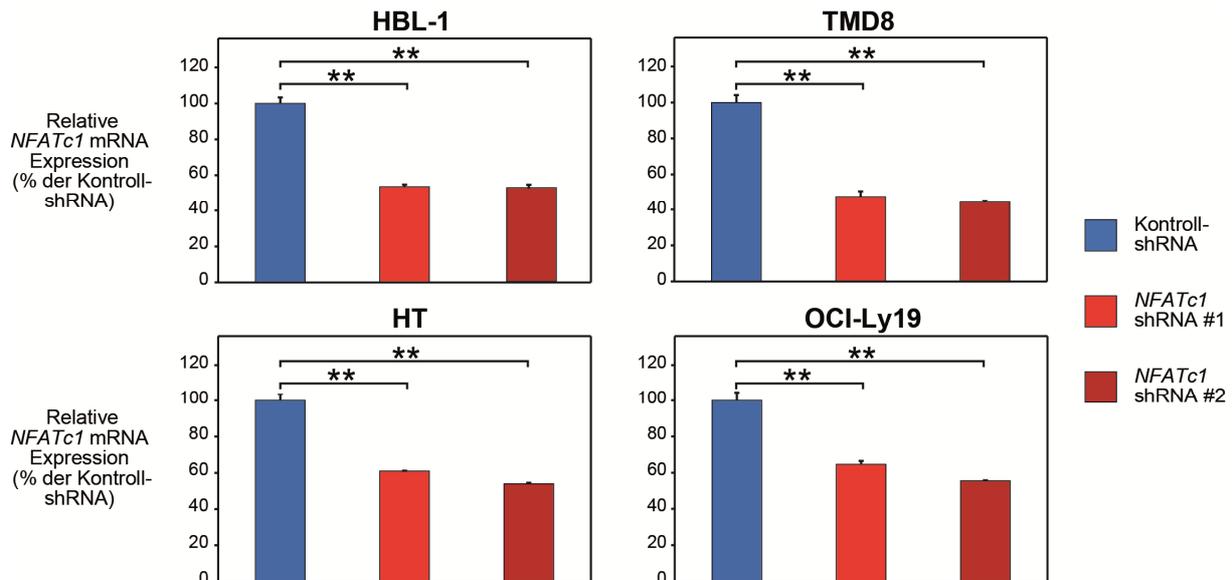


Abbildung 3.7: Detektion der shRNA-vermittelten *NFATc1* mRNA-Reduktion mittels qPCR. Nach 48h shRNA-Induktion wurde die relative Expression der *NFATc1* mRNA bei zwei ABC (HBL-1 und TMD8) und zwei GCB (HT und OCI-Ly19) DLBCL Zelllinien mittels qPCR gemessen und auf das Referenzgen *GAPDH* sowie die relative Expression der Kontroll-shRNA normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Duplikate einer repräsentativen Messung aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,01$.

Bei allen vier Zelllinien konnten beide shRNAs eine signifikante Reduktion der *NFATc1* mRNA auf 44-65% verglichen mit der Kontroll-shRNA erzeugen (Abbildung 3.7). Die Herunterregulation der *NFATc1* mRNA führte ebenfalls zu einer verminderten Translation, was sich im Western Blot als schwächeres NFATc1-Bandensignal im Vergleich zu der Kontrolle bei allen vier untersuchten Zelllinien zeigte (Abbildung 3.8). Zusätzlich wurde hier deutlich, wie differenziell beide shRNAs die Expression der verschiedenen NFATc1-Isoformen beeinflussten. Die shRNA #2 schien auf Proteinebene kürzere NFATc1-Isoformen, die sich auf der Membran im unteren Bereich präsentieren, insgesamt besser zu reduzieren als shRNA #1 (Abbildung 3.8, HBL-1 Vergleich zwischen *NFATc1* shRNA #1 und *NFATc1* shRNA #2). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die beiden ähnlich großen NFATc1-Isoformen 1/A bzw. 9/I (77,8 und 76,8kDa; Tabelle 3.2), die nicht durch die shRNA #1 herunterreguliert werden können. Die Isoformen 4/D und 10/J, deren Transkripte durch die shRNA #2 nicht gebunden werden, codieren für kurze NFATc1-Varianten mit einer Molekülmasse von 38,6 bzw. 51,1kDa. Ihnen fehlt die regulatorische NHR Domäne, gegen die der verwendete monoklonale NFATc1-Antikörper gerichtet ist (Tabelle 3.2). Diese beiden Isoformen werden im Western Blot somit nicht detektiert. Längere Isoformen, die im oberen Bandenbereich detektiert wurden, konnten durch beide shRNAs gleichermaßen stark herunterreguliert werden.

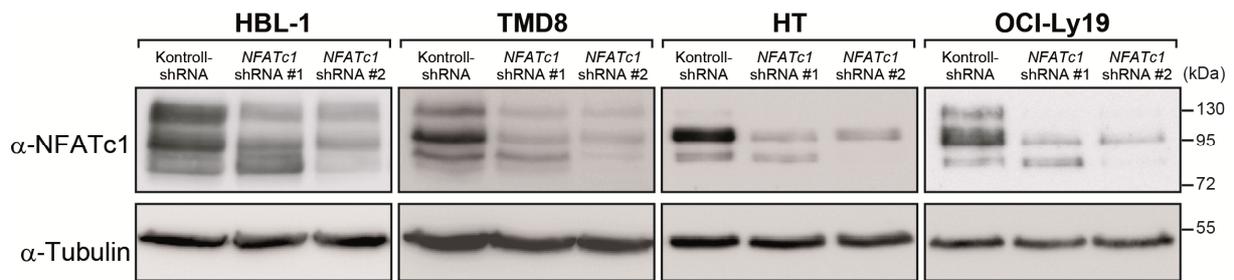


Abbildung 3.8: Nachweis der shRNA-vermittelten NFATc1-Proteinreduktion mittels Western Blot. Nach 4 Tagen Expression der Kontroll-shRNA oder *NFATc1* shRNA #1 bzw. #2 wurden Gesamtprotein-Lysate der ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8 sowie der GCB DLBCL Zelllinien HT und OCI-Ly19 hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Jeweils 20-100µg Gesamtprotein sind aufgetragen worden. Die detektierbaren NFATc1 Isoformen konnten unterschiedlich stark durch beide NFATc1 shRNAs reduziert werden.

Um zu überprüfen, wie sich die gleichzeitige Expression beider spezifischen *NFATc1* shRNAs auswirkt, wurden die Puromycin-selektionierten HBL-1 und TMD8 Zellen einer weiteren Transduktion unterzogen. Hierbei wurde die jeweils andere *NFATc1* shRNA zusätzlich integriert. Das zweite transduzierte Konstrukt verfügte über eine Hygromycin-Resistenzkassette, mit deren Hilfe eine weitere Selektionierung der transduzierten Zellen möglich war. Anschließend wurde Doxycyclin für 48 bzw. 96h zum Kulturmedium der Zellen gegeben, um die Expression der *NFATc1* shRNAs zu induzieren und den Effekt anschließend mittels qPCR bzw. Western Blot analysieren zu können.

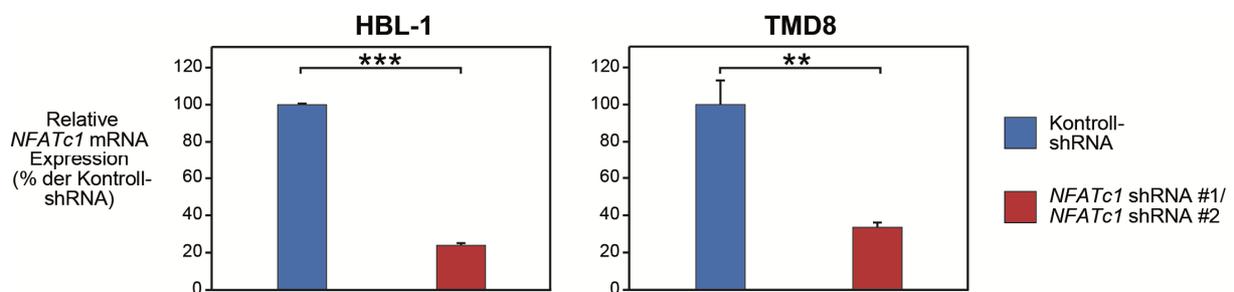


Abbildung 3.9: Die Ko-Expression beider *NFATc1* shRNAs reduzierte weiterhin die *NFATc1* mRNA-Expression. Die relative Expression der *NFATc1* mRNA wurde nach shRNA-Expression für 48h bei HBL-1 und TMD8 mittels qPCR gemessen, auf das Referenzgen *GAPDH* normalisiert und relativ zur Kontroll-shRNA dargestellt. Zu sehen ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Duplikate eines repräsentativen Experiments von mindestens fünf unabhängigen Messungen. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die gleichzeitige Expression beider *NFATc1*-spezifischer shRNAs verstärkte die Herunterregulation der *NFATc1* mRNA bei HBL-1 auf 24% ($p < 7,5 \times 10^{-5}$) bzw. 34% ($p < 9,6 \times 10^{-3}$) bei TMD8 verglichen mit der Kontroll-shRNA (Abbildung 3.9). Auch auf Proteinebene wurde eine verbesserte, nahezu vollständige Reduktion aller detektierbaren NFATc1 Isoformen bei beiden Zelllinien im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle verzeichnet (Abbildung 3.10).

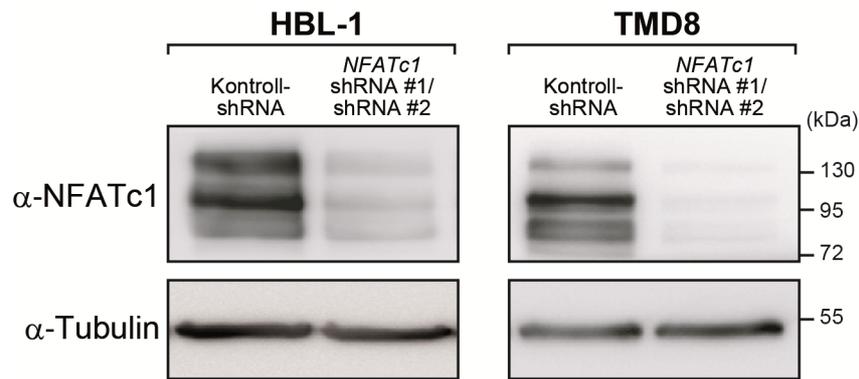


Abbildung 3.10: Nachweis der NFATc1-Proteinreduktion mittels Western Blot nach Expression beider shRNAs. Nach Expression der Kontroll-shRNA oder der *NFATc1* shRNAs #1 und #2 für 96h wurden Gesamtprotein-Lysate hergestellt. Hiervon wurden 50µg für die Western Blot Analysen von NFATc1 verwendet.

3.5 Die Herunterregulation von NFATc1 hat einen toxischen Effekt auf zwei der getesteten ABC DLBCL Zelllinien

Die Amplifikation des *NFATc1* Locus auf dem Chromosomenabschnitt 18q23, die bei vier der fünf verwendeten ABC DLBCL, jedoch bei keiner der untersuchten GCB DLBCL Zelllinie gefunden wurde (Tabelle 3.1), legte nahe, dass es sich hierbei um eine Subtyp-spezifische Aberration handelte, die zu einer erhöhten NFATc1-Expression führt und den ABC DLBCL Zelllinien einen Überlebensvorteil verschafft. Die shRNA-vermittelte Herunterregulation von NFATc1 sollte daher Aufschluss über die Relevanz dieses Transkriptionsfaktors für das Überleben bzw. die Proliferation der ABC DLBCL im Vergleich zu GCB DLBCL Zelllinien geben. Hierfür wurde ein sogenannter shRNA-Toxizitätstest mit den neun DLBCL Zelllinien durchgeführt^{109,215}. Die Zellen wurden mit den NFATc1 shRNAs bzw. mit der shRNA-Positiv- oder Negativkontrolle transduziert. Am Tag 2 nach Transduktion wurden die Transduktionsraten durchflusszytometrisch bestimmt. Diese Messung wurde alle zwei Tage über einen Gesamtzeitraum von 12 Tagen wiederholt. Beginnend mit der ersten durchflusszytometrischen Messung am Tag 2 wurde die Expression der shRNAs durch Zugabe von Doxycyclin induziert. Alle zwei Tage wurde neues Doxycyclin zusammen mit frischem Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Zur Auswertung erfolgte eine Normalisierung der Messwerte auf den initialen Wert vom Tag 2. Dadurch konnte die Veränderung in der Größe der lebenden, Konstrukt-positiven Zellpopulation im Vergleich zu der lebenden, nicht-transduzierten Fraktion über den gemessenen Zeitraum dargestellt werden (Abbildung 3.11).

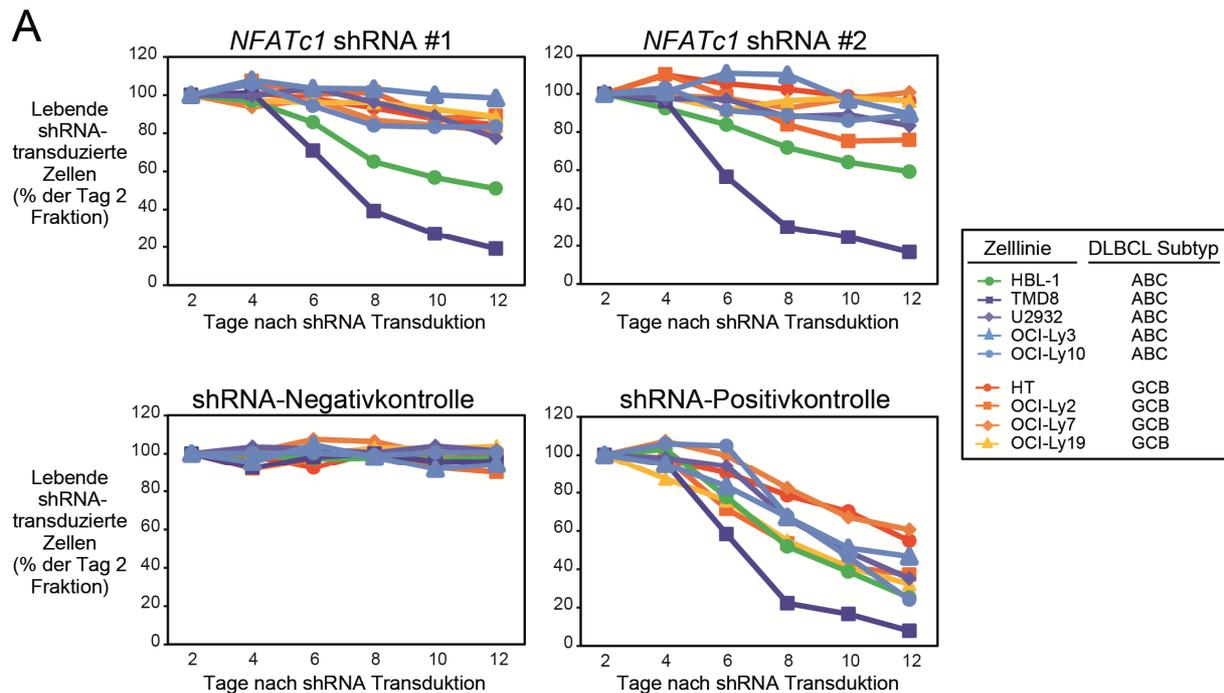


Abbildung 3.11: Die NFATc1-Herunterregulation hat einen selektiven toxischen Effekt auf zwei ABC DLBCL Zelllinien. Die Herunterregulation von NFATc1 durch die beiden unabhängigen *NFATc1* shRNAs #1 und #2 zeigte einen toxischen Effekt bei den ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8. Die Expression der shRNA-Negativkontrolle, wies keinen Einfluss auf das Überleben bzw. die Proliferation der Zellen auf, während die shRNA-Positivkontrolle einen toxischen Effekt auf alle getesteten Zelllinien hatte. Gezeigt sind die jeweiligen transduzierten Zellpopulationen normalisiert auf den initialen Wert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Nach Herunterregulation von NFATc1 für 10 Tage konnte die shRNA #1 eine Reduktion auf ca. 51 bzw. 19% der ursprünglichen shRNA-transduzierten HBL-1 bzw. TMD8 Zellpopulation erzielen (Abbildung 3.11), während die *NFATc1* shRNA #2 eine Verminderung der lebenden, transduzierten Population auf 59% bei HBL-1 bzw. auf 17% bei TMD8 erreichte (Abbildung 3.11). Die Expression der shRNA-Negativkontrolle wies bei keiner der untersuchten DLBCL Zelllinien eine Toxizität auf. Im Gegensatz dazu bestätigte die Expression der shRNA-Positivkontrolle, dass bei allen getesteten Zelllinien ein toxischer Effekt induziert werden konnte, sobald ein für das Überleben essenzielles Gen herunterreguliert wurde (Abbildung 3.11). Interessanterweise induzierte die Herunterregulation von NFATc1 einen toxischen Effekt bei ABC DLBCL Zelllinien mit ITAM Mutationen in der BZR-Untereinheit CD79B, welche zu einer chronischen Aktivierung des BZR-Signalwegs beitragen⁷¹. Im Abschnitt 3.3 konnte ein Zusammenhang zwischen der NFATc1-Aktivierung und dem chronisch aktiven BZR-Signalweg bei HBL-1 hergestellt werden. Der nach NFATc1-Herunterregulation beobachtete toxische Effekt bei HBL-1 und TMD8 suggeriert eine Abhängigkeit von der NFATc1-Expression und -Aktivierung, die durch den chronisch aktiven BZR-Signalweg aufrechterhalten wird. In der Folge sollte überprüft werden, ob eine solche NFATc1-Aktivierung vorliegt und diese durch die Phosphatase Calcineurin vermittelt wird.

3.6 Die pharmakologische Inhibierung von Calcineurin ist toxisch für NFATc1-abhängige ABC DLBCL Zelllinien

Die Phosphatase Calcineurin kann durch Behandlung mit dem Immunsuppressivum CsA pharmakologisch inhibiert werden²¹⁶. Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung von NFATc1 bei den ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8 über Calcineurin vorliegt, sollte diese Phosphatase bei den beiden NFATc1-abhängigen Zelllinien und der NFATc1-unabhängigen GCB DLBCL Zelllinie HT pharmakologisch inhibiert werden. Für die Zell-Viabilitätstests wurden die DLBCL Zelllinien für 48h mit verschiedenen CsA Konzentrationen bis 7,5µM behandelt und schließlich luminometrisch ausgelesen.

Die Inhibierung von Calcineurin mit CsA für 48h zeigte einen selektiven toxischen Effekt auf die beiden NFATc1-abhängigen Zelllinien HBL-1 und TMD8, jedoch nicht auf die NFATc1-unabhängige Zelllinie HT (Abbildung 3.12 A). Die Behandlung von HT mit 7,5µM CsA für 48h zeigte eine geringfügig auf durchschnittlich 87% reduzierte Zell-Viabilität (Abbildung 3.12 B). Im Vergleich zu HT wurde unter gleichen Bedingungen die Viabilität der NFATc1-abhängigen Zelllinie HBL-1 signifikant auf durchschnittlich 46% ($p=5,8 \times 10^{-3}$) bzw. auf 31% bei TMD8 ($p=5,6 \times 10^{-4}$) reduziert (Abbildung 3.12 B).

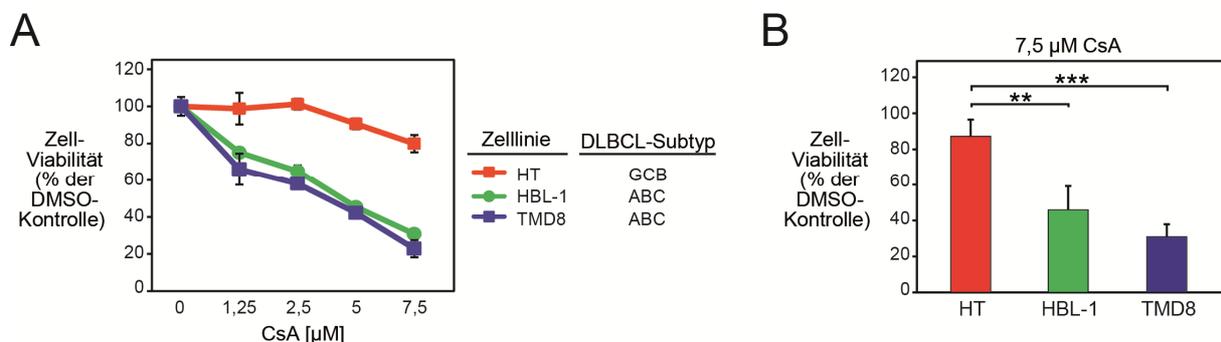


Abbildung 3.12: CsA verringert die Zell-Viabilität NFATc1-abhängiger DLBCL Zelllinien. **A** Eine NFATc1-unabhängige (HT) und zwei NFATc1-abhängige (HBL-1 und TMD8) Zelllinien wurden mit unterschiedlichen CsA Konzentrationen behandelt. Die Zell-Viabilität wurde nach 48h gemessen und diese auf die DMSO Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Duplikate eines repräsentativen Ergebnisses von drei gemessenen Experimenten. **B** Einfluss von 48h Inkubation mit 7,5µM CsA auf die Zell-Viabilität der dargestellten Zelllinien. Der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten wurden relativ zu der DMSO Kontrolle dargestellt. Die statistische Signifikanz zwischen HT und HBL-1 bzw. TMD8 ist angegeben als ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Diese Ergebnisse suggerierten, dass die Viabilität der Zelllinien HBL-1 und TMD8 von der Aktivität der Phosphatase Calcineurin abhängt, die unter anderem NFATc1 dephosphoryliert und aktiviert¹⁵⁷. NFATc1 liegt im inaktiven Zustand phosphoryliert im Zytosol vor, seine Dephosphorylierung hingegen erlaubt die nukleäre Translokation und die Induktion der NFATc1-vermittelten Genexpression^{166,195}. Daher sollte als nächstes mittels Western Blot

geklärt werden, ob NFATc1 bei HBL-1 und TMD8 konstitutiv aktiv im Nucleus vorliegt und die Inhibition von Calcineurin eine verstärkte Phosphorylierung und einen Rückgang des nukleären NFATc1 erzeugt.

Western Blot Analysen der nukleären und zytosolischen Fraktionen von HBL-1, TMD8 und HT wurden nach Behandlung mit $1\mu\text{M}$ CsA für 1,5h durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation von NFATc1 nach CsA-Behandlung zu ermitteln. Das zytoplasmatische Protein BCL10 und das nukleäre PARP (*poly ADP-ribose polymerase*) wurden als jeweilige Reinheitskontrolle der zytosolischen bzw. nukleären Fraktion detektiert²¹⁷.

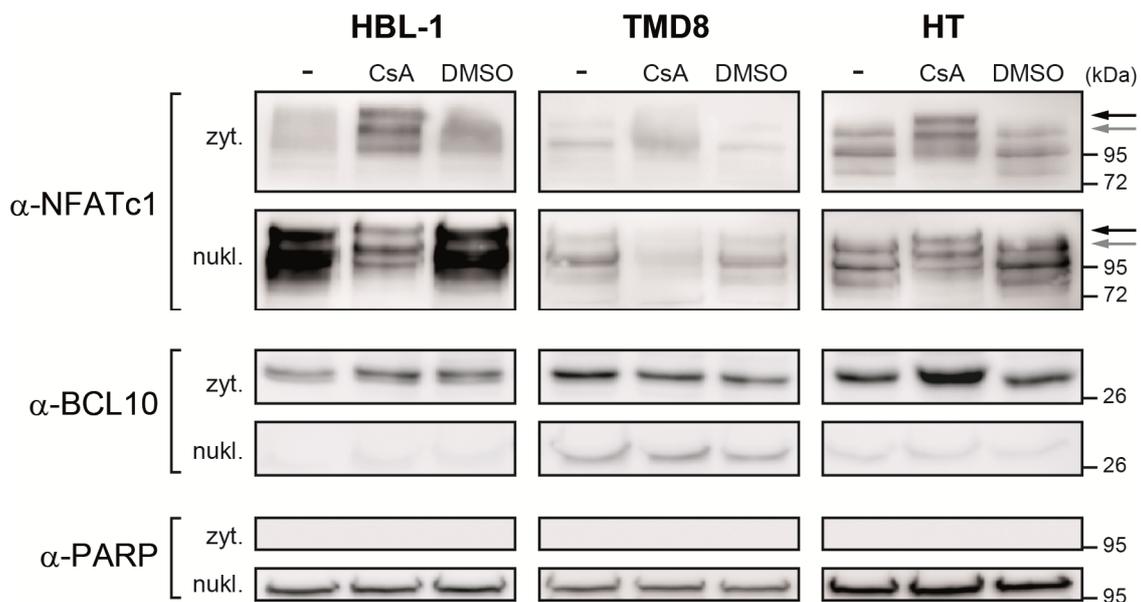


Abbildung 3.13: Verteilung des NFATc1 Proteins bei nukleären und zytosolischen Fraktionen mit und ohne CsA-Behandlung. Die dargestellten Zelllinien wurden unbehandelt (-) oder nach Behandlung mit $1\mu\text{M}$ CsA bzw. DMSO für 1,5h inkubiert. Die Proteine der zytosolischen (zyt.) und nukleären (nukl.) Fraktionen wurden isoliert und mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgetrennt. Neben NFATc1 wurde BCL10 als Reinheits- und Ladekontrolle der zytosolischen Fraktion detektiert, während PARP als Kontrolle der nukleären Fraktion diente. Grauer Pfeil: NFATc1 im nicht phosphorylierten Zustand; schwarzer Pfeil: NFATc1 im phosphorylierten Zustand.

Die Untersuchung der zytosolischen und nukleären Fraktionen von HBL-1, TMD8 und HT zeigten, dass NFATc1 bei unbehandelten Zellen primär im Nucleus lokalisiert war und sich somit, wie in der Literatur beschrieben, in einem konstitutiv aktiven Zustand befand (Abbildung 3.13, α -NFATc1 nukl.)¹⁹⁵. Es konnte kein Unterschied zwischen unbehandelten und DMSO-behandelten Fraktionen beobachtet werden. Nach Behandlung mit $1\mu\text{M}$ CsA für 1,5h konnten zwei Beobachtungen gemacht werden: Zum einen war eine Veränderung im Phosphorylierungsstatus von NFATc1 sowohl im Nucleus als auch im Zytosol zu detektieren. Diese ist in Abbildung 3.13 rechts durch die Verschiebung vom grauen zum schwarzen Pfeil angedeutet. Somit hat die Inhibition von Calcineurin zu einer Zunahme an phosphoryliertem NFATc1 Protein geführt. Zum anderen konnte nach Behandlung mit $1\mu\text{M}$

CsA eine Zunahme an NFATc1 Protein in der zytosolischen Fraktion detektiert werden, während es in der nukleären Fraktion verglichen mit den Kontrollen deutlich zurück ging (Abbildung 3.13, α -NFATc1 zyt. und nukl.). Dieser Effekt konnte bei allen drei untersuchten Zelllinien beobachtet werden und war bei HBL-1, der Zelllinie mit dem größten Verhältnis von nukleärem zu zytosolischem NFATc1 Protein, am stärksten ausgeprägt.

Zusammengefasst bestätigten die Beobachtungen, dass NFATc1 bei den untersuchten Zelllinien konstitutiv durch Calcineurin aktiviert wird und daher hauptsächlich nukleär lokalisiert ist. Die CsA-vermittelte Inhibierung von Calcineurin ermöglichte eine Deaktivierung und den Export des Transkriptionsfaktors aus dem Nukleus, was sich negativ auf die Zell-Viabilität auswirkte und auf eine NFATc1-Abhängigkeit der ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8 hindeutete. Bei der GCB DLBCL Zelllinie HT wurde ebenfalls nukleäres NFATc1 detektiert, das nach CsA-Behandlung stärker phosphoryliert vorlag. Jedoch war bei HT zum einen das NFATc1 im Ausgangszustand nicht hauptsächlich im Nukleus, sondern eher im Gleichgewicht zwischen nukleärer und zytosolischer Lokalisation. Zweitens bewirkte die CsA-Behandlung keinen solch drastischen Rücktransport von NFATc1 in das Zytosol, wie bei den beiden ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8, und drittens war diese leichte Verschiebung des NFATc1 Proteins in Richtung des Zytosols laut Zell-Viabilitätstest nicht toxisch für HT.

3.7 Die Herunterregulation von NFATc1 induziert Apoptose bei HBL-1

Die Herunterregulation von NFATc1 mit Hilfe der *NFATc1* shRNAs induzierte bereits nach acht Tagen einen toxischen Effekt bei HBL-1 und TMD8 (Abbildung 3.11). Allerdings geht aus den Analysen nicht hervor, auf welchem biologischen Prozess dieser toxische Effekt beruht. Um zu klären, ob ein Rückgang von NFATc1 Apoptose induziert, wurde bei *NFATc1* shRNA #1 und #2-transduzierten oder Kontroll-shRNA-transduzierten HBL-1 Zellen durchflusszytometrisch das Auftreten einer apoptotischen Annexin V-positiven/PE-negativen Zellpopulation untersucht.

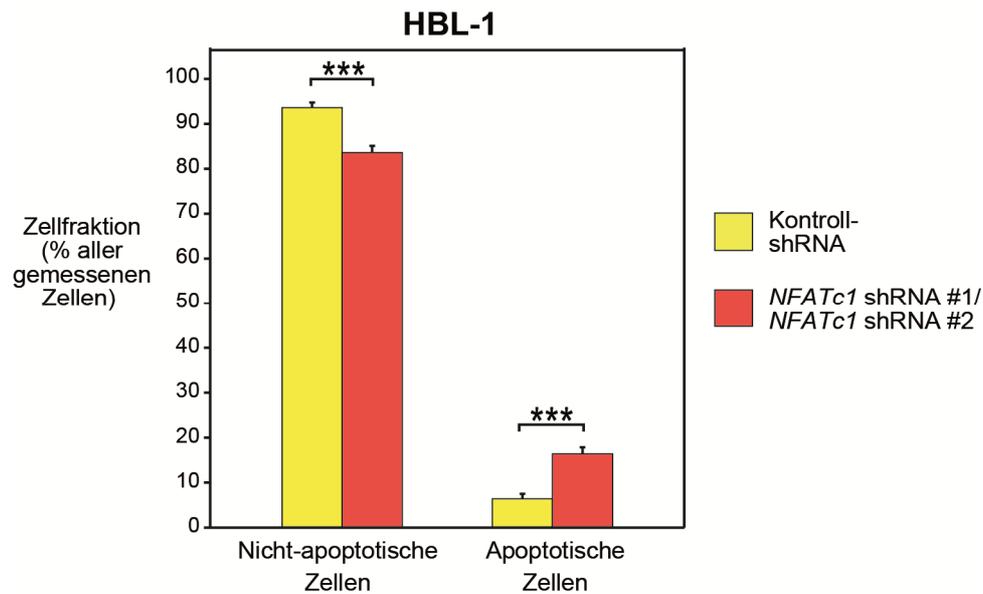


Abbildung 3.14: Detektion von Apoptose durch Annexin V-PE Färbung bei HBL-1 Zellen nach Expression beider *NFATc1* shRNAs für acht Tage. Dargestellt ist der Mittelwert der jeweiligen Zellfraktion und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. *** $p < 0,001$.

In drei unabhängigen Experimenten konnte bei HBL-1 eine signifikante ($p < 3,7 \times 10^{-4}$) Zunahme apoptotischer Zellen bei *NFATc1* shRNA-transduzierten im Vergleich zu Kontroll-shRNA-transduzierten Zellen gemessen werden (16% bzw. 6%, Abbildung 3.14). Gleichzeitig wurde die Fraktion nicht-apoptotischer HBL-1 Zellen im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant reduziert (84% gegen 94% bei der Kontroll-shRNA). Somit scheint die Herunterregulation von *NFATc1* bei der *NFATc1*-abhängigen Zelllinie HBL-1 Apoptose zu induzieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei HBL-1 die Reduktion der EGFP-positiven Zellfraktion im shRNA-Toxizitätstest zum Teil auf die *NFATc1* shRNA-vermittelte Induktion der Apoptose zurückzuführen ist.

3.8 Der toxische Effekt ist kein Ergebnis einer *NFATc1* shRNA-vermittelten Herunterregulation des Onkoproteins MYC

In Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten, wie Bauchspeicheldrüsenkrebs oder Darmkrebs, konnten *NFATc1* eine Beteiligung an der Expression von Onkogenen nachweisen werden^{122,127,195}. Zu den in der Literatur diskutierten *NFATc1*-Zielgenen zählt unter anderem das Onkoprotein MYC, dessen Expression durch *NFATc1* hochreguliert wird und es selbst wiederum die Genexpression Überlebens- und Proliferations-fördernder Faktoren der Tumorzelle vorantreibt^{125,195,213,218}. Daher stellte sich die Frage, ob auch in dem hier vorliegenden Zellkulturmodell die Genexpression des Onkogens *MYC* durch *NFATc1*

induziert wird und ob dementsprechend die shRNA-vermittelte Herunterregulation von NFATc1 ebenso eine Herunterregulation von MYC verursacht.

In einer früheren Studie wurde bereits beschrieben, dass sich die shRNA-vermittelte Herunterregulation von MYC bei HBL-1 und TMD8 negativ auf das Überleben der Zellen auswirkt⁷¹. Die Autoren exprimierten eine gegen *MYC* gerichtete shRNA über 24 Tage bei vier Zelllinien, unter anderem bei HBL-1 und TMD8. Schließlich wurde das Verhältnis von der gemessenen EGFP-positiven Zellfraktion am Tag 24 zu der vom Tag 2 normalisiert dargestellt⁷¹. Das Ausmaß der Herunterregulation von MYC auf Proteinebene wurde nicht bestimmt. Außerdem wurde nicht veröffentlicht, wie der Verlauf eines toxischen Effekts über einen Zeitraum von 12 Tagen der shRNA-Expression aussah. Diese Informationen werden jedoch benötigt, um beurteilen zu können, wie stark MYC auf Proteinebene herunterreguliert werden muss, um bei HBL-1 und TMD8 Zellen einen toxischen Effekt im shRNA-Toxizitätstest hervorrufen zu können. Daher wurden diese beiden Zelllinien mit dem bereits publizierten *MYC* shRNA-Expressionsvektor bzw. mit der Kontroll-shRNA transduziert⁷¹. Die Konstrukt-positiven Zellfraktionen wurden mit Puromycin selektioniert und nach Doxycyclin-vermittelter Expression der shRNAs schließlich die MYC Herunterregulation mittels Western Blot detektiert (Abbildung 3.15 A). Zusätzlich wurde ein shRNA-Toxizitätstest mit HBL-1 und TMD8 Zelllinien durchgeführt, die über 10 Tage die *MYC* shRNA exprimierten (Abbildung 3.15 B). Der shRNA-Toxizitätstest sollte Auskunft über den Kurvenverlauf der Toxizität geben, den eine Herunterregulation von MYC erzeugt.

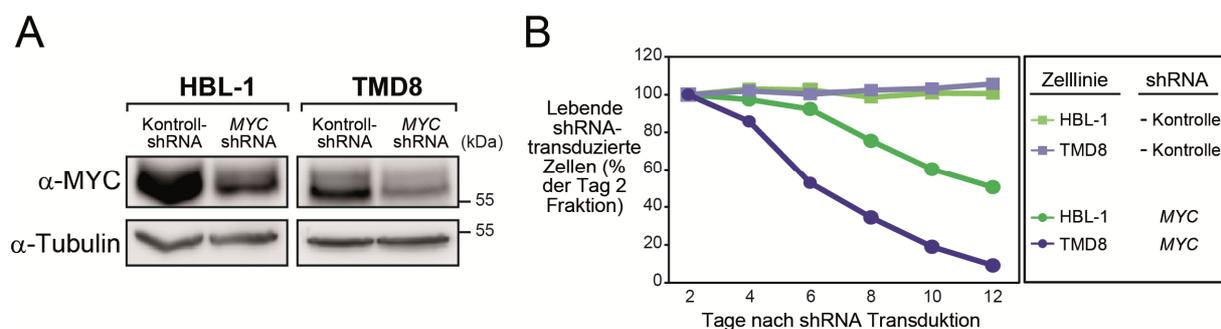


Abbildung 3.15: Die shRNA-vermittelte MYC-Herunterregulation induziert einen toxischen Effekt bei HBL-1 und TMD8. **A** Für 96h wurde bei selektionierten, Konstrukt-positiven HBL-1 und TMD8 Zellen die Expression einer Kontroll-shRNA bzw. einer etablierten, *MYC*-spezifischen shRNA induziert und die Herunterregulation des MYC Proteins in 50µg Gesamtprotein-Lysaten mittels Western Blot detektiert. **B** Über 10 Tage wurde die shRNA-vermittelte Herunterregulation von MYC oder der Negativ- (-) Kontrolle im shRNA-Toxizitätstest durchflusszytometrisch verfolgt und anschließend auf die Werte der Tag 2 Population normalisiert. Dargestellt ist ein repräsentatives von mindestens drei gemessenen Experimenten.

Auf Proteinebene konnte nach vier Tagen der *MYC* shRNA-Expression sowohl bei HBL-1 als auch bei TMD8 eine Reduktion von MYC beobachtet werden (Abbildung 3.15 A). Diese MYC-Herunterregulation induzierte einen toxischen Effekt bei den transduzierten

Zellpopulationen beider Zelllinien (Abbildung 3.15 B). Somit konnte bestätigt werden, dass die Präsenz des Onkoproteins MYC essenziell für die Viabilität der ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8 ist. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, inwieweit NFATc1 bei den untersuchten Zelllinien die MYC-Expression reguliert und der Zelle somit einen Überlebensvorteil verschafft, wie es bereits z.B. für einige Pankreaskarzinom Zelllinien gezeigt wurde^{195,213}. Genauer gesagt sollte überprüft werden, ob die Herunterregulation von NFATc1 eine solch starke MYC-Reduktion erzeugen kann, wie sie für die Induktion eines toxischen Effekts bei HBL-1 und TMD8 benötigt wird (Abbildung 3.15).

Für diesen Versuchsaufbau wurden sowohl HBL-1 als auch TMD8 Zellen mit der shRNA-Negativkontrolle oder beiden *NFATc1*-spezifischen shRNAs transduziert und selektioniert. Nach Induktion der shRNA-Expression wurden Gesamtprotein-Lysate der Zellen hergestellt und mittels Western Blot die Proteinexpression von NFATc1 und MYC analysiert.

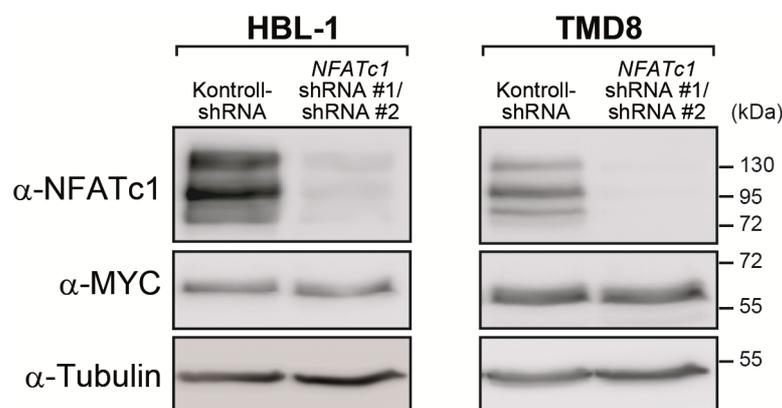


Abbildung 3.16: Western Blot Analysen von MYC nach NFATc1-Herunterregulation. Die Expression der angegebenen shRNAs wurde für 4 (HBL-1) bzw. 8 (TMD8) Tage induziert. Die Zellen wurden lysiert und anschließend 50 bzw. 75µg Protein aus Gesamtprotein-Lysaten mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgetrennt. Mit Hilfe von Immundetektion wurde der Einfluss einer NFATc1 Herunterregulation auf die MYC Proteinexpression detektiert.

Im Western Blot konnte nach NFATc1-Herunterregulation mit beiden *NFATc1*-spezifischen shRNAs weder bei HBL-1 noch bei TMD8 ein Einfluss auf die MYC-Proteinexpression beobachtet werden (Abbildung 3.16). Somit hatte bei den DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8 die shRNA-vermittelte Herunterregulation von NFATc1 keinen Einfluss auf die Expression des Onkoproteins MYC. Der zytotoxische Effekt der beiden shRNAs, der sich bei diesen beiden NFATc1-abhängigen Zelllinien im Vorfeld abgezeichnet hat, konnte demnach nicht auf eine verminderte MYC-Proteinexpression als Folge der NFATc1-Herunterregulation zurückgeführt werden.

3.9 NFATc1 hat globalen Einfluss auf die Genexpression

Wie die Ergebnisse bisher zeigen konnten, sind die Expression und kontinuierliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFATc1 von elementarer Bedeutung für die ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8. Die shRNA-vermittelte Herunterregulation des NFATc1 Proteins sowie die Inhibition von Calcineurin, einer NFATc1-aktivierenden Phosphatase, hatten einen toxischen Effekt auf diese beiden Zellen, jedoch nicht auf die Kontrollzelllinien. Es liegt folglich nahe, dass NFATc1 bei diesen NFATc1-abhängigen Zelllinien einen wesentlichen Beitrag zu dem Überleben und der Proliferation leistet. Da NFATc1 als Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Gene beeinflusst, sollten genomweite Genexpressionsanalysen zu der Identifikation essenzieller NFATc1-Zielgene erfolgen. Im Anschluss sollte ein Profil NFATc1-regulierter Gene und Gen-Signaturen erstellt werden.

3.9.1 Herstellung von Arrayproben durch shRNA-vermittelte NFATc1-Herunterregulation bei HBL-1

Zunächst wurden Array-basierte Genexpressionsanalysen nach NFATc1-Herunterregulation sowohl mit shRNA #1 als auch mit shRNA #2 durchgeführt. Die Zelllinie HBL-1 wurde als Untersuchungsmodell für diese Methode ausgewählt, da hier die stärkste NFATc1 Proteinexpression detektiert werden konnte, deren Herunterregulation toxisch für die Zelllinie war (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.11). Für die Herstellung der Proben wurden HBL-1 Zellen mit jeweils einer shRNA transduziert und selektioniert. Anschließend wurde bei einem Teil der Zellen die Expression der shRNA durch Zugabe von Doxycyclin induziert (Abbildung 3.17; + Dox), während die Referenzproben unbehandelt blieben (- Dox). Alle 24h wurde jeweils ein Teil der Zellen abgenommen. Die gesamt-RNA der Proben wurde isoliert und die NFATc1-Herunterregulation abschließend mittels qPCR kontrolliert, bevor die Proben für die Hybridisierung an das Labor der Firma Source BioScience imaGenes GmbH Berlin versandt wurden.

In Abbildung 3.17 sind exemplarisch die HBL-1-Arrayproben nach Herunterregulation mit der NFATc1-spezifischen shRNA #1 repräsentativ dargestellt. Eine signifikante Reduktion der NFATc1 mRNA war zu allen vier Zeitpunkten zu erkennen.

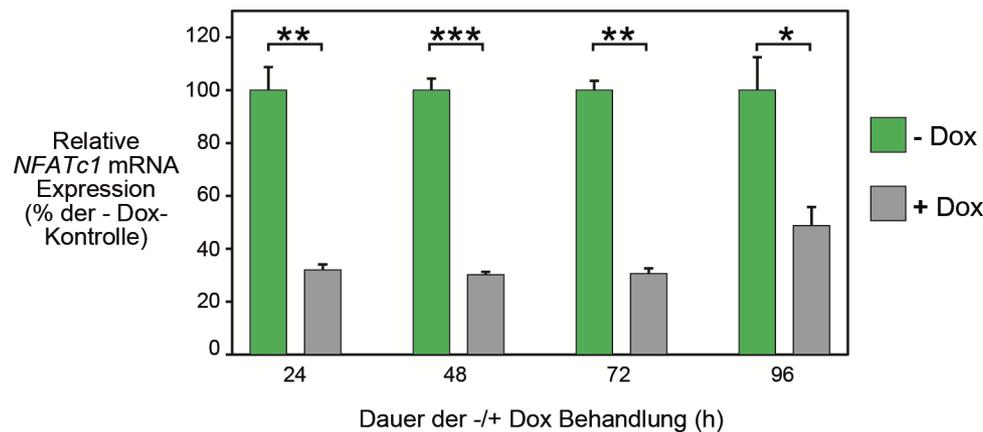


Abbildung 3.17: qPCR der Herunterregulation von *NFATc1* bei HBL-1-Arrayproben nach shRNA #1-Expression. Nach angegebener Inkubation der HBL-1 Zellen ohne (- Dox) bzw. mit (+ Dox) Doxycyclin wurde die RNA der Proben isoliert und mittels qPCR auf die Expression der *NFATc1* mRNA untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Duplikate, normalisiert auf das Referenzgen *B2M* und die jeweilige – Dox Kontrolle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.9.2 Genexpressionsanalysen *NFATc1*-regulierter Gene

Die Auswertung der Genexpressionsanalysen veranschaulichte, welchen genomweiten Einfluss die Herunterregulation von *NFATc1* auf das Transkriptom bei HBL-1 Zellen hatte (Abbildung 3.18). Generell wurden nach *NFATc1*-Reduktion mehr Gene signifikant herunter- als hochreguliert. Es wurden solche Gene betrachtet, deren Expression sich mit einer Signifikanz von $p < 0,0025$ nach *NFATc1*-Herunterregulation geändert hatte. Eine vollständige Liste mit den signifikant ($p < 0,0025$) regulierten Genen (einschließlich der Erläuterung der weiterhin genannten Gennamen) nach *NFATc1*-Herunterregulation findet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 10.1, Tabelle 10.2, Tabelle 10.3 und Tabelle 10.4).

Nach *NFATc1*-Herunterregulation mit der shRNA #1 konnten 161 Gene identifiziert werden, die signifikant ($p < 0,0025$) herunterreguliert wurden und 78 Gene, die verstärkt exprimiert wurden (Abbildung 3.18 A und B). Mit der shRNA #2 konnten 296 hoch- bzw. 98 herunterregulierte Gene mit einer Signifikanz von $p < 0,0025$ identifiziert werden (Abbildung 3.18 C und D). Diese Gen-Sätze wurden als „*NFATc1*-Eigensignaturen“ (nachfolgend als „Down“- bzw. „Up-Eigensignatur“ bezeichnet) der jeweiligen shRNA definiert.

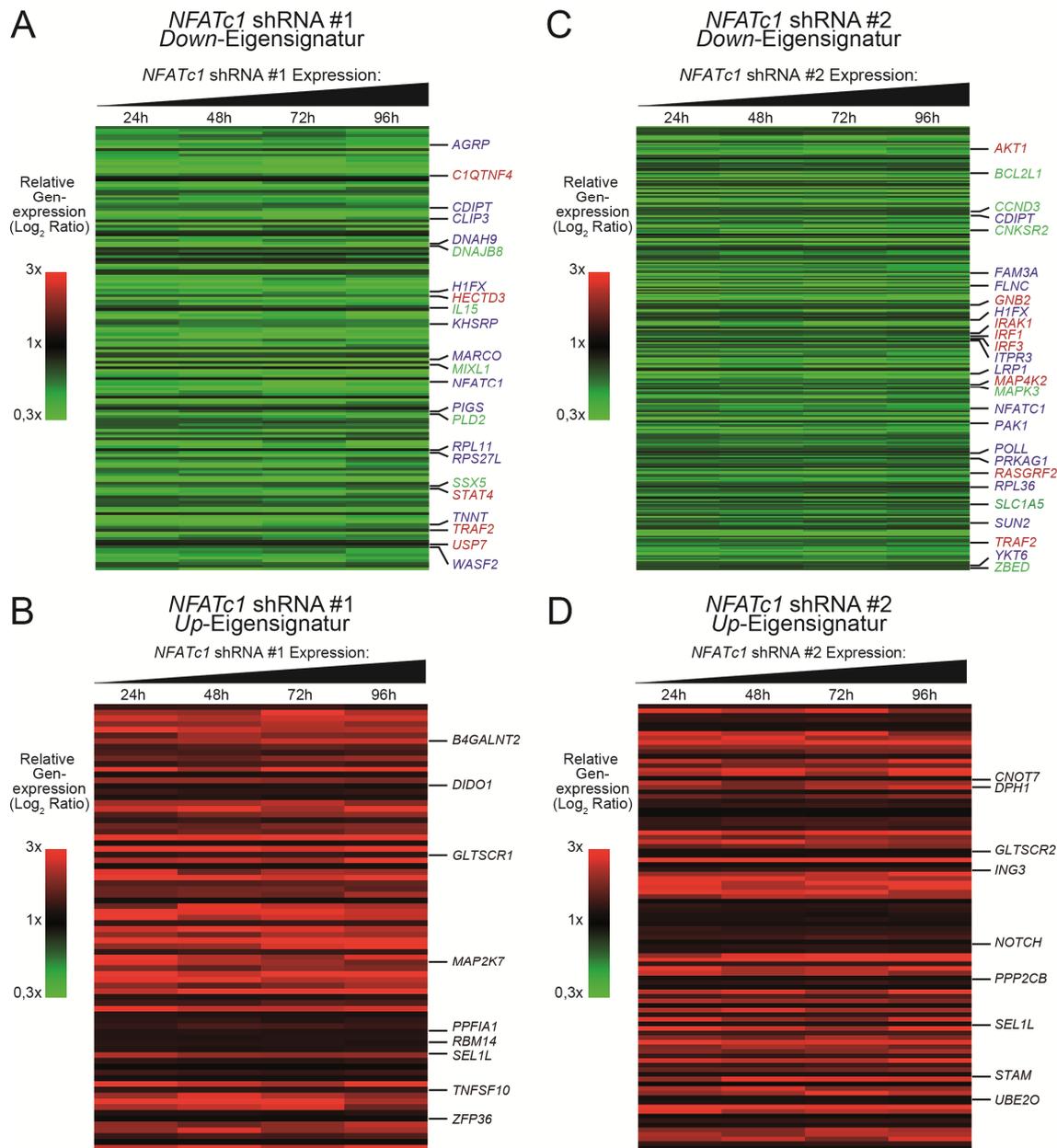


Abbildung 3.18: Top regulierte Gene bei HBL-1 nach NFATc1-Herunterregulation mit angegebener shRNA. **A/C** Nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von NFATc1 ist die Expression von Genen signifikant ($p < 0,0025$) abgefallen, die eine Reihe biologischer Funktionen regulieren, wie die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels, den Aufbau und die Organisation der Zelle (blau), Komponenten Proliferations- und Überlebens-fördernder Signalwege (rot) sowie (Proto-) Onkogene und anti-apoptotische Faktoren (grün). **B/D** Die Herunterregulation von NFATc1 ermöglichte die signifikante ($p < 0,0025$) Erhöhung der Expression von Tumorsuppressorgenen, Stressregulatoren und Proteinen, die den programmierten Zelltod induzieren.

Unter den NFATc1-regulierten Zielgenen fanden sich zu einem großen Teil Gene, die für Proteine codieren, deren Funktion in der Aufrechterhaltung basaler Stoffwechselprozesse der Zelle liegt. Hierzu gehörten Regulatoren und Bestandteile der Proteinbiosynthese (*KHSRP*, *POLL*, *RPL11*), des Katabolismus (*PRKAG1*, *FAM3A*), des Aufbaus und der Organisation der Zelle (*ACTN3*, *CLIP3*, *PAK1*, *WASF2*,) sowie des Transports von Molekülen und Peptiden (*IPO13*, *YKT6*). Einige dieser Gene sind in Abbildung 3.18 blau dargestellt.

Ebenso führte die Herunterregulation von NFATc1 zu einer Abnahme der Expression von Faktoren unterschiedlicher Signalwege, die das Überleben und die Proliferation der Zelle sicherstellen sollen (Abbildung 3.18 A und C; rot hervorgehoben). Unter den top-regulierten Genen fanden sich besonders häufig Positivregulatoren des klassischen und alternativen NF-κB-Signalwegs, die diese Signalkaskade entweder initiieren oder stabilisieren (*C1QTNF4*, *IRAK1*, *TRAF2*) bzw. die Transaktivität von NF-κB erhöhen (*USP7*). Aber auch die Expression entsprechender Faktoren des MAP-Kinase-Signalwegs (*MAPK3*, *MAP4K2*, *RASGRF2*) wurde gefördert. Zusätzlich schien NFATc1 die Expression von beschriebenen (Proto-) Onkogenen bzw. anti-apoptotischer oder Proliferations-fördernder Faktoren zu unterstützen (*BCL2L1*, *CCND3*, *CNKSR2*), deren Expression nach Herunterregulation von NFATc1 ebenfalls abfiel. Unter den hochregulierten Genen nach NFATc1-Herunterregulation konnten bekannte Tumorsuppressorgene (*DPH1*, *GLTSCR2* und *ING3*), Gegenspieler der oben genannten Signalwege sowie pro-apoptotischen Faktoren (*DIDO1*, *TNFSF10*, *UBE2O*) identifiziert werden (Abbildung 3.18 B und D).

3.9.3 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) der NFATc1 shRNA Down- und Up-Eigensignaturen

Um die beobachteten Veränderungen in der Genexpression nach NFATc1-Herunterregulation besser mit zellbiologischen Prozessen in Zusammenhang bringen zu können, wurde eine *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) durchgeführt²⁰³. Diese Analyse ermöglicht den Abgleich der generierten Genexpressionsdaten mit einer Datenbank aus bereits vordefinierten und etablierten Gen-Signaturen. Signaturen, die eine Anreicherung, d.h. einen ES von $\leq -0,5$ bzw. $\geq 0,5$ in der GSEA aufwiesen, sind in Tabelle 10.5 und Tabelle 10.6 im Anhang dieser Arbeit gelistet.

Aufgrund der Tatsache, dass die beiden *NFATc1* shRNAs #1 und #2 neben sechs gemeinsamen *NFATc1* Isoformen vier Transkriptvarianten differenziell abdecken, die jedoch unterschiedliche Zielgene regulieren könnten, wurde untersucht, inwieweit die Eigensignatur der einen shRNA durch die andere shRNA angereichert werden konnte. Hierdurch sollte erhoben werden, inwieweit die durch die shRNA #1 induzierten Veränderungen im Transkriptom durch Expression der shRNA #2 erwirkt werden konnten und *vice versa* (Abbildung 3.19).

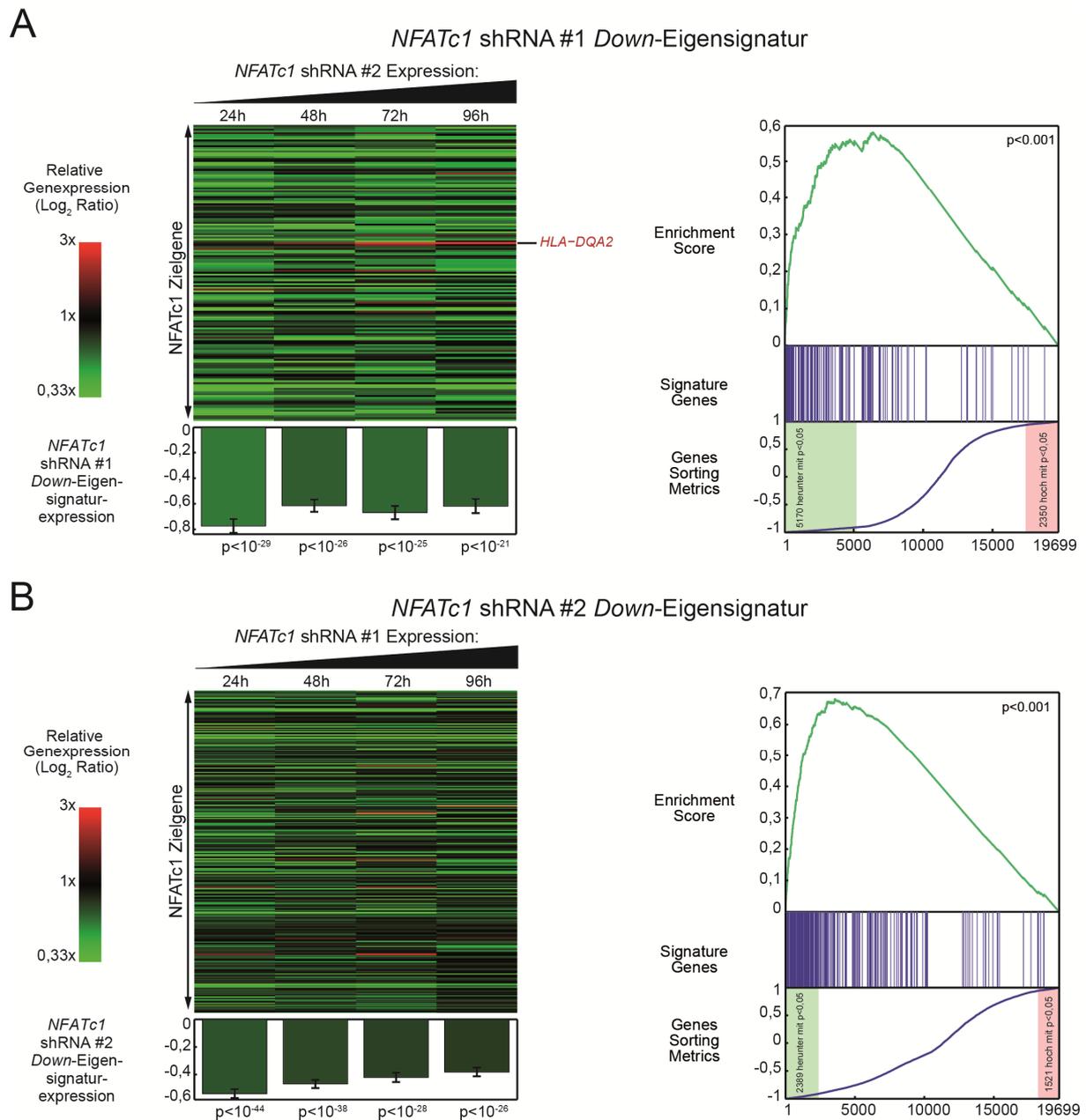


Abbildung 3.19: *NFATc1* Down-Eigensignaturen werden nach *NFATc1*-Herunterregulation mit der jeweils anderen *NFATc1* shRNA angereichert. **A Gene der *NFATc1* shRNA #1 Down-Eigensignatur werden auch nach Herunterregulation mit der shRNA #2 herunterreguliert (*Heatmap* auf der linken Seite), weshalb diese Signatur signifikant ($p < 0,001$) angereichert wurde (*Enrichment Plot*, rechts). **B** Andersherum ist die *NFATc1* shRNA #2 Down-Eigensignatur nach Expression der *NFATc1* shRNA #1 ebenfalls signifikant ($p < 0,001$) angereichert.**

Die *NFATc1* shRNA #1 Down-Eigensignatur war auch nach Herunterregulation durch shRNA #2 signifikant angereichert (ES 0,579; $p < 0,001$; FDR < 0,1%), was bedeutet, dass der Großteil der in dieser Signatur enthaltenen Gene auch nach Expression der shRNA #2 signifikant herunterreguliert werden konnte (Abbildung 3.19 A). Andersherum war die *NFATc1* shRNA #2 Down-Eigensignatur ebenfalls signifikant nach Expression der shRNA #1 angereichert (ES 0,682; $p < 0,001$; FDR < 0,1%; Abbildung 3.19 B).

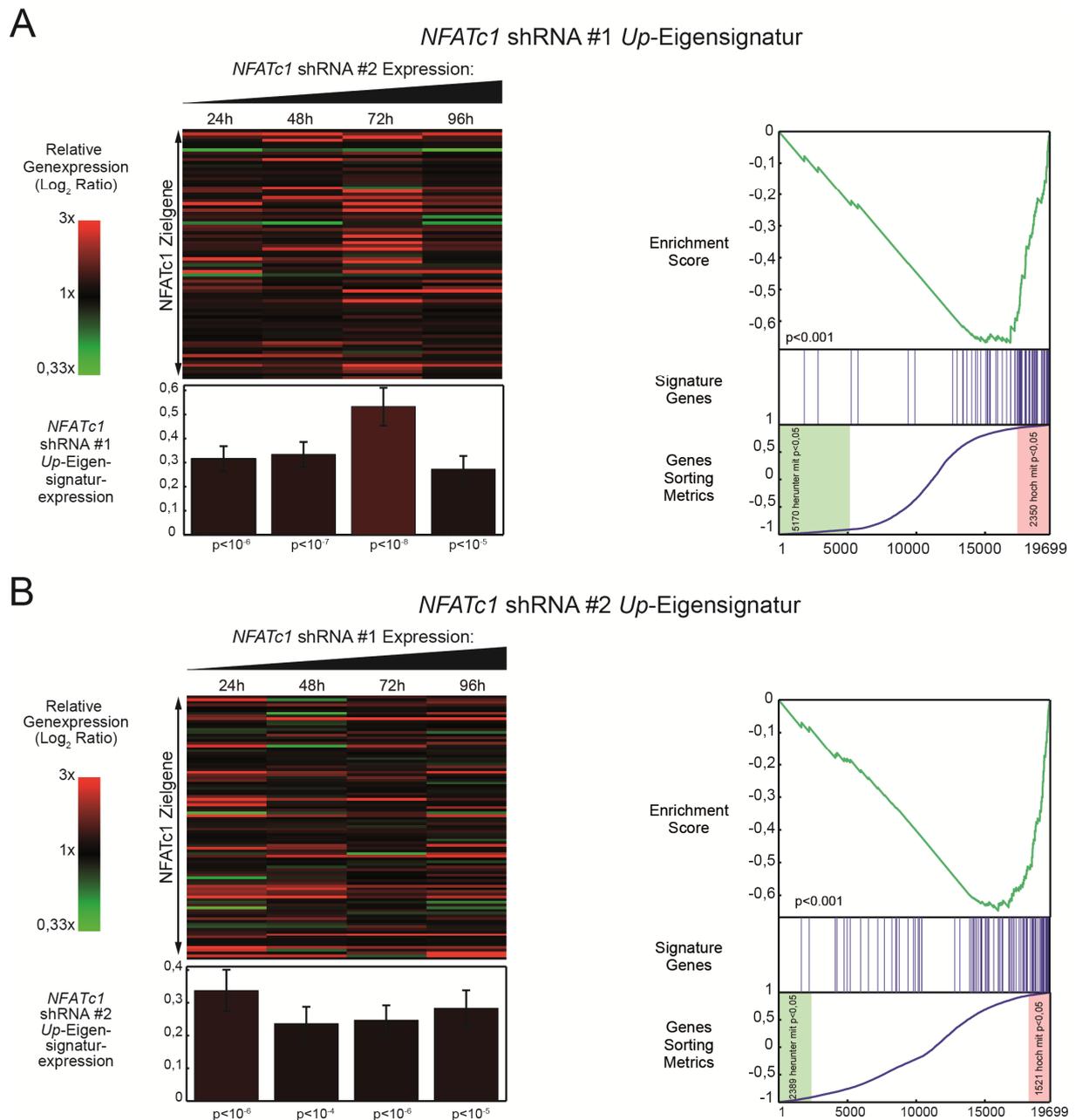


Abbildung 3.20: Hochregulation und Anreicherung der *NFATc1* *Up*-Eigensignaturen durch Expression der jeweils anderen *NFATc1* shRNA. **A** Die Hochregulation der in der *NFATc1* shRNA #1 *Up*-Eigensignatur definierten Gene konnte auch nach shRNA #2-vermittelter *NFATc1*-Herunterregulation beobachtet werden (*Heatmap* auf der linken Seite), was sich durch eine signifikante ($p < 0,001$) Anreicherung dieser Signatur auszeichnete (*Enrichment Plot* rechts) **B** Andersherum wurde auch die *NFATc1* shRNA #2 *Up*-Eigensignatur nach shRNA #1-Expression signifikant ($p < 0,001$) angereichert.

Ebenso wurde die Expression der meisten Gene in der *NFATc1* shRNA #1 *Up*-Eigensignatur nach *NFATc1*-Herunterregulation mit der shRNA #2 signifikant hochreguliert (ES -0,668; $p < 0,001$; FDR < 0,1%) und die Signatur angereichert (Abbildung 3.20 A). Andersherum wurde auch die *NFATc1* shRNA #2 *Up*-Eigensignatur nach shRNA #1 Expression angereichert (ES -0,648; $p < 0,001$; FDR < 0,1%) (Abbildung 3.20 B). Somit haben die *NFATc1* Isoformen, die durch die beiden shRNAs jeweils abgedeckt werden, zwar nicht zu 100% jedoch zu einem

großen Teil die gleichen Zielgene, deren Expression sie regulieren. Weitere GSEA Untersuchungen wurden nach „Verschmelzung“ beider Datensätze durchgeführt, so dass Signaturen betrachtet werden konnten, die durch beide shRNA Datensätze angereichert worden sind.

3.10 NFATc1 moduliert den NF-κB-Signalweg

Bereits auf Einzelgenebene wurde beobachtet, dass die Expression von Regulatoren bzw. Bestandteilen des NF-κB-Signalwegs durch die Herunterregulation von NFATc1 reprimiert werden konnte (Abschnitt 3.9.2). Somit lag es nahe, dass dieser Signalweg bei HBL-1 entweder durch NFATc1 selbst oder durch einen weiteren NFATc1-regulierten Faktor angetrieben wird, um die Proliferation und das Überleben der Zellen zu sichern. Die Signalweiterleitung über den NF-κB-Signalweg stellt für das Überleben der untersuchten ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8 einen essenziellen Mechanismus dar^{71,72,219}. Somit könnte die Inhibierung des NF-κB-Signalwegs als Folge der shRNA-vermittelten NFATc1-Herunterregulation eine mögliche Ursache für den beobachteten toxischen Effekt darstellen. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob eine NFATc1-vermittelte Modulation von NF-κB-Zielgenen sowie Komponenten des NF-κB-Signalwegs bei HBL-1 und TMD8 vorliegen.

Tatsächlich bestätigte die GSEA Auswertung die Anreicherung einer NF-κB-Zielgensignatur, die durch Inhibition der NF-κB Signalweiterleitung mit Hilfe des IKKβ Inhibitors MLN120B bei HBL-1 Zellen generiert worden ist⁷³. Andere NF-κB-bezogene Signaturen in der untersuchten Datenbank wurden entweder nicht angereichert, d.h. der ES konnte den definierten Schwellenwert von -0,5 bis 0,5 nicht unter- bzw. überschreiten oder die Anreicherung zeigte keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$; Tabelle 10.7). Herunterregulierte Gene innerhalb der genannten MLN120B Signatur hingegen wurden nach NFATc1-Herunterregulation ebenfalls größtenteils herunterreguliert, was zu einer signifikanten (ES 0,519; $p < 0,001$; FDR 0,1%) Anreicherung dieser Signatur führte (Abbildung 3.21). Um diese Beobachtung auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Western Blot Analysen nach Expression beider *NFATc1*-spezifischer shRNAs bei HBL-1 und TMD8 für 8 Tage durchgeführt und ihr Einfluss auf eine Reihe bekannter NF-κB-Zielgene mittels Western Blot untersucht.

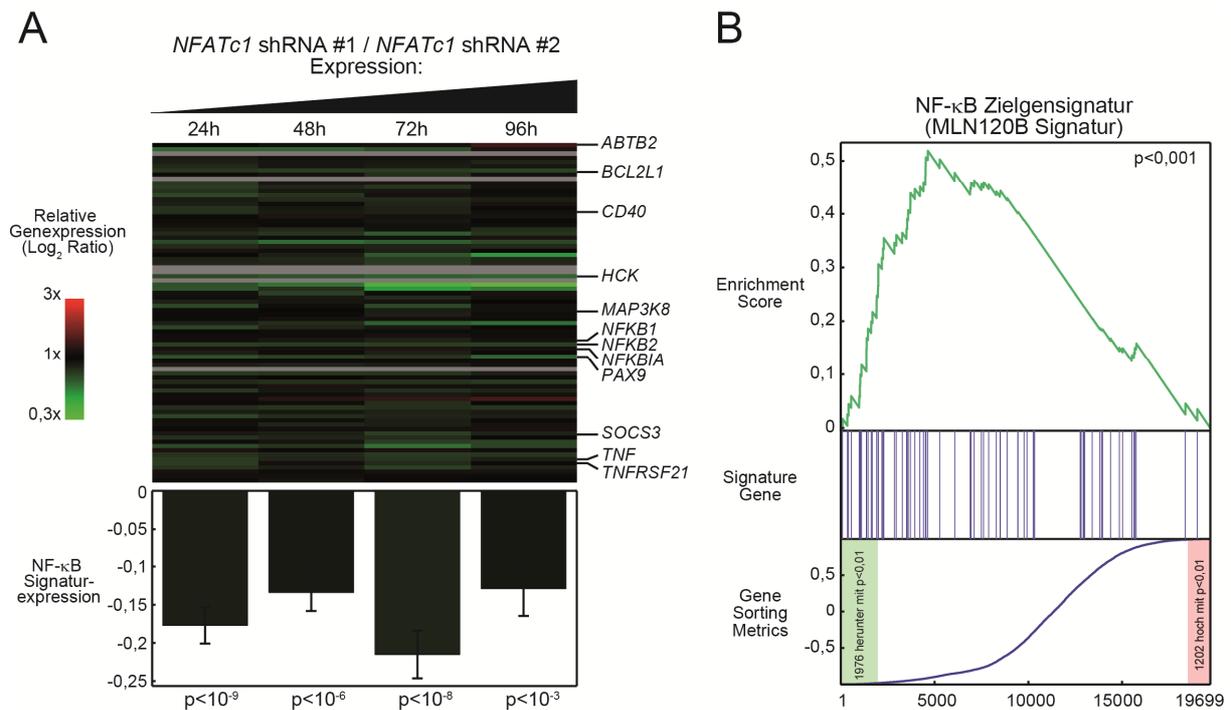


Abbildung 3.21: Eine vordefinierte NF- κ B-Zielgensignatur (MLN120B Signatur) wird nach NFATc1-Herunterregulation signifikant angereichert. **A** Die NF- κ B-Zielgensignatur definiert 84 Gene, die laut GSEA zu den angegebenen Zeitpunkten der NFATc1 shRNA #1/shRNA #2-Expression herunterreguliert worden sind. Einige bekannte NF- κ B-Zielgene sind auf der rechten Seite hervorgehoben dargestellt. **B** Der *Enrichment Plot* weist eine moderate, signifikante Anreicherung der NF- κ B-Zielgene auf.

Tatsächlich konnte eine moderate Herunterregulation von NF- κ B-Zielgenen beobachtet werden, wie z.B. *BCL2L1*, einem anti-apoptotischen Mitglied der BCL2 Familie, was eine reduzierte Transaktivität von NF- κ B nach NFATc1-Herunterregulation suggeriert²²⁰. Des Weiteren wurde eine Reduktion an phosphoryliertem STAT3 (p-STAT3) bei NFATc1 shRNA-behandelten Zellen detektiert. Bei einigen ABC DLBCL Zelllinien konnte in einer früheren Studie eine Phosphorylierung und transkriptionelle Aktivierung von STAT3 beobachtet werden, die durch Zytokine, wie z.B. IL-6 und IL-10, initiiert wurde¹⁰⁷. Das aktive p-STAT3 induzierte daraufhin die Expression anti-apoptotischer und Zellzyklus-treibender Faktoren. Die Zytokine IL-6 und IL-10 wiederum sind bekannte Zielgene von NF- κ B, durch deren Expression sich ABC DLBCL Zelllinien selbst mit Überlebensfaktoren versorgen können¹⁰⁷. Weiterhin wies die Phosphorylierung von I κ B α (p-I κ B α) einen Rückgang nach NFATc1-Herunterregulation auf (Abbildung 3.22). Sobald I κ B α nicht länger phosphoryliert wird, um somit für den proteasomalen Abbau markiert zu werden, wird NF- κ B nicht in den Nukleus transloziert. Somit scheint, zusätzlich zu den Modulationen auf transkriptioneller Ebene, eine NFATc1-vermittelte Modifikation der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs auf Proteinebene stattgefunden zu haben.

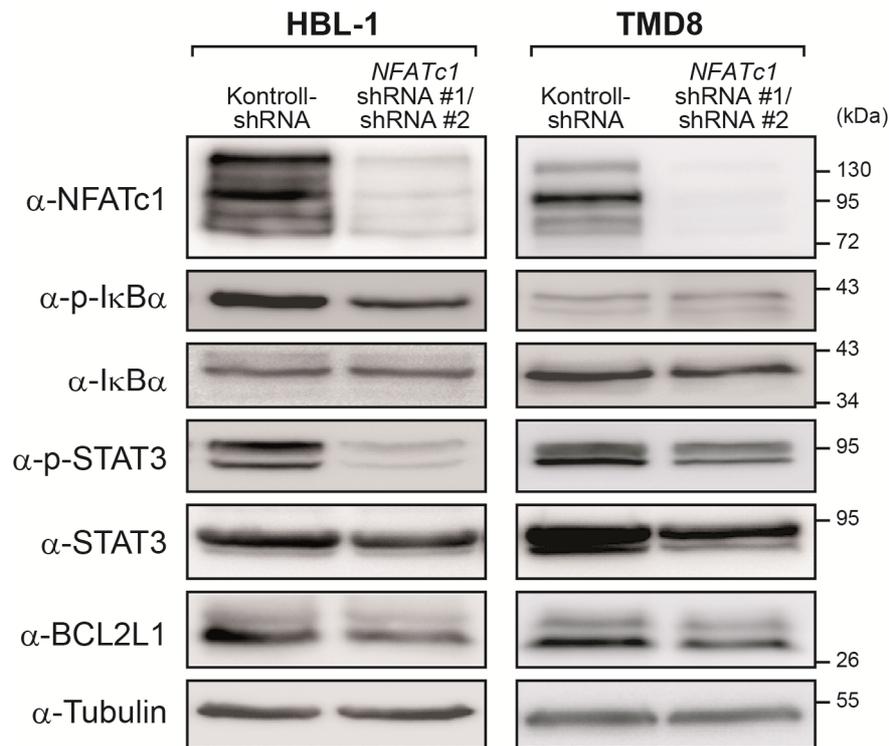


Abbildung 3.22: Western Blot Analysen bekannter NF-κB-Zielgene und NF-κB-aktivierender Faktoren nach NFATc1-Herunterregulation. Für acht Tage wurde die Expression der Kontroll-shRNA oder beider *NFATc1* spezifischer shRNAs #1 und #2 bei HBL-1 und TMD8 induziert. In Gesamtproteinlysaten aus diesen Zellen wurde mittels Western Blot der Einfluss einer shRNA-vermittelten NFATc1-Herunterregulation auf NF-κB-Zielgene untersucht.

Folglich scheint die Herunterregulation von NFATc1 nicht nur auf Genexpressions- sondern auch auf Proteinebene die NF-κB-vermittelte Signalweiterleitung negativ zu beeinflussen und liefert somit die Grundlage einer Toxizität bei NF-κB-abhängigen ABC DLBCL, die auf eine Aufrechterhaltung des NF-κB-Signalwegs durch NFATc1 angewiesen sind.

3.11 NFATc1 dereguliert die Expression von MHC Klasse II-Molekülen

MHC (*Major Histocompatibility Complex*) -Moleküle sind Oberflächenproteine mit der Funktion, Peptidfragmente von Pathogenen zu binden und diese auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen entsprechenden T-Zellen zu präsentieren²²¹. MHC Klasse I-Moleküle präsentieren CD8-positiven T-Zellen vor allem intrazelluläre Antigene, wie virale und bakterielle Pathogene sowie zelleigene Strukturen transformierter Zellen²²¹. Demgegenüber präsentieren MHC Klasse II-Moleküle CD4-positiven T-Zellen extrazelluläre Pathogene²²¹. Die Familie der MHC Klasse II-Moleküle wird durch die polymorphen *HLA* (*Human Leucocyte Antigen*)-*DR*, *-DP* und *-DQ* Gene codiert²²². Das verwandte HLA-DM Protein, sowie die invariante MHC Klasse II-assozierte Kette CD74 katalysieren bzw. regulieren die Peptidbindung und die Präsentation durch MHC Klasse II-Moleküle. B-Zellen

gehören zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen und verfügen daher über MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Nach einer Interaktion mit CD4-positiven Helfer-T-Zellen werden diese aktiviert und leiten eine entsprechende Immunantwort gegen das Pathogen ein, wie die Reifung naiver B-Zellen über die Keimzentrumsreaktion zu Antikörper-sezernierenden Plasma-B-Zellen (siehe 1.1.1). Die MHC Klasse II-vermittelte Antigen-Präsentation ist somit essenziell für die Etablierung einer adaptiven Immunantwort²²³. Der Verlust oder die Herunterregulation von MHC-Molekülen wird häufig bei Tumorzellen beobachtet und stellt einen Mechanismus dar, mit dem transformierte Zellen einer Eliminierung durch das Immunsystem (*Immune Escape* genannt) entkommen²²⁴⁻²²⁸. Ein Verlust der MHC Klasse II-Molekülexpression konnte auch bei DLBCL bereits beobachtet werden und korreliert hier mit einer schlechteren Prognose für das Überleben²²⁹.

3.11.1 Differenzielle MHC Klasse II-Molekülexpression nach NFATc1-Herunterregulation mit zwei verschiedenen *NFATc1* shRNAs

Im Vergleich der beiden shRNA-Eigensignaturen wurde das Gen *HLA-DQA2*, das zu den am stärksten herunterregulierten Genen nach *NFATc1* shRNA #1-Expression gehörte, mit der shRNA #2 auffällig stark und signifikant ($p < 0,020$) hochreguliert (Abbildung 3.19 A). Diese Hochregulation nahm über die gemessenen Zeitpunkte zu und wies darauf hin, dass es sich hierbei nicht um einen zufälligen Fehler handelte. Viel eher schien dieses Gen durch die unterschiedlichen NFATc1 Isoformen, die durch die beiden shRNAs abgedeckt werden, gegenläufig reguliert worden zu sein. Um dieser Besonderheit nachzugehen, ist die Familie der MHC Klasse II-Moleküle, zu der das *HLA-DQA2* Gen gehört, in beiden Array Datensätzen gesondert mittels GSEA analysiert worden. Hierfür wurde die Expression von Genen einer publizierten MHC Klasse II-Signatur (MHC_classII_Node528) nach NFATc1-Herunterregulation mit der shRNA #1 bzw. #2 untersucht (http://lymphochip.nih.gov/cgi-bin/signaturedb/signatureDB_DisplayGenes.cgi?signatureID=205)⁵⁷.

Tatsächlich wiesen die Gene der definierten MHC Klasse II-Signatur eine entgegengesetzte Expression nach NFATc1-Herunterregulation bei HBL-1 mit beiden shRNAs auf (Abbildung 3.23). Während die NFATc1-Herunterregulation durch shRNA #1 mit einer Reduktion der MHC Klasse II-Genexpression einherging (Abbildung 3.23 A), wies die Expression der shRNA #2 eindeutig eine Aktivierung der MHC Klasse II-Genaktivität auf (Abbildung 3.23 B).

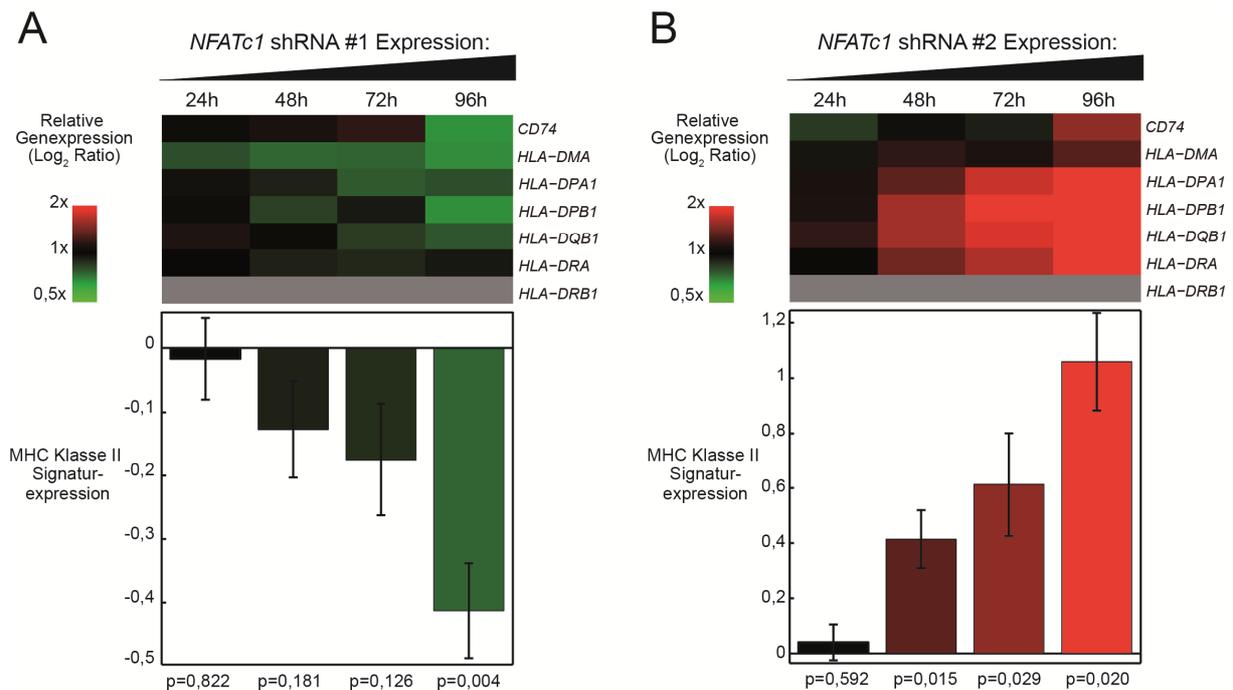


Abbildung 3.23: Divergierende Anreicherung einer MHC Klasse II-Signatur nach Expression von zwei *NFATc1*-spezifischen shRNAs. **A** Die Herunterregulierung von *NFATc1* mit der shRNA #1 führt zu einer Herunterregulierung von Genen in der MHC Klasse II Signatur (MHC_classII_Node528; http://lymphochip.nih.gov/cgi-bin/signaturedb/signatureDB_DisplayGenes.cgi?signatureID=205). **B** Die gleichen Gene werden durch Expression der *NFATc1* shRNA #2 hochreguliert. Das Gen *HLA-DRB1* konnte im Array nicht detektiert werden (grau dargestellt).

Da die Gensignatur lediglich aus sieben Genen besteht und eines davon nicht gemessen werden konnte, war diese sowohl nach *NFATc1* shRNA #1 (ES 0,670; $p < 0,207$; FDR 30,8%) als auch nach *NFATc1* shRNA #2-Expression (ES -0,778; $p < 0,113$; FDR 14,6%) in entgegengesetzte Richtungen zwar stark, jedoch nicht signifikant angereichert. Somit schienen die durch die beiden shRNAs herunterregulierten *NFATc1* Isoformen unterschiedliche Rollen in der MHC Klasse II-Molekülexpression einzunehmen; zum einen die eines transkriptionellen Aktivators, zum anderen die eines Repressors.

Um aufzuklären, ob es sich hierbei auch um einen auf Proteinebene messbaren Effekt handelte, sollten die MHC Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche von HBL-1 Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert werden. Hierfür wurden HBL-1 Zellen mit der Kontroll-shRNA, jeweils einer *NFATc1* shRNA oder mit beiden shRNAs transduziert und selektiert. Vier Tage nach Induktion der shRNA-Expression wurden die Zellen gewaschen und mit PE-markierten Antikörpern gegen HLA-DR Proteine gefärbt, um anschließend eine quantitative Messung der an der Zelloberfläche exprimierten HLA-DR Proteine durchführen zu können.

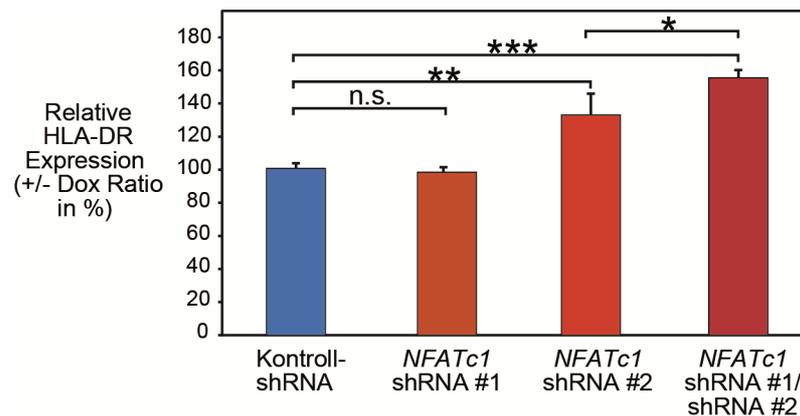


Abbildung 3.24: Die Herunterregulation von *NFATc1* beeinflusst die HLA-DR-Oberflächenexpression. Die Expression der angegebenen shRNA #1 oder shRNA #2 über beider shRNAs zusammen wurde für 96h bei HBL-1 Zellen induziert. Daraufhin wurden die Zellen mit PE-markiertem α -HLA-DR Antikörper gefärbt, durchflusszytometrisch die Oberflächenexpression dieser Proteine bestimmt und auf die Kontroll-shRNA normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tatsächlich konnte bei *NFATc1* shRNA #1-transduzierten HBL-1 Zellen im Vergleich zu Zellen, die die Kontroll-shRNA exprimierten, kein signifikanter ($p < 0,206$) Unterschied in der HLA-DR Oberflächenexpression beobachtet werden (Abbildung 3.24). Die durchflusszytometrische Messungen der shRNA #2-exprimierenden HBL-1 Zellen hingegen konnten eine signifikante ($p < 6,9 \times 10^{-3}$) Steigerung der Oberflächen-HLA-DR auf durchschnittlich 133% im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Der in der GSEA beobachtete divergierende Einfluss der beiden *NFATc1* shRNAs auf die HLA-DR Genexpression konnte somit durch die durchflusszytometrische Untersuchung auch auf Proteinebene bestätigt werden. Interessanterweise wurde die erhöhte HLA-DR-Proteinexpression durch gleichzeitige Herunterregulation aller bekannten *NFATc1* Isoformen mit beiden shRNAs weiter gesteigert (Abbildung 3.24). Die HLA-DR-Expression konnte hierdurch signifikant auf durchschnittlich 156% ($p < 3,6 \times 10^{-5}$) angehoben werden. Somit wurde die HLA-DR-Oberflächenpräsentation durch die Expression beider *NFATc1* shRNAs im Vergleich zur shRNA #2 alleine signifikant ($p < 2,4 \times 10^{-2}$) gesteigert.

3.11.2 Modulierung der MHC Klasse II-Molekülexpression durch die pharmakologische Inhibierung von Calcineurin

Da sich eine erhöhte HLA-DR-Oberflächenexpression nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von *NFATc1* zeigte, sollte überprüft werden, ob durch die pharmakologische Inhibierung der *NFATc1*-aktivierenden Phosphatase Calcineurin dieser Effekt reproduziert werden kann. Hierfür wurden HBL-1 Zellen für 48h mit 2,5 μ M CsA bzw. DMSO inkubiert, die HLA-DR Proteine auf der Zelloberfläche gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

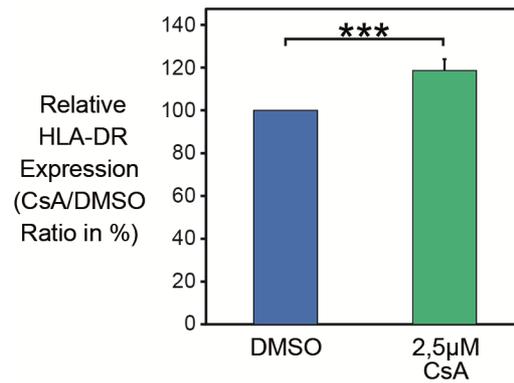


Abbildung 3.25: Modulation der HLA-DR-Expression durch pharmakologische Inhibierung von Calcineurin. Die Expression von HLA-DR Proteinen ist auf der Oberfläche von DMSO- bzw. 2,5µM CsA-behandelten HBL-1 Zellen nach 48h durchflusszytometrisch gemessen und normalisiert auf die DMSO Kontrolle aufgetragen worden. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der CsA/DMSO Ratio aus fünf unabhängigen Experimenten. Der Wert der DMSO Kontrolle wurde bei jedem Experiment als 100% definiert. *** $p < 0,001$.

Im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen konnte eine signifikante ($p < 2,8 \times 10^{-5}$) Steigerung der HLA-DR Oberflächenexpression bei CsA-behandelten Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.25). Dies bestätigte die zuvor gemachten Beobachtungen, dass NFATc1 die Expression der HLA-DR Proteine beeinflusste und dass diese Einflussnahme - zumindest bei der DLBCL Zelllinie HBL-1 - größtenteils von inhibierender Natur ist.

Zusammenfassend konnte die Expression der HLA-DR Oberflächenproteine sowohl durch shRNA-vermittelte Herunterregulation von NFATc1 als auch durch die pharmakologische Inhibierung der NFATc1-aktivierenden Phosphatase Calcineurin signifikant gesteigert werden. Dies deutete darauf hin, dass die Regulation der MHC Klasse II-Molekülexpression teilweise durch NFATc1 oder durch einen NFATc1-getriebenen Faktor reguliert werden kann.

4. Diskussion

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors NFATc1 bei der molekularen Pathogenese von DLBCL untersucht. Neben seiner physiologischen Funktion in der Genregulation, kann die übermäßige NFATc1-Transaktivität pathologisch werden^{195,213,218}. Bei den publizierten Studien, die das onkogene Potential von NFATc1 untersuchten, fällt jedoch auf, dass dieses weniger das Resultat NFATc1-aktivierender Mutationen ist, als vielmehr durch die Deregulation der Expression bzw. Transaktivierung von NFATc1 gefördert wird¹²³. Eine solche deregulierte Expression des *NFATc1* Transkripts kann u.a. durch Amplifikation des *NFATc1* Genlokus auf Chromosom 18q induziert werden, wie sie bei knapp 40% der ABC DLBCL Patientenbiopsien beobachtet wurde⁶⁶. Zudem suggerierte die Detektion von nukleär lokalisiertem NFATc1 bei einigen DLBCL Biopsien, dass der NFAT-Signalweg hier fortwährend aktiviert vorliegt²³⁰. Die Rolle von NFATc1 an der Entstehung von DLBCL ist noch weitgehend ungeklärt und sollte im Rahmen dieser Arbeit am DLBCL Zellkulturmodell untersucht werden.

4.1 DLBCL Zelllinien sind ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Rolle von NFATc1 bei der molekularen Pathogenese von DLBCL

Die Untersuchungen wurden am Zellkulturmodell, bestehend aus fünf ABC und vier GCB DLBCL Zelllinien, durchgeführt (Tabelle 2.1). Lymphom-Zelllinien werden aus Tumorbiopsien etabliert, können über viele Passagen hinweg kultiviert werden und weisen besondere Merkmale auf²³¹: Sie sind monoklonal, da sie aus einer einzigen Zelle des ursprünglichen neoplastischen Gewebes kultiviert werden, ihre Differenzierung ist arretiert, die Zelllinien können auch ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren proliferieren, weisen genetische Alterationen auf, die ihnen Vorteile für die Proliferation bzw. für das Überleben verschaffen, und sie verfügen unter optimalen Kulturbedingungen über eine genetische Stabilität sowie eine Tumor- bzw. Linien-spezifische Genexpression²³². Jedoch kann sich die Konstitution der über viele Generationen *in vitro* kultivierten Zelllinien verändern, u.a. weil diese sich nicht länger in der architektonischen und zellulären Komplexität ihres ursprünglichen Tumors befinden, bestehend aus Stroma, Immunzellen und Gefäßen²³³. DLBCL Zelllinien sind aus DLBCL Patientenbiopsien entwickelt worden und fanden bereits mehrfach ihren Einsatz als funktionelle Modelle zur Untersuchung der DLBCL, da sie Charakteristika der DLBCL Biopsien auf Genom-, Transkriptom- und Proteom-Ebene adäquat repräsentieren^{68,70,73}. Bevor die funktionellen Analysen zur Untersuchung der Rolle von NFATc1 bei der Pathogenese von DLBCL begonnen werden konnten, musste sichergestellt werden, dass das zu verwendende DLBCL Zellkulturmodell hierfür ebenfalls geeignet war.

Es ist bereits bekannt, dass bei ca. 40% der ABC DLBCL Biopsien eine Amplifikation oder einen Hinzugewinn des *NFATc1* Locus auf dem Chromosomenabschnitt 18q23 vorliegt und dass diese Fälle gleichzeitig eine erhöhte *NFATc1* mRNA-Expression aufweisen⁶⁶. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von publizierten aCGH Daten eine solche chromosomale Aberration auch bei vier von fünf ABC DLBCL Zelllinien detektiert werden, jedoch bei keiner GCB DLBCL Zelllinie (Tabelle 3.1)⁷⁰. Alle fünf ABC DLBCL Zelllinien wiesen zudem eine detektierbare *NFATc1*-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auf (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2; Tabelle 3.1). Zu drei der vier untersuchten GCB DLBCL lagen ebenfalls aCGH Daten vor. Zwei GCB DLBCL Zelllinien (HT und OCI-Ly2) wiesen keine 18q Aberrationen auf. Dennoch konnte bei diesen Zelllinien eine ebenso starke *NFATc1* Transkript- und Proteinexpression detektiert werden, wie bei ABC DLBCL Zelllinien mit einer 18q Amplifikation (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2; Tabelle 3.1). Eine GCB DLBCL Zelllinie (OCI-Ly7), sowie eine ABC DLBCL Zelllinie (U2932) wiesen einen 18q Verlust auf. Während U2932 trotz des 18q Verlusts eine vergleichbar starke *NFATc1*-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene aufwies, wurde bei OCI-Ly7 die niedrigste Transkriptmenge und kein *NFATc1* Protein detektiert (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2; Tabelle 3.1). Interessanterweise zeichnete sich die ABC DLBCL Zelllinie TMD8 in den aCGH Analysen ebenfalls durch eine Amplifikation des *NFATc1* Genlokus aus, konnte jedoch weder auf mRNA noch auf Proteinebene eine höhere *NFATc1*-Expression aufweisen, als z.B. die GCB DLBCL Zelllinien OCI-Ly2, die den Chromosomenabschnitt 18q23 im Basiszustand vorliegen hatte (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2; Tabelle 3.1). Auch die GCB DLBCL Zelllinie HT wies keine 18q Aberration auf und konnte dennoch eine vergleichbar starke *NFATc1* Transkript- und Proteinmenge exprimieren, wie HBL-1 bzw. OCI-Ly10, die über 18q23 Amplifikationen verfügen (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2; Tabelle 3.1).

Auffälliger Weise exprimierte jede Zelllinie verschiedene *NFATc1*-Isoformen unterschiedlich stark, was im Western Blot durch ein divergierendes *NFATc1*-Bandenmuster zu erkennen war (Abbildung 3.2). Jedoch konnte keine Aussage darüber getroffen werden, welche Isoform auf welcher Höhe läuft, da der verwendete Antikörper nicht Isoform-spezifisch bindet, sondern alle *NFATc1*-Isoformen detektiert, die über eine regulatorische NHR Domäne verfügen (Tabelle 3.2). Es gibt die Möglichkeit, jede einzelne Isoform von *NFATc1* zu klonieren und anschließend die durch die cDNA codierten Proteine neben den tatsächlichen Zelllysatsproben aufzutragen, um somit auf das Gewicht der endogen exprimierten Isoformen schließen zu können¹⁴⁷. Jedoch haben mehrere *NFATc1*-Isoformen sehr ähnliche Molekülmassen (z.B. Isoformen A/1, G/7, H/8 und I/9 mit 77,8, 77,4, 76,6 bzw. 76,8 kDa; Tabelle 3.2). Hier limitiert die Auflösung des SDS-Gels eine exakte Detektion der einzelnen *NFATc1*-Isoformen.

Mit den ersten Voruntersuchungen konnte zusammengefasst gezeigt werden, dass die bei DLBCL Biopsien beschriebene Amplifikation des *NFATc1* Locus tatsächlich ausschließlich bei den untersuchten ABC DLBCL Zelllinien vorkam, dass eine detektierbare mRNA- und Proteinexpression bei den meisten Zelllinien vorlag und diese in ihrer Ausprägung miteinander korrelierten. Diesbezüglich sind die DLBCL Zelllinien eine adäquates Modell, um den Transkriptionsfaktor NFATc1 funktionell zu analysieren. Aus diesen Voruntersuchungen ist nicht ganz klar hervorgegangen, inwieweit sich eine Amplifikation oder ein Verlust des *NFATc1* Genlokus auf dessen Expression auswirken, da es sowohl unter den fünf ABC als auch unter den vier GCB DLBCL Zelllinien solche gab, die eine starke oder schwache NFATc1-Expression aufwiesen. Ebenfalls konnte keine Aussage über eine signifikant unterschiedliche *NFATc1*-Genexpression zwischen ABC und GCB DLBCL Zelllinien getroffen werden. Daher wird für zukünftige Untersuchungen eine Ausdehnung des DLBCL Zellkulturmodells um weitere Zelllinien erforderlich sein. Des Weiteren müsste mittels aCGH Analysen, sowie routinemäßiger Detektion von NFATc1 auch bei primärem ABC und GCB DLBCL Patientenmaterial untersucht werden, inwieweit die Präsenz oder das Fehlen einer Amplifikation des *NFATc1* Genlokus die NFATc1-Proteinexpression und -Aktivierung beeinflussen. Durch Erweiterung des zu untersuchenden Materials könnte diesbezüglich eine Aussage getroffen werden, die möglicherweise statistisch unterstützt wird.

4.2 Zwei shRNAs induzieren eine Herunterregulation von NFATc1

Die Funktionsweise der in dieser Arbeit benutzten shRNAs beruht auf dem Prinzip der RNA Interferenz (RNAi), durch die die Expression von RNA-Molekülen mit perfekter Komplementarität zum Zieltranskript die Degradation endogener mRNA und somit die posttranskriptionelle Stilllegung dieses Gens verursachen kann²³⁴. Durch den Einsatz von spezifischen shRNAs konnten bereits in zahlreichen Studien funktionelle Untersuchungen an deregulierten Signalwegen bei DLBCL durchgeführt werden^{71,73,109,219}. Durch diese konnte die Bedeutung von onkogenen CARD11-Mutationen sowie der deregulierten Expression von MCL1, einem anti-apoptotischen Mitglied der BCL2 Familie, für das Überleben der ABC DLBCL aufgeklärt werden^{70,72}. Um zu überprüfen, ob überexprimiertes bzw. überaktives NFATc1 bei DLBCL ebenfalls als Onkogen fungieren und Proliferations- und Überlebensfördernde Funktionen regulieren kann, wurde es im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von shRNAs bei DLBCL Zelllinien herunterreguliert. Es wurden zwölf verschiedene *NFATc1* shRNAs mit unterschiedlichen Zielsequenzen im *NFATc1* Transkript getestet (Abbildung 3.5). Die Zelllinien HBL-1 und HT wurden hierfür als ABC bzw. GCB DLBCL Testsystem gewählt, da sie zum einen jeweils die stärkste NFATc1-Proteinexpression unter den Zelllinien beider DLBCL Subtypen aufwiesen (Abbildung 3.2). Zum anderen eigneten sich diese beiden

Zelllinien als repräsentative Modelle der ABC bzw. GCB DLBCL, da bei der Zelllinie HBL-1 eine ABC DLBCL-charakteristische Amplifikation des 18q Chromosomenarms vorlag, auf dem u.a. *NFATc1* codiert wird, während HT einen unveränderten *NFATc1* Locus auswies, so wie der Großteil der GCB DLBCL Biopsien^{66,121,235}. Von den zwölf getesteten shRNAs wiesen zwei *NFATc1* shRNAs einen toxischen Effekt bei der ABC DLBCL Zelllinie HBL-1 auf, jedoch nicht bei HT (Abbildung 3.5 B). Laut eines Sequenzabgleichs bindeten beide shRNAs jeweils in acht der zehn *NFATc1* Transkriptvarianten (Tabelle 3.2) und in verschiedenen Regionen der *NFATc1* mRNA (Abbildung 3.6). Weitere Untersuchungen der identifizierten shRNAs konnten bestätigen, dass diese jeweils spezifisch gegen *NFATc1* gerichtet sind. Erstens wurde mit beiden *NFATc1*-bindenden shRNA-Sequenzen ein Datenbank-Abgleich mittels BLAST durchgeführt, durch den keine Sequenzhomologien zu weiteren Transkripten identifiziert werden konnten, die mit den shRNAs in voller Länge (21nt) paaren können (Daten nicht gezeigt). Zwar fanden sich Transkripte, die teilweise durch die shRNAs gebunden werden könnten, diese befanden sich jedoch nicht unter den Top-herunterregulierten Genen nach Expression der shRNAs (Tabelle 10.1 und Tabelle 10.3). Demgegenüber war *NFATc1* auf beiden Listen der am stärksten herunterregulierten Gene nach shRNA #1 bzw. #2-Expression zu finden. Zweitens haben beide shRNAs, wie im weiteren Verlauf der Untersuchungen mittels GSEA gezeigt werden konnte, trotz unterschiedlicher Sequenzen und Bindung in verschiedenen Regionen der *NFATc1* mRNA die Expression vieler gleicher Zielgene signifikant beeinflussen können (Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20). Dies weist darauf hin, dass die Zielgene bzw. Signaturen durch die gleichen Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Drittens konnte die Doxycyclin-induzierte Expression beider shRNAs *NFATc1* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant herunterregulieren (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Daher kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass die in dieser Arbeit präsentierten *NFATc1* shRNAs #1 und #2 weitere Transkripte herunterregulieren, auf deren Reduktion die beobachteten Effekte beruhen.

Die Expression der shRNA #2 schien auf Proteinebene tendenziell eine stärkere *NFATc1* Herunterregulation zu induzieren, als die shRNA #1 (Abbildung 3.8). Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass die beiden *NFATc1* Isoformen 1/A und 9/I durch Expression der shRNA #1 nicht beeinträchtigt werden (Tabelle 3.2). Diese beiden Transkripte werden zu Proteinen mit einer geschätzten Molekülmasse von 77,8 (1/A) bzw. 76,8kDa (9/I) translatiert, die aufgrund der sehr ähnlichen Größe im Western Blot als eine einzige Bande erscheinen. Da diese Bande nach Expression der shRNA #1 noch immer detektierbar war, durch die shRNA #2 jedoch reduziert werden konnte, wirkte die Herunterregulation mit der shRNA #2 stärker. Die beiden kurzen *NFATc1* Isoformen 4/D (38,6kDa) und 10/J (51,1kDa) werden durch den verwendeten monoklonalen Antikörper nicht detektiert (Tabelle 3.2). Der

Antikörper bindet in der regulatorischen NHR (codiert durch das Exon 3), die diesen beiden Isoformen fehlt. Im Exon 3 bindet allerdings auch die zweite *NFATc1* shRNA (Abbildung 3.6). Dadurch, dass diese beiden Isoformen nicht detektiert werden, konnte ihre Herunterregulation nach shRNA #2-Expression mittels Western Blot nicht bestimmt werden. Die qPCR Ergebnisse hingegen machen deutlich, dass die Herunterregulation der *NFATc1* Transkripte mit den beiden shRNAs jeweils ungefähr gleich stark war. Die verwendete Sonde bindet in einem Bereich (Exon 7 und Exon 8), der bei allen zehn möglichen Transkripten vorhanden ist und kann daher alle herunterregulierten Isoformen erfassen. Die simultane Expression beider shRNAs verstärkte die Herunterregulation von *NFATc1* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, vermutlich weil alle zehn *NFATc1* Transkriptvarianten gleichzeitig herunterreguliert wurden (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Zusammenfassend wiesen die Daten darauf hin, dass die hier verwendeten shRNAs *NFATc1*-spezifisch sind und sich für weitere funktionelle Untersuchungen von *NFATc1* am DLBCL Zellkulturmodell eignen.

4.3 *NFATc1* ist essenziell für zwei ABC DLBCL Zelllinien

Unter Verwendung der beiden *NFATc1*-spezifischen shRNAs wurde der Einfluss einer Herunterregulation von *NFATc1* auf die Viabilität der neun DLBCL Zelllinien im shRNA-Toxizitätstest untersucht. Bei den ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8 konnte nach Herunterregulation von *NFATc1* ein toxischer Effekt beobachtet werden (Abbildung 3.11). Insgesamt war der toxische Effekt bei TMD8 stärker ausgeprägt, was jedoch damit zusammenhängen kann, dass bei TMD8 die zu reduzierende Transkript-Menge deutlich geringer war und daher womöglich besser gelang, als bei HBL-1 (Abbildung 3.1). Der toxische Effekt, der nach Herunterregulation von *NFATc1* beobachtet wurde, konnte bei HBL-1 Zellen auf eine Zunahme der Apoptose zurückgeführt werden (Abbildung 3.14), was nahelegt, dass der Transkriptionsfaktor *NFATc1* unentbehrlich für das Überleben dieser Zelllinie ist. Ein weiteres Indiz dafür, dass HBL-1 und TMD8 tatsächlich von der *NFATc1*-Transaktivität abhängig sind, liefert der toxische Effekt von CsA auf diese beiden Zelllinien, der jedoch nicht bei der *NFATc1*-unabhängigen Zelllinie HT beobachtet werden konnte (Abbildung 3.12). *NFATc1* ist ein Transkriptionsfaktor, der transkriptionell aktiv ist, sobald er von Calcineurin dephosphoryliert wird und nukleär lokalisiert vorliegt^{157,236}. Die Phosphorylierung von *NFATc1* bewirkt seinen nukleären Export und somit die Beendigung seiner transkriptionellen Aktivität^{155,156,186}. Mittels Western Blot und unter Einsatz des monoklonalen *NFATc1* Antikörpers, der in dieser Arbeit ebenfalls verwendet wurde, konnte die Phosphorylierung von *NFATc1* durch eine Verschiebung seiner Protein Banden in einen höheren molekularen Bereich bereits durch mehrere Studien beschrieben werden^{147,155,210,211,237-239}. Nach Behandlung der DLBCL Zelllinien mit CsA für 1,5h wurde eine

solche Verschiebung der NFATc1 Isoformen beobachtet (Abbildung 3.13), was darauf hindeutete, dass NFATc1 zuvor dephosphoryliert vorgelegen hat. Gleichzeitig konnte nach CsA-Behandlung eine Verschiebung der subzellulären NFATc1-Lokalisation vom Nukleus in das Zytosol detektiert werden. Diese Beobachtungen suggerierten, dass NFATc1 bei den untersuchten DLBCL Zelllinien in einer konstitutiv aktiven Form vorzufinden war und durch die Inhibierung von Calcineurin mittels CsA phosphoryliert, ins Zytosol transloziert und somit inaktiviert wurde. Interessanterweise fand sich diese Beobachtung in abgeschwächter Weise auch bei der GCB DLBCL Zelllinie HT. Die nukleäre Lokalisation und somit Transaktivität von NFATc1 war auch bei dieser Zelllinie im Ausgangszustand gegeben, jedoch wies ihre Unterbrechung durch Behandlung mit CsA keinen toxischen Effekt auf, wie er bei HBL-1 und TMD8 beobachtet wurde (Abbildung 3.12). Somit schien die GCB DLBCL Zelllinie HT von der transkriptionellen Aktivität von NFATc1 nicht abzuhängen. Auf welche Weise NFATc1 bei HT aktiviert wird bleibt noch zu klären. Bei den beiden ABC DLBCL Zelllinien wird NFATc1 möglicherweise durch die chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs induziert.

Die shRNA-vermittelte Herunterregulation von NFATc1 induzierte einen toxischen Effekt ausschließlich bei zwei ABC DLBCL Zelllinien, die beschriebene ITAM-Mutationen in der CD79B BZR-Untereinheit tragen und eine chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs aufweisen⁷¹. Es wurde daher angenommen, dass bei HBL-1 und TMD8 das NFATc1 stets durch die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert wird, weil diese als Folge des chronisch aktiven BZR-Signalwegs aktiviert wird^{71,208,209}. Eine Inaktivierung des BZR-Signalwegs hätte demzufolge eine inhibierende Wirkung auf NFATc1 aufweisen müssen. Um dem nachzugehen, wurde bei der ABC DLBCL Zelllinie HBL-1 die Signalweiterleitung über den BZR-Signalweg durch shRNA-vermittelte Herunterregulation der BZR-Untereinheit CD79A unterbrochen. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von CD79A Einfluss auf die Expression und Laufeigenschaft von NFATc1 zu nehmen schien (Abbildung 3.4). Diese Beobachtung ist im Einklang mit der beschriebenen Induktion der *NFATc1* mRNA-Expression bei B-Zellen nach Aktivierung des BZR-Signalwegs^{149,240}. Eine Unterbrechung des BZR-Signalwegs hat somit auch eine Unterbrechung der NFATc1 Genexpression zufolge. Die modifizierte Laufeigenschaft von NFATc1 korrespondierte mit der NFATc1-Bandenverschiebung, wie sie nach Behandlung mit CsA beobachtet wurde (Abbildung 3.13), und suggerierte somit eine Reduktion in der Calcineurin-vermittelten Dephosphorylierung von NFATc1 nach Unterbrechung des BZR-Signalwegs. Um diese Schlussfolgerung weiterhin zu bestätigen, müssten Untersuchungen zu der subzellulären Lokalisation von NFATc1 nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von CD79A durchgeführt werden, die einen nukleären Export von NFATc1 nach CD79A Herunterregulation zeigen. Zusätzlich sollte in diesem Zusammenhang geklärt werden, ob die Herunterregulation bzw. Inhibierung weiterer Faktoren, die in der Signalübertragung

zwischen den BZR und NFATc1 geschaltet sind, ebenfalls eine Inaktivierung von NFATc1 bzw. einen toxischen Effekt bei den Zelllinien HBL-1 und TMD8 induzieren können. Für die Kinase PKC β z.B. konnte dies bereits gezeigt werden²¹⁹. Insgesamt betrachtet zeigten sowohl der shRNA-Toxizitätstest als auch die Untersuchungen der Zell-Viabilität nach CsA-Behandlung, dass die ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8 eine NFATc1-Abhängigkeit aufweisen, die womöglich durch die chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs initiiert wird. Diese Daten suggerierten somit, dass der Transkriptionsfaktor NFATc1 eine essenzielle Rolle für das Überleben dieser Zelllinie einnimmt, vermutlich indem er die Expression pro-proliferativer und Überlebens-fördernder Faktoren reguliert.

4.4 NFATc1 reguliert die Expression pro-proliferativer und anti-apoptotischer Faktoren

Bei der Zelllinie HBL-1 konnte eine Induktion der Apoptose nach Herunterregulation von NFATc1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.14). Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass NFATc1 essenziell für das Überleben der ABC DLBCL Zelllinie HBL-1 ist und wahrscheinlich die Genexpression anti-apoptotischer bzw. pro-proliferativer Faktoren beeinflusst. Das Proto-Onkogen *MYC* ist ein solcher, in der Literatur häufig genannter Kandidat, dessen Expression z.B. beim Pankreaskarzinom durch NFATc1 induziert werden kann^{195,213,218}. Es wurde bereits gezeigt, dass die shRNA-vermittelte Herunterregulation von *MYC* tatsächlich einen toxischen Effekt sowohl auf GCB als auch auf ABC DLBCL Zelllinien hat, u.a. auf HBL-1 und TMD8⁷¹. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Aussage bestätigt und erweitert werden (Anschnitt 3.8). Hierbei wurde gezeigt, dass sowohl bei HBL-1 als auch bei TMD8 ein toxischer Effekt durch die shRNA-vermittelte Herunterregulation von *MYC* induziert werden konnte (Abbildung 3.15). Eine solche Herunterregulation von *MYC* war jedoch nicht nach Herunterregulation von NFATc1 zu beobachten (Abbildung 3.16). Auch durch die folgenden Genexpressionsanalysen wurde bestätigt, dass zumindest bei der untersuchten Zelllinie HBL-1 keine Regulation der *MYC*-Genexpression durch NFATc1 vorliegt. Der toxische Effekt, der bei HBL-1 durch die Herunterregulation von NFATc1 induziert wurde, beruht daher nicht auf einer Herunterregulation von *MYC*, sondern wird vermutlich durch die modulierte Expression anderer NFATc1-regulierter Faktoren vermittelt. Im Gegensatz hierzu wurde in einer anderen Studie eine Korrelation zwischen der NFATc1 und *MYC* Expression bei DLBCL beschrieben²⁴¹. In dieser Studie haben 72% der untersuchten DLBCL Biopsien eine positive Färbung für NFATc1 aufgewiesen, von denen 82% positiv sowohl auf nukleäres NFATc1 als auch auf nukleäres *MYC* gefärbt wurden²⁴¹. Eine Klassifizierung der Biopsien in ABC bzw. GCB DLBCL wurde nicht durchgeführt. Zudem wurde berichtet, dass die shRNA-vermittelte Herunterregulation von NFATc1 eine Reduktion

der MYC mRNA bei zwei DLBCL Zelllinien (MS und OCI-Ly10) nach sich ziehen konnte²⁴¹. Ein Rückgang der NFATc1 und MYC Proteinexpression ist ebenfalls nach Behandlung mit dem Calcineurin A Inhibitor FK506 für 24h beobachtet worden²⁴¹. Leider wurden für die genannten Western Blot Analysen lediglich die nukleär lokalisierten NFATc1 und MYC Proteine dargestellt, so dass ein Eindruck über die zytosolische Verteilung der jeweiligen Proteine nicht gewonnen werden konnte. Weiterhin ist es überraschend, dass nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von NFATc1 eine solch starke Reduktion an MYC Protein erzielt werden konnte, wie sie bei der Zelllinie OCI-Ly10 gezeigt wurde, da in der hier vorliegenden Arbeit ein toxischer Effekt auf OCI-Ly10 nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von NFATc1 nicht beobachtet werden konnte. Eine solche Reduktion von MYC, als Folge einer NFATc1-Herunterregulation, wäre jedoch erfahrungsgemäß toxisch für die Zelllinie OCI-Ly10 gewesen. Auch wenn in dieser Studie ein putatives NFAT-Bindemotiv in der Promoterregion von *MYC* identifiziert werden konnte, blieb am Ende die Frage offen, welchen Einfluss die hier gemachten Beobachtungen bezüglich der NFATc1-getriebenen MYC Expression auf die Proliferation bzw. das Überleben der untersuchten DLBCL Zelllinien hat. Dementsprechend sollten weitere Untersuchungen mit einem erweiterten Zellkulturmodell dabei helfen können, die vorliegenden Beobachtungen bezüglich der NFATc1-induzierbaren MYC Expression in der zitierten und der hier vorliegenden Arbeit besser interpretieren zu können. Hierfür sollte bei jeder Zelllinie zunächst der NFATc1 und MYC Status sowohl auf Protein als auch auf mRNA Ebene ermittelt werden und soweit möglich eine Bindung des endogen exprimierten NFATc1 Proteins an das beschriebene NFAT-Bindemotiv dokumentiert werden. Des Weiteren sollten sowohl Western Blot, qPCR sowie Genexpressionsanalysen hinzugezogen werden, um eine Korrelation zwischen der NFATc1 und MYC Expression zu bestätigen oder aber auszuschließen.

Zur Identifikation der NFATc1-getriebenen Gene bei HBL-1, wurden genomweite Genexpressionsanalysen nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von NFATc1 durchgeführt (Abschnitt 3.9). Die spezifische Herunterregulation von NFATc1 hatte maßgeblichen Einfluss auf die Genexpression von Faktoren verschiedenster Zellfunktionen und induzierte sowohl die Repression als auch die Induktion von Genen, was im Einklang mit der zuvor bereits gemachten Beobachtung steht, dass NFATs beide Rollen übernehmen können - die eines transkriptionellen Repressors und Aktivators (Abbildung 3.18)^{242,243}. Eine Reihe von Genen, die für die Organisation des Zytoskeletts verantwortlich sind, wurde herunterreguliert (Abbildung 3.18 A und C). Ein intaktes und funktionsfähiges Zytoskelett ist von zentraler Bedeutung für die Organisation der Zellstruktur und -teilung sowie für den Transport von Organellen und Molekülen, u.a. während der BZR-Signalweiterleitung und Aktivierung nachfolgender Signalkaskaden²⁴⁴⁻²⁴⁶. Darüber hinaus konnte nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von NFATc1 eine Suppression von Genen beobachtet

werden, die basale Stoffwechselprozesse der Zelle übernehmen oder diese mit proliferativen bzw. anti-apoptotischen Signalen versorgen, wie z.B. *BCL2L1*, und somit die fortwährend proliferative Signalweiterleitung sichern. Diese Beobachtung korrespondiert mit der einer kürzlich publizierten Studie, die eine reduzierte Proliferation von NFATc1^{-/-} B-Zellen im Mausmodell zeigte²⁴⁰. Darüber hinaus schien NFATc1 die Expression pro-apoptotischer Faktoren zu inhibieren, wie die von *TNFSF10*, das nach Bindung an seinen Rezeptor den programmierten Zelltod von Krebszellen initiieren kann²⁴⁷. Des Weiteren unterdrückte NFATc1 die Expression von Tumorsuppressorgenen, wie die von *GLTSCR2*, das durch Stabilisierung von p53 das Tumorwachstum von Kolonkarzinom Zelllinien verringern konnte²⁴⁸. Die NFATc1-regulierte Unterdrückung dieser Gene suggerierte eine Beteiligung von NFATc1 an der Abwehr eines induzierten Zelltods, einem der Hauptmerkmale von Krebs⁴⁵. Somit scheint dieser Transkriptionsfaktor bei den NFATc1-abhängigen DLBCL durch die konstitutive Aktivierung eine mögliche Rolle als Onkogen einzunehmen.

Unter den top NFATc1-regulierten Genen bei HBL-1 befand sich das Proto-Onkogen *AKT1*, ein Familienmitglied der AKT Serin/Threonin-Kinasen (Abbildung 3.18 C). AKT wird über den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert, indem es phosphoryliert wird und daraufhin selber die Phosphorylierung von Zielproteinen unterschiedlicher Signalwege katalysiert. Eines dieser Zielproteine ist die bekannte NFATc1-Kinase GSK3 β , die durch phosphoryliertes AKT (p-AKT) deaktiviert wird^{249,250}. Die Aktivität von p-AKT unterstützt möglicherweise die NFATc1-getriebene Genexpression bei HBL-1, indem es GSK3 β inhibiert, ein Mechanismus dessen Einsatz bereits in der Differenzierung von Osteoklasten beobachtet werden konnte²⁵¹. Die Expression und Phosphorylierung von AKT bei DLBCL Zelllinien wurde in einer früheren Studie bereits bestimmt und eröffnete unter anderem, dass die beiden ABC DLBCL Zelllinien HBL-1 und TMD8, sowie die GCB DLBCL Zelllinie HT über besonders hohe Mengen des aktiven p-AKT Proteins verfügen⁶⁸. Bei der Zelllinie HT konnte diese Beobachtung damit begründet werden, dass der Gegenregulator des PI3K/AKT-Signalwegs, das Tumorsuppressorprotein PTEN, nicht exprimiert wurde und AKT somit konstitutiv phosphoryliert werden konnte⁶⁸. Bei den Zelllinien HBL-1 und TMD8 hingegen handelt es sich möglicherweise um eine NFATc1-getriebene Transkription von *AKT1*, die sich neben der chronischen Aktivierung des BZR-Signalwegs als zusätzlichen, aktivierenden Mechanismus entwickelt haben könnte. Während die chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs eine konstitutive Expression und Aktivierung von NFATc1 sicherstellt, verhindert die NFATc1-regulierte Expression von *AKT1*, sowie die BZR-vermittelte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs eine Inhibierung des aktiven NFATc1 durch GSK3 β . Somit wäre die nukleäre Lokalisation von NFATc1 doppelt gesichert. Die Beteiligung des PI3K/AKT Signalwegs an der Regulation der Aktivierung von NFATc1 sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden. Die Unterbrechung dieses Signalwegs während der Differenzierung von Osteoklasten konnte

nach Behandlung mit dem PI3K Inhibitor LY294002 oder durch Überexpression einer konstitutiv aktiven GSK3 β -Variante sowohl die Expression von *NFATc1* als auch seine nukleäre Lokalisation reduzierten²⁵¹. Auch bei T-Zellen konnte eine Abhängigkeit der NFATc1 Proteinexpression und nukleären Lokalisation von der Aktivität der PI3K beobachtet werden²⁵². Ob die NFATc1-Aktivität bei den untersuchten DLBCL Zelllinien ebenfalls abhängig von der Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs erfolgt, ließe sich durch die Behandlung der Zellen mit dem PI3K Inhibitor LY294002 und anschließenden Western Blot Analysen der nukleären und zytosolischen Fraktionen herausfinden.

4.5 NFATc1 moduliert den NF- κ B-Signalweg und die Aktivierung von STAT3

Die Abhängigkeit der ABC DLBCL von einer konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs gehört zu den wichtigsten Charakteristika dieses Subtyps⁷⁹. Eine Reihe von Mutationen und genetischen Läsionen konnten bereits identifiziert werden, die die Aufrechterhaltung dieses Signalwegs sicherstellen (Abschnitt 1.5.2). Ein weiterer potentieller Positivregulator des NF- κ B-Signalwegs ist möglicherweise der Transkriptionsfaktor NFATc1, wie im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnte (Abschnitt 3.10). Genexpressionsanalysen nach shRNA-vermittelter NFATc1-Herunterregulation eröffneten eine Reduktion von Faktoren, die eine unterstützende Funktion in der NF- κ B-Signalweiterleitung haben (Abbildung 3.18 A und C). Hierzu gehörte u.a. das putative pro-inflammatorische Zytokin *C1QTNF4*, das sowohl die Transaktivierung von NF- κ B und Phosphorylierung von STAT3 als auch die Expression des Zytokins IL-6 induzieren kann²⁵³. Darüber hinaus fiel nach NFATc1-Herunterregulation die Expression des *IRAK1*-Gens ab, das für eine Kinase codiert, die eine unentbehrliche Rolle in der IL-1/TLR-induzierten und MYD88/IRAK4 und TRAF6-vermittelten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs bei DLBCL mit MYD88-aktivierenden Mutationen einnimmt¹¹¹. Sowohl HBL-1 als auch TMD8 tragen eine solche beschriebene MYD88-Mutation, die eine spontane Assoziation des MYD88/IRAK4/IRAK1 Komplexes und anschließende NF- κ B-Aktivierung sowie die STAT3-Phosphorylierung vorantreibt¹¹¹. Die Expression von IRAK1 ist unentbehrlich für diese beiden Zelllinien und die shRNA-vermittelte Herunterregulation von IRAK1 induzierte hier einen toxischen Effekt¹¹¹. Somit scheint NFATc1 durch Aufrechterhaltung der *IRAK1*-Genexpression eine zusätzliche Überlebens-fördernde und NF- κ B-treibende Funktion einzunehmen. Ein weiterer Faktor, dessen Transkription durch NFATc1-Herunterregulation moduliert wurde, ist die Ubiquitin-spezifische Protease-7 (*USP7*; Abbildung 3.18). Sie ist in der Lage, die p65-Untereinheit eines DNA/NF- κ B-Komplexes wieder zu deubiquitinieren, der zuvor durch E3-Ligasen ubiquitiniert und somit für den proteasomalen Abbau markiert wurde. Dadurch stabilisiert USP7 die Interaktion zwischen

dem Zielgen-Promoter und NF- κ B und verhindert die Beendigung der NF- κ B-getriebenen Genexpression²⁵⁴.

Neben dem Abfall NF- κ B-aktivierender Faktoren, konnte nach NFATc1-Herunterregulation in den GSEA Untersuchungen darüber hinaus eine signifikante Anreicherung einer Gensignatur, bestehen aus NF- κ B-regulierten Zielgene beobachtet werden (Abbildung 3.21). Diese NF- κ B-Zielgensignatur besteht aus solchen Gene, deren Expression nach Inhibition des NF- κ B-Signalwegs durch den IKK β -Inhibitor MLN120B negativ beeinflusst worden ist⁷³. Andere NF- κ B-verwandte Signaturen wurden nicht bzw. nicht signifikant angereichert (Tabelle 10.7). NF- κ B-Zielgene innerhalb der MLN120B-Signatur jedoch wiesen auch nach NFATc1-Herunterregulation eine Anreicherung auf und suggerierten somit eine gewisse Regulation durch NFATc1 selbst oder durch einen NFATc1-getriebenen Faktor. Eines der in der Signatur definierten und wohlbekanntes NF- κ B-Zielgene ist *BCL2L1*, dessen Genexpression ebenfalls negativ durch die NFATc1-Herunterregulation beeinflusst wurde²⁵⁵. Diese Beobachtung konnte auf Proteinebene mittels Western Blot zusätzlich bestätigt werden (Abbildung 3.22). Zudem konnte hier eine Abnahme von p-I κ B detektiert werden, die auf eine Unterbrechung der proteasomalen Degradation des NF- κ B-Inhibitors hindeutet, die eine reduzierte Aktivität von NF- κ B nach sich zieht²⁵⁶. Diese Daten gehen mit der kürzlich gemachten Beobachtung einher, dass NFATc1 mögliche Prozesse in der BZR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung kontrolliert, die noch vor das I κ B α -phosphorylierende IKK β geschaltet sind²⁵⁷. Weiterhin wurde im Rahmen der genannten Studie gezeigt, dass die Weiterleitung über den BZR-Signalweg die Bindung des NF- κ B Heterodimers bestehend aus p50 und c-Rel an den NFATc1 Promoter und somit die Expression der NFATc1 Isoform A/1 deutlich steigerte²⁵⁷. Folglich wäre bei den beiden Zelllinien HBL-1 und TMD8 nicht bloß die NFATc1-Aktivierung, sondern zusätzlich die NFATc1-Expression durch eine ITAM-Mutation-bedingte, chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs gesichert. In seiner DNA-Bindedomäne weist NFATc1 eine starke Strukturähnlichkeit zu der Rel/NF- κ B-Transkriptionsfaktor-Familie auf^{164,167,258}. Zusätzlich ist bekannt, dass sowohl NFATc1 als auch NF- κ B bei Zielgenen, wie *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *INF γ* und *NFATc1* selbst, die Genexpression durch Bindung an gemeinsame DNA Bindemotive in den Promoter Regionen induzieren können^{210,259-262}. Eine synergistische Aktivität beider Transkriptionsfaktoren erlaubt möglicherweise eine Signalintegration, die die nukleäre Präsenz beider Transkriptionsfaktoren für die Induktion gewisser Gene erfordert. Eine solche Kooperation von NFATc1 und NF- κ B ist auch bei DLBCL bereits für die Genexpression von *CD40LG*, das für CD154 codiert, und *TNFSF13B* (BLYS) diskutiert worden^{263,264}. Beide Proteine sind in einer Signalweiterleitung involviert, die unter anderem in der Aktivierung von NF- κ B resultiert, welches ihre eigene Expression wiederum fördert^{263,264}. Es wurde vermutet, dass die kontinuierliche Expression von CD154 bzw. BLYS eine konstitutive Aktivierung sowohl von NF- κ B als auch von NFATc1 erfordert und eine wichtige

Rolle für die Proliferation und das Überleben maligner B-Zellen, unter anderem bei DLBCL, übernimmt²⁶³. Allerdings herrschen Unstimmigkeiten darüber, ob NFATc1 und die untersuchten NF- κ B-Familienmitglieder für eine DNA-Bindung Protein-Protein-Interaktion eingehen oder lediglich gesondert an κ B/NFAT-Bindemotive im gleichen Promoter binden müssen^{257,264}.

Der hier beobachtete Effekt der shRNA-vermittelten Herunterregulation von NFATc1 oder Beendigung seiner konstitutiven Aktivierung (mittels CsA) beruht möglicherweise ebenfalls auf der eingeschränkten Genexpression NF- κ B-treibender bzw. -regulierender Gene, mit einer toxischen Konsequenz für NF- κ B/NFATc1-abhängige ABC DLBCL. Im Einklang mit der genannten Literatur liefert die vorliegende Arbeit Hinweise darauf, dass NFATc1 entweder selbst oder durch Expression entsprechender Faktoren einen signifikanten Beitrag zu der onkogenen Aktivierung von NF- κ B und der (Ko-)Expression bekannter NF- κ B-Zielgene bei DLBCL leistet. Diese Erkenntnis bietet einen neuen möglichen Ansatzpunkt für die Therapie der NF- κ B/NFATc1-abhängigen ABC DLBCL. Jedoch bleibt an dieser Stelle die Frage, weshalb lediglich zwei der fünf untersuchten NF- κ B-abhängigen Zelllinien auch von NFATc1 abhängen, was in weiterführenden Arbeiten geklärt werden sollte.

Zusätzlich zu den bereits genannten Hinweisen auf eine Reduktion der NF- κ B-Aktivierung nach shRNA-vermittelter NFATc1-Herunterregulation wurde mittels Western Blot eine Abnahme an p-STAT3 detektiert (Abbildung 3.22). In früheren Untersuchungen konnte bei zwei ABC DLBCL Zelllinien (OCI-Ly3 und OCI-Ly10) eine Aktivierung der JAK (*Janus kinase*)-vermittelten STAT3 Phosphorylierung beobachtet werden, die durch die NF- κ B-getriebene Expression der autokrinen Faktoren IL-6 und IL-10 induziert wurde¹⁰⁷. Phosphoryliertes STAT3 wird nach Dimerisierung und nukleärem Import transkriptionell aktiv und kann durch Expression von u.a. anti-apoptischen und pro-proliferativen Zielgenen zu der malignen Transformation einer Zelle beitragen²⁶⁵⁻²⁶⁷. Die STAT3-Phosphorylierung konnte Dosis-abhängig durch Behandlung mit einem JAK Inhibitor reduziert werden und war toxisch für die beiden IL-6/IL-10-exprimierenden Zelllinien¹⁰⁷. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduktion von p-STAT3 nach Herunterregulation von NFATc1 bei den sowohl NFATc1- als auch NF- κ B-abhängigen Zelllinien HBL-1 und TMD8 beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass die konstitutive Aktivierung von NFATc1 neben bzw. zusammen mit NF- κ B ebenfalls zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 beiträgt, indem NFATc1 womöglich die Expression von autokrinen Faktoren übernimmt, die den JAK/STAT-Signalweg aktivieren. Unterstützt wird diese These durch eine Arbeit aus dem Labor von Neil A. Clipstone, wonach die ektopische Expression einer konstitutiv aktiven NFATc1-Variante (caNFATc1; Isoform A/1) die Zunahme an p-STAT3 nach sich zog²⁶⁸. Die Phosphorylierung von STAT3 wurde durch einen noch nicht identifizierten, autokrinen Wachstumsfaktor initiiert, den die Zellen in das

Kulturmedium absonderten²⁶⁸. Diese Wirkung hatte caNFATc1 nicht nur bei der murinen Präadipozyten-Zelllinie 3T3-Li. Auch bei der Pankreaskarzinom-Zelllinie PANC-1 und der Mamakarzinom-Zelllinie MCF-10A konnte ein deutlicher pSTAT3-Anstieg nach caNFATc1-Expression oder Behandlung mit Medium, in dem zuvor caNFATc1-transduzierte Zellen kultiviert worden sind, verzeichnet werden²⁶⁸. Einen weiteren Hinweis auf die NFATc1-vermittelte Aktivierung von STAT3 liefert eine erst kürzlich publizierte Arbeit, in der gezeigt wurde, dass die induzierte Expression von NFATc1 ausreicht, um die Tumorgenese von Haut- und Eierstockkrebs bei Nacktmäusen zu initiieren und sie voranzutreiben²⁶⁹. Weiterhin wurde gezeigt, dass die STAT3-Aktivierung bei NFATc1-positiven und NFATc1-negativen Zellen in der näheren Umgebung signifikant gesteigert war²⁶⁹. Somit konnte die NFATc1-vermittelte Expression von onkogenen Proteinen, u.a. von STAT3-aktivierenden Faktoren, wie IL-6, eine pro-mitogene Mikroumgebung etablieren, die die Tumorgenese ermöglichte und benachbarte Zellen involvierte²⁶⁹. Die autonome Versorgung mit Wachstums-, Proliferations- und Überlebenssignalen ist ein weiteres Kennzeichen von Krebs und unterstreicht ein mögliches onkogenes Potential von NFATc1⁴⁵. Es scheint durchaus möglich, dass der konstitutiv aktive Transkriptionsfaktor NFATc1 die Expression solcher Faktoren auch bei NFATc1-abhängigen DLBCL reguliert und somit eine signifikante, onkogene Rolle bei der Pathogenese der Lymphome einnimmt.

4.6 Regulation der MHC Klasse II-Molekülexpression durch NFATc1 – mögliche Rolle im *Immune Escape*

MHC Klasse II-Moleküle (auch HLA-D Antigene genannt) sind Proteinkomplexe, die auf der Oberfläche von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, wie z.B. Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten²⁷⁰. Auf der B-Zell-Oberfläche präsentieren MHC Klasse II-Moleküle ausschließlich CD4-positiven Helfer-T-Zellen extrazelluläre Pathogene, die zuvor über den BZR gebunden, internalisiert und durch Proteasen in präsentierbare Peptide gespalten wurden^{271,272}. Die Interaktion mit CD4-positiven Helfer-T-Zellen ermöglicht der B-Zelle daraufhin z.B. den Eintritt in die Keimzentrumsreaktion. Darüber hinaus können CD4-positive Helfer-T-Zellen weitere Maßnahmen gegen das Pathogen induzieren, wie die Aktivierung von phagozytotischen Zellen und einer zytotoxischen Entzündungsreaktion, vermittelt durch CD8-positive T-Zellen. Da erst die MHC Klasse II-vermittelte Antigen-Präsentation durch B-Zellen eine adäquate Immunantwort initiieren kann, ist die Expression dieser Gruppe von Oberflächenproteinen von zentraler Bedeutung für das adaptive Immunsystem²²³.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine signifikante Hochregulation der MHC Klasse II-Moleküle nach Herunterregulation oder Inaktivierung von NFATc1 bei HBL-1 beobachtet werden, die eine mögliche Rolle von NFATc1 bei der MHC Klasse II-Expressionsregulation suggerierte. Dieser Effekt konnte durch spezifische Herunterregulation von NFATc1 mit der shRNA #2, durch die simultane Expression der shRNA #1 und shRNA #2 und durch pharmakologische Inhibierung der NFATc1-aktivierenden Phosphatase Calcineurin induziert werden (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Die Hochregulation aller Gene in einer MHC Klasse II-Signatur wurde auch mittels GSEA nach Expression der *NFATc1* shRNA #2 beobachtet (Abbildung 3.23 B). Dies deutete darauf hin, dass es sich hierbei um einen tatsächlichen und nicht nur zufällig gemessenen Effekt handelte, da die meisten MHC Klasse II-Gene auf einem Locus auf Chromosom 6 codiert werden und eine Veränderung in der Genexpression gleich alle diese Familienmitglieder der MHC Klasse II betrifft²²². Eine solche korrelierende Regulation der MHC Klasse II-Genexpression war auch nach Herunterregulation von NFATc1 mit der shRNA #1 zu beobachten. Laut GSEA handelte es sich hierbei jedoch um eine Reduktion der MHC Klasse II-Molekülexpression (Abbildung 3.23 A), welche auf Proteinebene durch durchflusszytometrische HLA-DR-Messung allerdings nicht nachzuweisen war (Abbildung 3.24). Es blieb unklar, weshalb nach Expression der shRNA #1 für 96h eine Reduktion der MHC Klasse II-Moleküle durchflusszytometrisch nicht gemessen werden konnte, da die (im Mausmodell gemessene) Halbwertszeit dieser Proteinkomplexe bei unter 24h liegt und somit nach 96h detektierbar gewesen sein müsste²⁷³. Möglicherweise werden diese Gene bei HBL-1 zwar transkribiert, jedoch wird die mRNA nicht translatiert. Damit wäre zu erklären, weshalb ein Rückgang auf Transkript- jedoch nicht auf Proteinebene gemessen werden konnte. Um diese Frage beantworten zu können, müsste sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene untersucht werden, ob die MHC Klasse II-Genexpression mit der Proteinexpression bei HBL-1 korreliert bzw. wie der Expressionsstatus der restlichen DLBCL Zelllinien aussieht. Des Weiteren ist es notwendig, Genexpressionsanalysen nach Herunterregulation aller zehn *NFATc1* Transkriptvarianten gleichzeitig (mit der shRNA #1 und #2 zusammen) durchzuführen, um den Effekt einer vollständigen *NFATc1*-Stilllegung zu studieren. Mit Hilfe dieser Daten, sollte erstens geklärt werden können, inwieweit sich die Veränderungen in der Genexpression nach shRNA #1 oder #2-Expression verstärken (u.a. die der MHC Klasse II Gene) bzw. aufhebt.

Obwohl beide shRNAs teilweise die gleichen *NFATc1* Transkriptvarianten herunterregulierten, zum Teil aber auch verschiedene Isoformen abdeckten, korrelierte die Expression von NFATc1-Zielgenen in beiden Array-Datensätzen (Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20). Eine Ausnahme bestand, wie bereits genannt, in der Expression der MHC Klasse II-Moleküle. Diese beobachtete Diskrepanz beruhte vermutlich auf den verschiedenen *NFATc1* Transkriptvarianten, die durch die beiden *NFATc1* shRNAs

unterschiedlich abgedeckt werden (Tabelle 3.2). Die gleichzeitige shRNA-vermittelte Herunterregulation aller zehn NFATc1 Isoformen jedoch konnte die Oberflächenpräsentation von HLA-RD, verglichen mit der shRNA #2-Expression alleine, weiterhin signifikant steigern (Abbildung 3.24). Dies legt nahe, dass es unter den unterschiedlichen NFATc1 Proteinen sowohl Positiv- als auch Negativregulatoren der MHC Klasse II-Molekülgenexpression gibt. Eine divergierende Funktion der NFATc1 Isoformen ist bereits 1999 zum ersten Mal diskutiert worden, als erst drei der heute zehn bekannten Isoformen beschrieben waren¹⁴⁷. In der Arbeitsgruppe von Anjana Rao konnte in T-Lymphozyten gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne von NFATc1 C/3 die transkriptionelle Aktivität des Proteins reguliert, während die der Isoform B/2 eher die Funktion eines transkriptionellen Repressors übernahm¹⁴⁷. Darüber hinaus wurde NFATc1 A/1 als die Isoform mit der stärksten transkriptionellen Aktivität am IL-2 und IL-4 Promoter-Konstrukt identifiziert, obwohl diese Isoform eine sehr kurze C-terminale Domäne besitzt und ihr somit im Vergleich zu den Isoformen B/2 und C/3 keine zweite TAD zur Verfügung steht¹⁴⁷. Zudem konnte eine aktuellere Studie demonstrieren, dass die Expression dieser *NFATc1 A/1* Isoform nach Aktivierung des BZR-Signalwegs initiiert wird²⁴⁰. Die mRNAs der Isoform *NFATc1 A/1* sowie die der Isoform *I/9* wurden durch die *NFATc1* shRNA #1 nicht herunterreguliert (Tabelle 3.2) und vermitteln möglicherweise die Unterdrückung der HLA-DR Molekülexpression oder die Expression eines Negativregulators dieses Gens. Es wäre daher interessant zu ermitteln, welche Isoform(en) genau die Hoch- bzw. Herunterregulation der MHC Klasse II-Molekülexpression induziert. Hierfür wäre die Klonierung aller zehn *NFATc1* Isoformen und anschließende exogene Expression jeweils jeder einzelnen cDNA bei gleichzeitiger Herunterregulation aller zehn endogenen *NFATc1* Transkripte (*Rescue*-Experiment) denkbar.

Dadurch, dass die Behandlung von HBL-1 Zellen mit CsA einen ähnlichen Effekt auf die Zellen hatte, wie die NFATc1-Herunterregulation mit der shRNA #2 (Abbildung 3.25), konnte bestätigt werden, dass es sich hierbei um einen NFATc1-vermittelten Effekt handelt. Die beiden kürzesten NFATc1 Proteine (Isoform D/4 und J/10; Tabelle 3.2) können weder durch CsA-Behandlung noch durch die Expression der shRNA #2 beeinflusst werden. Ihnen fehlt die regulatorische NHR Domäne, über deren Phosphorylierung die subzelluläre Lokalisation von NFATc1 reguliert wird. Die shRNA #2 bindet im Exon 3, das für die NHR codiert (Abbildung 3.6), weshalb zu erwarten war, dass die Behandlung mit CsA einen ähnlichen Effekt haben wird, wie die Herunterregulation von NFATc1 mit der shRNA #2. Die Tatsache, dass die Beendigung der NFATc1-vermittelten Genexpression über zwei verschiedene Mechanismen erfolgte und dennoch den gleichen Effekt auf die MHC Klasse II-Molekülexpression in beiden Ansätzen hatte, unterstreicht die Relevanz, die NFATc1 in der Genregulation dieser Familie einnimmt. Jedoch bleibt die Frage offen, über welchen Mechanismus NFATc1 die MHC Klasse II-Expression hemmt. In weiterführenden Arbeiten

müsste daher geklärt werden, inwieweit NFATc1 die Expression der bekannten MHC Klasse II-Expressionsregulatoren CIITA (*class II, major histocompatibility complex, transactivator*), RFX (*regulatory factor X*) 1-5, RFXANK (*RFX-associated ankyrin containing protein*) und RFXAP (*RFX-associated protein*) beeinflusst, deren Aktivität teils unentbehrlich für die Induktion der MHC Klasse II-Molekülexpression ist^{223,274-278}.

Die Bedeutung einer detektierbaren MHC Klasse II-Molekülexpression für das Überleben von DLBCL Patienten ist bereits mehrfach dokumentiert worden²⁷⁹. Hierbei korrelierte die messbare HLA-DR bzw. MHC Klasse II-Molekülexpression bei DLBCL Patientenbiopsien mit einem signifikant verlängerten bzw. besserem Überleben im Vergleich zu Patienten, die eine solche Expression nicht aufweisen konnten^{57,229,279}. Als mögliche Erklärung für die schlechtere Prognose durch Herunterregulation der MHC Klasse II-Moleküle auf der DLBCL-Zelloberfläche wurde das Verhindern einer Immunreaktion gegen die malignen Zellen diskutiert²⁸⁰. Dieser „*Immune Escape*“ (Immunitätsentkommen) -genannte Mechanismus wird häufig bei Tumorzellen beobachtet und ermöglicht der transformierten Zellen eine Senkung ihrer Immunogenität, so dass sie durch das Immunsystem nicht als entartete Zelle erkannt und eliminiert wird^{227,228,281}. Das Editieren des Immunsystems befähigt die Tumorzelle dazu, die Induktion von Apoptose oder Seneszenz zu verhindern und verschafft ihr somit einen Überlebensvorteil. Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, der zu den Kennzeichen von Tumoren zählt⁴⁵. Dass die herunterregulierte MHC Klasse II-Oberflächenexpression tatsächlich zu einem *Immune Escape* bei einigen DLBCL verhilft wird dadurch bekräftigt, dass bei solchen Biopsien eine signifikant geringere Infiltration durch CD8-positive T-Zellen zu finden ist im Vergleich zu MHC Klasse II-positiven Fällen²²⁹. Die Deletion, Mutation oder Herunterregulation der MHC Gene zählt zu den bekannten Mechanismen, die einen *Immune Escape* unterstützen, jedoch konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden, welcher davon bei DLBCL seinen Einsatz findet^{227,229,282-285}. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten suggerieren eine Beteiligung von NFATc1 an der Hemmung der MHC Klasse II-Molekülexpression. Eine detektierbar gesteigerte MHC Klasse II-Molekülexpression findet erst dann statt, wenn NFATc1 herunterreguliert oder nicht länger aktiviert wird. Ein Erkennen der Lymphomzellen durch die immunologische Umgebung wird daher möglicherweise vermieden, solange NFATc1 (oder ein NFATc1-regulierter Faktor) die Expression dieser Oberflächenproteine unterdrückt. Die CsA-vermittelte Blockade der NFATc1-Aktivierung hatte ebenfalls die Induktion der MHC Klasse II-Molekülexpression zufolge, was eine mögliche NFATc1-getriebene Expression der MHC Klasse II-Moleküle oder ihrer Regulatoren unterstützt (Abbildung 3.25). In diesem Zusammenhang sollte ermittelt werden, ob die kürzlich publizierte Beobachtung einer signifikant erhöhten MHC Klasse II-Molekülexpression bei GCB DLBCL im Vergleich zu ABC DLBCL Biopsien auch im Zellkulturmodell gemacht werden kann und darüber hinaus mit der nukleären Lokalisation von NFATc1 bei ABC DLBCL

Zelllinien korreliert²⁸⁵. Ko-Kultur-Experimente von MHC Klasse II-defizienten DLBCL Zelllinien zusammen mit isolierten T-Zellen verschiedener Spender könnten weiterhin Aufschluss darüber geben, ob eine schnellere bzw. bessere Aktivierung und Expansion CD8-positiver T-Zellen beobachtet werden kann, sobald NFATc1 bei diesen DLBCL Zelllinien shRNA-vermittelt herunterreguliert wird. Sofern sich diese Annahmen durch weitere Experimente bestätigen lassen, könnte die spezifische Inaktivierung von NFATc1 eine neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung von DLBCL Fällen bieten, deren MHC Klasse II-Molekülexpression eingeschränkt ist. Zwar sind weitere umfassende Untersuchungen erforderlich, um diese Hypothese zu prüfen, jedoch könnte die Aussicht auf eine einfache Ermittlung des MHC Klasse II Status durch histologische HLA-DR- und NFATc1-Färbung der DLBCL-Biopsien und der dadurch ermöglichten, verbesserten Therapie solcher MHC Klasse II-defizienter Lymphome eine vielversprechende Alternative bedeuten.

4.7 Fazit und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Daten weisen darauf hin, dass NFATc1 eine unterstützende Rolle bei der Pathogenese von DLBCL, insbesondere bei der ABC DLBCL Subgruppe, einnimmt. Bei zwei der neun untersuchten DLBCL Zelllinien wurde eine NFATc1-Abhängigkeit beobachtet, die sich durch eine selektive Toxizität für diese Zelllinien nach Herunterregulation oder Inaktivierung von NFATc1 präsentierte. Die NFATc1-Abhängigkeit beruhte auf der konstitutiven Aktivierung von NFATc1 und ging mit der Expression von Wachstumsfaktoren sowie Überlebenssignalen, wie z.B. *BCL2L1*, einher. Zudem konnte die Aktivierung weiterer pro-proliferativer und Überlebens-fördernder Signalwege, wie die der NF- κ B-, PI3K/AKT- und JAK/STAT-Signalwege verzeichnet werden, die ebenfalls nach NFATc1-Herunterregulation negativ beeinflusst wurden. Gleichzeitig wurde NFATc1 ein Mitwirken in der Expression anti-apoptotischer Faktoren nachgewiesen. Weiterhin konnte die transkriptionelle Aktivität von NFATc1 mit einer unterdrückten MHC Klasse II-Genexpression in Verbindung gebracht werden, die erst durch Inaktivierung oder Herunterregulation von NFATc1 induziert werden konnte. Somit übernimmt NFATc1 möglicherweise eine Rolle im *Immune Escape*, das ein Erkennen und Eliminieren der Lymphomzellen durch das Immunsystem unterbindet. Folglich scheint sich der Transkriptionsfaktor NFATc1 mit einer konstitutiv aktivierten Genexpression an mindestens drei Prozessen zu beteiligen, die kennzeichnend für Tumore sind⁴⁵: Erstens einer fortwährend proliferativen Signalweiterleitung, zweitens an der Umgehung des programmierten Zelltods und drittens am Ausweichen vor einer Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem. Somit präsentiert sich das konstitutiv exprimierte und aktivierte NFATc1 als putatives Onkogen,

dessen Inaktivierung bei der Therapie NFATc1-abhängiger DLBCL einen interessanten neuen Angriffspunkt darstellen könnte.

Weiterführende Arbeiten müssten in zwei Themenkomplexe aufgeteilt werden. Zum einen müssten die molekularen Grundlagen der NFATc1-Abhängigkeit bei DLBCL tiefergehend untersucht werden, da noch viele Fragen zu der Expression, Aktivierung und Funktion von NFATc1 bei DLBCL ungeklärt geblieben sind. Diese Untersuchungen sollten die unterschiedlich exprimierten NFATc1-Isoformen und ihre Funktion bei den DLBCL umfassen sowie die Signalwege ermitteln, die eine NFATc1-Expression und -Aktivierung fördern. Ob alle NFATc1-abhängigen DLBCL Zelllinien die gleichen Signalwege nutzen, ließe sich durch Genexpressionsanalysen und anschließende Validierung dieser Zelllinien auf Transkript- und Proteinebene nach Herunterregulation von NFATc1 ermitteln. Zum anderen sollten zukünftige Arbeiten eine Therapie der NFATc1-abhängigen DLBCL etablieren, die möglicherweise die Standardchemotherapie R-CHOP mit der NFATc1-Inaktivierung kombiniert. Hierfür könnten zunächst Xenograft-Mausmodelle mit Kontroll- bzw. *NFATc1* shRNA-transduzierten HBL-1 Zellen untersucht werden. Es wäre aufschlussreich zu erfahren, ob die shRNA-vermittelte Herunterregulation von NFATc1 bei den transplantierten Zellen ein langsames Tumorwachstum bzw. eine Reduktion der HBL-1 Zellen verursacht oder eine verstärkte Expansion von CD8-positiven T-Zellen zu beobachten ist. Zweifellos bietet die vorliegende Arbeit eine Grundlage für weitere wissenschaftliche Studien, mit denen der diagnostische sowie therapeutische Nutzen von NFATc1 bei NFATc1-abhängigen DLBCL weiterhin ausgearbeitet werden sollte.

5. Zusammenfassung

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) sind aggressive Neoplasien reifer B-Zellen und repräsentieren die häufigsten neu diagnostizierten Lymphome. Genexpressionsanalysen gelang die Differenzierung der heterogenen DLBCL in mindestens zwei vorherrschende molekulare Subtypen, mit einem Expressionsprofil ähnlich dem von Keimzentrums-B-Zellen (GCB DLBCL) oder aktivierten Post-Keimzentrums-B-Zellen (ABC DLBCL). Ein charakteristisches Merkmal der ABC DLBCL ist ihre Abhängigkeit von der konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs. Zudem tragen ca. 40% der ABC DLBCL Fälle einen Hinzugewinn des Chromosomenabschnitts 18q, auf dem u.a. der Transkriptionsfaktor NFATc1 (*Nuclear Factor of Activated T cells c1*) codiert und dadurch stärker exprimiert wird. Die gesteigerte Expression und Aktivität von NFATc1 konnte bereits mit der Pathogenese verschiedener Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit am Zellkulturmodell untersucht werden, ob NFATc1 auch an der molekularen Pathogenese der DLBCL beteiligt ist.

Bei zwei ABC DLBCL Zelllinien (HBL-1 und TMD8) konnte eine konstitutive Aktivierung von NFATc1 beobachtet werden, die wahrscheinlich durch den chronisch aktiven B-Zell-Rezeptor-Signalweg aufrechterhalten wird. Sowohl die pharmakologische Inhibierung der NFATc1-aktivierenden Phosphatase Calcineurin als auch die shRNA-vermittelte Herunterregulation von NFATc1 hatten auf beide Zelllinien einen selektiven toxischen Effekt. Dieser beruhte auf einer Induktion der Apoptose und bekräftigte somit die Abhängigkeit dieser DLBCL Zelllinien von der NFATc1-Aktivität. Genexpressionsanalysen nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von NFATc1 ermöglichten die Identifikation pro-proliferativer und anti-apoptotischer Faktoren, deren Expression durch NFATc1 reguliert wird. Darüber hinaus scheint NFATc1 an der Signalweiterleitung über den NF- κ B-Signalweg beteiligt zu sein und moduliert die Expression bekannter NF- κ B-Zielgene. Dies deutet auf eine synergistische Funktion beider Transkriptionsfaktoren bei der Pathogenese der ABC DLBCL. Weiterhin wurde die Phosphorylierung von STAT3, die einigen ABC DLBCL Zelllinien die Eigenversorgung mit autokrinen Wachstumsfaktoren ermöglicht, nach Herunterregulation von NFATc1 inhibiert. Schließlich konnte eine unterdrückte Expression von MHC Klasse II-Molekülen durch NFATc1 beobachtet werden. Sowohl die Herunterregulation von NFATc1 als auch die pharmakologische Inhibierung von Calcineurin mittels Cyclosporin A induzierten die MHC Klasse II-Molekülexpression, was eine Beteiligung von NFATc1 am Entfliehen vor der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem (*Immune Escape*) suggeriert. Zusammenfassend weisen die hier gewonnenen Erkenntnisse darauf hin, dass NFATc1 eine unterstützende bzw. onkogene Rolle bei der molekularen Pathogenese einer Subgruppe der DLBCL einnimmt, die therapeutisch genutzt werden könnte.

6. Summary

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a mature B-cell neoplasm and represents the most frequent lymphoma subtype in adults. Gene expression profiling enabled the differentiation of the heterogeneous diagnostic category into two predominant DLBCL subgroups that arise from distinct stages of B-cell differentiation: the germinal center B-cell-like (GCB) and the activated B-cell-like (ABC) DLBCL. ABC DLBCLs are characterized by a constitutively active NF- κ B signaling pathway. Furthermore, approximately 40% of all ABC DLBCL cases harbor a gain or amplification of the 18q chromosome arm, which causes an enhanced expression of 18q encoded genes like the NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T cells c1) transcription factor. The increased expression and activation of NFATc1 were shown to be implicated in the pathogenesis of different types of cancer. Therefore, the aim of this study was to investigate whether NFATc1 is also involved in the molecular pathogenesis of DLBCL using a DLBCL cell culture model.

NFATc1 was constitutively active in two ABC DLBCL cell lines (HBL-1 and TMD8) presumably due to the chronic activation of the B-cell-receptor signaling pathway in these cell lines. Both the pharmacological inhibition of the NFATc1-activating phosphatase Calcineurin as well as the shRNA-mediated knockdown of NFATc1 had a selective toxic effect for HBL-1 and TMD8. The toxicity resulted from an increased induction of apoptosis and underlined the addiction of the cell lines to the transcriptionally active NFATc1 protein. Using gene expression profiling upon shRNA-mediated NFATc1 knockdown, pro-proliferative and anti-apoptotic factors were identified to be transcriptionally regulated by NFATc1. Furthermore, NFATc1 was shown to induce the NF- κ B signaling pathway and the expression of NF- κ B target genes suggesting a synergistic role for both transcription factors in the pathogenesis of ABC DLBCLs. NFATc1 knockdown resulted in a reduced phosphorylation of STAT3 that is needed for the autonomous supply of autocrine growth and survival factors in some ABC DLBCLs. Finally, NFATc1 was shown to suppress the MHC class II-molecule expression in the ABC DLBCL cell line HBL-1. The knockdown of NFATc1 as well as the inhibition of Calcineurin using Cyclosporin A released the expression of MHC class II-molecules indicating an involvement of NFATc1 in the circumvention of the identification and elimination of the malignant cell by the immune system (immune escape). Taking all into account, the herein made observations suggest a supporting, in particular, an oncogenic role of NFATc1 in the pathogenesis of a subgroup of DLBCLs that might be targeted therapeutically.

7. Literaturverzeichnis

1. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *The New England journal of medicine* 1999;341:1520-9.
2. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005;5:251-62.
3. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nature reviews Immunology* 2004;4:35-45.
4. Loukas M, Bellary SS, Kuklinski M, et al. The lymphatic system: a historical perspective. *Clinical anatomy (New York, NY)* 2011;24:807-16.
5. Litman GW, Rast JP, Fugmann SD. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nature reviews Immunology* 2010;10:543-53.
6. Johnson K, Shapiro-Shelef M, Tunyaplin C, Calame K. Regulatory events in early and late B-cell differentiation. *Molecular immunology* 2005;42:749-61.
7. Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annual review of immunology* 2004;22:55-79.
8. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999;401:556-62.
9. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology* 2007;8:463-70.
10. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381:751-8.
11. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annual review of immunology* 2000;18:495-527.
12. Schatz DG, Swanson PC. V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annual review of genetics* 2011;45:167-202.
13. Shokat KM, Goodnow CC. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 1995;375:334-8.
14. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews Immunology* 2005;5:230-42.
15. MacLennan IC. Germinal centers. *Annual review of immunology* 1994;12:117-39.
16. Nieuwenhuis P, Opstelten D. Functional anatomy of germinal centers. *The American journal of anatomy* 1984;170:421-35.
17. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:2639-44.
18. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000;13:199-212.
19. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000;102:553-63.

20. Honjo T, Muramatsu M, Fagarasan S. AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* 2004;20:659-68.
21. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annual review of immunology* 1996;14:441-57.
22. Luo Z, Ronai D, Scharff MD. The role of activation-induced cytidine deaminase in antibody diversification, immunodeficiency, and B-cell malignancies. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004;114:726-35; quiz 36.
23. Martin A, Scharff MD. AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nature reviews Immunology* 2002;2:605-14.
24. Bishop GA, Hostager BS. Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. *Immunologic research* 2001;24:97-109.
25. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological reviews* 2009;229:152-72.
26. Linterman MA, Beaton L, Yu D, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *The Journal of experimental medicine* 2010;207:353-63.
27. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature reviews Immunology* 2008;8:22-33.
28. Phan TG, Paus D, Chan TD, et al. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *The Journal of experimental medicine* 2006;203:2419-24.
29. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nature reviews Immunology* 2012;12:517-31.
30. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *The New England journal of medicine* 2010;362:1417-29.
31. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 1994;77:297-306.
32. Tunyaplin C, Shaffer AL, Angelin-Duclos CD, Yu X, Staudt LM, Calame KL. Direct Repression of prdm1 by Bcl-6 Inhibits Plasmacytic Differentiation. *The Journal of Immunology* 2004;173:1158-65.
33. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004;432:635-9.
34. Saito M, Novak U, Piovan E, et al. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:11294-9.
35. Kallies A, Hasbold J, Fairfax K, et al. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* 2007;26:555-66.
36. Basso K, Klein U, Niu H, et al. Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood* 2004;104:4088-96.
37. Berberich I, Shu GL, Clark EA. Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1994;153:4357-66.

38. Saito M, Gao J, Basso K, et al. A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer cell* 2007;12:280-92.
39. Klein U, Casola S, Cattoretti G, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology* 2006;7:773-82.
40. Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Molecular and cellular biology* 2002;22:4771-80.
41. Sciammas R, Davis MM. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004;172:5427-40.
42. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002;17:51-62.
43. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 2004;21:81-93.
44. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
45. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144:646-74.
46. Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, Stein H. Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. *Blood* 1994;84:403-7.
47. Stevenson F, Sahota S, Zhu D, et al. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunological reviews* 1998;162:247-59.
48. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985;41:899-906.
49. Bishop PC, Rao VK, Wilson WH. Burkitt's lymphoma: molecular pathogenesis and treatment. *Cancer investigation* 2000;18:574-83.
50. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2011;2011:506-14.
51. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *ASH Education Program Book* 2009;2009:523-31.
52. Nogai H, Dorken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:1803-11.
53. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997;89:3909-18.
54. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 1998;9:717-20.

-
55. Menon MP, Pittaluga S, Jaffe ES. The histological and biological spectrum of diffuse large B-cell lymphoma in the World Health Organization classification. *Cancer journal* 2012;18:411-20.
56. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *The New England journal of medicine* 2008;359:2313-23.
57. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* 2002;346:1937-47.
58. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
59. Shaffer AL, Rosenwald A, Hurt EM, et al. Signatures of the immune response. *Immunity* 2001;15:375-85.
60. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine* 1993;328:1002-6.
61. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* 2002;346:235-42.
62. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:4117-26.
63. Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Seminars in diagnostic pathology* 2011;28:167-77.
64. Frick M, Dorken B, Lenz G. New insights into the biology of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Best practice & research Clinical haematology* 2012;25:3-12.
65. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *The American journal of pathology* 2004;165:159-66.
66. Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:13520-5.
67. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007;21:2332-43.
68. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, et al. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:12420-5.
69. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 2006;203:311-7.
70. Wenzel SS, Grau M, Mavis C, et al. MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2013;27:1381-90.

-
71. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010;463:88-92.
72. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008;319:1676-9.
73. Nogai H, Wenzel SS, Hailfinger S, et al. IkappaB-zeta controls the constitutive NF-kappaB target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood* 2013;122:2242-50.
74. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997;276:589-92.
75. Phan RT, Saito M, Basso K, Niu H, Dalla-Favera R. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nature immunology* 2005;6:1054-60.
76. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature immunology* 2008;9:405-14.
77. Shaffer AL, 3rd, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annual review of immunology* 2012;30:565-610.
78. Tam W, Gomez M, Chadburn A, Lee JW, Chan WC, Knowles DM. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2006;107:4090-100.
79. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *The Journal of experimental medicine* 2001;194:1861-74.
80. Lam LT, Davis RE, Pierce J, et al. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:28-40.
81. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009;1.
82. Ghosh G, Wang VY-F, Huang D-B, Fusco A. NF- κ B regulation: lessons from structures. *Immunological reviews* 2012;246:36-58.
83. Reth M. Antigen Receptors on B Lymphocytes. *Annual review of immunology* 1992;10:97-121.
84. Teh YM, Neuberger MS. The immunoglobulin (Ig)alpha and Igbeta cytoplasmic domains are independently sufficient to signal B cell maturation and activation in transgenic mice. *The Journal of experimental medicine* 1997;185:1753-8.
85. Schmitz R, Baumann G, Gram H. Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display. *Journal of molecular biology* 1996;260:664-77.
86. Tolar P, Sohn HW, Pierce SK. The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer. *Nature immunology* 2005;6:1168-76.
87. Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC. BLNK: a Central Linker Protein in B Cell Activation. *Immunity* 1998;9:93-103.

88. Imboden JB, Weiss A, Stobo JD. The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1985;134:663-5.
89. Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological reviews* 2000;80:1291-335.
90. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989;341:197-205.
91. Hikida M, Kurosaki T. Regulation of phospholipase C-gamma2 networks in B lymphocytes. *Advances in immunology* 2005;88:73-96.
92. Saijo K, Mecklenbrauker I, Santana A, Leitger M, Schmedt C, Tarakhovsky A. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *The Journal of experimental medicine* 2002;195:1647-52.
93. Bertin J, Wang L, Guo Y, et al. CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:11877-82.
94. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular cell* 2000;6:961-7.
95. Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nature reviews Immunology* 2004;4:348-59.
96. McCully RR, Pomerantz JL. The protein kinase C-responsive inhibitory domain of CARD11 functions in NF-kappaB activation to regulate the association of multiple signaling cofactors that differentially depend on Bcl10 and MALT1 for association. *Molecular and cellular biology* 2008;28:5668-86.
97. Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Molecular cell* 2004;14:289-301.
98. Noels H, van Loo G, Hagens S, et al. A Novel TRAF6 binding site in MALT1 defines distinct mechanisms of NF-kappaB activation by API2middle dotMALT1 fusions. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:10180-9.
99. Oeckinghaus A, Wegener E, Welteke V, et al. Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. *The EMBO journal* 2007;26:4634-45.
100. Xia ZP, Sun L, Chen X, et al. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 2009;461:114-9.
101. Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunological reviews* 2012;246:95-106.
102. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, et al. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Molecular cell* 2000;5:649-58.
103. Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, et al. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 2004;427:167-71.
104. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001;412:346-51.

-
105. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 1993;259:1912-5.
106. Ding BB, Yu JJ, Yu RY, et al. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2008;111:1515-23.
107. Lam LT, Wright G, Davis RE, et al. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008;111:3701-13.
108. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a000109.
109. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, et al. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 2006;441:106-10.
110. Pelzer C, Cabalzar K, Wolf A, Gonzalez M, Lenz G, Thome M. The protease activity of the paracaspase MALT1 is controlled by monoubiquitination. *Nature immunology* 2013;14:337-45.
111. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470:115-9.
112. Warner N, Nunez G. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2013;190:3-4.
113. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010;465:885-90.
114. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, et al. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nature immunology* 2008;9:684-91.
115. Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009;458:430-7.
116. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459:717-21.
117. Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 2009;459:712-6.
118. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 2004;430:694-9.
119. Mauro C, Pacifico F, Lavorgna A, et al. ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:18482-8.
120. Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature immunology* 2004;5:1052-60.
121. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2005;106:1770-7.
122. Mancini M, Toker A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2009;9:810-20.
123. Müller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature reviews Immunology* 2010;10:645-56.

-
124. Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, et al. Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. *Cancer research* 2012;72:1784-94.
125. Wang S, Kang X, Cao S, Cheng H, Wang D, Geng J. Calcineurin/NFATc1 pathway contributes to cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Digestive diseases and sciences* 2012;57:3184-8.
126. Seifert A, Rau S, Kullertz G, Fischer B, Santos AN. TCDD induces cell migration via NFATc1/ATX-signaling in MCF-7 cells. *Toxicology letters* 2009;184:26-32.
127. Corral RS, Iniguez MA, Duque J, Lopez-Perez R, Fresno M. Bombesin induces cyclooxygenase-2 expression through the activation of the nuclear factor of activated T cells and enhances cell migration in Caco-2 colon carcinoma cells. *Oncogene* 2007;26:958-69.
128. Oikawa T, Nakamura A, Onishi N, Yamada T, Matsuo K, Saya H. Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion. *Cancer research* 2013;73:5100-9.
129. Durand DB, Shaw JP, Bush MR, Replogle RE, Belagaje R, Crabtree GR. Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Molecular and cellular biology* 1988;8:1715-24.
130. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 1988;241:202-5.
131. Northrop JP, Ho SN, Chen L, et al. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 1994;369:497-502.
132. Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X. Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 1995;2:461-72.
133. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:7214-9.
134. Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* 2008;132:299-310.
135. Heit JJ, Apelqvist AA, Gu X, et al. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 2006;443:345-9.
136. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 1998;392:182-6.
137. Graef IA, Chen F, Crabtree GR. NFAT signaling in vertebrate development. *Current opinion in genetics & development* 2001;11:505-12.
138. Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 2001;14:13-20.
139. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, et al. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 1998;392:186-90.
140. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature medicine* 2005;11:880-5.
141. Schulz RA, Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Developmental biology* 2004;266:1-16.

-
142. Patra AK, Avots A, Zahedi RP, et al. An alternative NFAT-activation pathway mediated by IL-7 is critical for early thymocyte development. *Nature immunology* 2013;14:127-35.
143. Horsley V, Pavlath GK. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *The Journal of cell biology* 2002;156:771-4.
144. Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Molecular and cellular biology* 2008;28:7168-81.
145. Medyouf H, Alcalde H, Berthier C, et al. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature medicine* 2007;13:736-41.
146. Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature cell biology* 2002;4:540-4.
147. Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, et al. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999;162:7294-301.
148. Park J, Takeuchi A, Sharma S. Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:20914-21.
149. Rudolf R, Busch R, Patra AK, et al. Architecture and Expression of the Gene in Lymphocytes. *Frontiers in immunology* 2014;5:21.
150. Serfling E, Avots A, Klein-Hessling S, Rudolf R, Vaeth M, Berberich-Siebelt F. NFATc1/alphaA: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. *Cell communication and signaling : CCS* 2012;10:16.
151. Stroud JC, Lopez-Rodriguez C, Rao A, Chen L. Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nature structural biology* 2002;9:90-4.
152. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:2538-42.
153. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, et al. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Molecular cell* 2000;6:539-50.
154. Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, et al. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:11205-9.
155. Neal JW, Clipstone NA. Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:3666-73.
156. Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Molecular and cellular biology* 2004;24:4184-95.
157. Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes & development* 1997;11:824-34.
158. Graef IA, Gastier JM, Francke U, Crabtree GR. Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:5740-5.

-
159. Park S, Uesugi M, Verdine GL. A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:7130-5.
160. Klemm JD, Beals CR, Crabtree GR. Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Current biology* : CB 1997;7:638-44.
161. Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG, Rao A. A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:4138-45.
162. Nolan GP, Ghosh S, Liou HC, Tempst P, Baltimore D. DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell* 1991;64:961-9.
163. Zhou P, Sun LJ, Dotsch V, Wagner G, Verdine GL. Solution structure of the core NFATC1/DNA complex. *Cell* 1998;92:687-96.
164. Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 1998;392:42-8.
165. Luo C, Burgeon E, Rao A. Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. *The Journal of experimental medicine* 1996;184:141-7.
166. Chuvpilo S, Zimmer M, Kerstan A, et al. Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 1999;10:261-9.
167. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development* 2003;17:2205-32.
168. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature reviews Immunology* 2007;7:690-702.
169. Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual review of immunology* 2010;28:491-533.
170. Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium* 1986;7:1-12.
171. Putney JW. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunological reviews* 2009;231:10-22.
172. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315-21.
173. Maeda N, Kawasaki T, Nakade S, et al. Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:1109-16.
174. Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 2006;443:230-3.
175. Kawasaki T, Lange I, Feske S. A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. *Biochemical and biophysical research communications* 2009;385:49-54.
176. Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 2009;136:876-90.

177. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979;76:6270-3.
178. Hemenway C, Heitman J. Calcineurin. *Cell Biochem Biophys* 1999;30:115-51.
179. James P, Vorherr T, Carafoli E. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends in biochemical sciences* 1995;20:38-42.
180. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992;357:695-7.
181. McCaffrey PG, Perrino BA, Soderling TR, Rao A. NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:3747-52.
182. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual review of immunology* 1997;15:707-47.
183. Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 1992;356:801-4.
184. Northrop JP, Ullman KS, Crabtree GR. Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT) complex. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:2917-23.
185. Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, et al. The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *The EMBO journal* 1990;9:4425-33.
186. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 1997;275:1930-4.
187. Arron JR, Winslow MM, Polleri A, et al. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 2006;441:595-600.
188. Lee Y, Ha J, Kim HJ, et al. Negative feedback Inhibition of NFATc1 by DYRK1A regulates bone homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:33343-51.
189. Gwack Y, Sharma S, Nardone J, et al. A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 2006;441:646-50.
190. Loh C, Shaw KT, Carew J, et al. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:10884-91.
191. Crabtree GR, Olson EN. NFAT Signaling: Choreographing the Social Lives of Cells. *Cell* 2002;109:S67-S79.
192. Winslow MM, Pan M, Starbuck M, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Developmental cell* 2006;10:771-82.
193. Hock M, Vaeth M, Rudolf R, et al. NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2013;190:2345-53.
194. Neal JW, Clipstone NA. A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:17246-54.

-
195. Buchholz M, Schatz A, Wagner M, et al. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *The EMBO journal* 2006;25:3714-24.
196. Medyouf H, Ghysdael J. The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2008;7:297-303.
197. Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MK. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *Journal of virology* 1995;69:7430-6.
198. Bupp K, Roth MJ. Altering retroviral tropism using a random-display envelope library. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2002;5:329-35.
199. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 2003;198:851-62.
200. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-3.
201. van de Wetering M, Oving I, Muncan V, et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO reports* 2003;4:609-15.
202. Shaffer AL, Emre NC, Lamy L, et al. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* 2008;454:226-31.
203. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:15545-50.
204. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology* 2004;22:326-30.
205. O'Reilly L, Roth MJ. G541R within the 4070A TM protein regulates fusion in murine leukemia viruses. *Journal of virology* 2003;77:12011-21.
206. Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *Journal of virology* 1996;70:5701-5.
207. Ranuncolo SM, Pittaluga S, Evbuomwan MO, Jaffe ES, Lewis BA. Hodgkin lymphoma requires stabilized NIK and constitutive RelB expression for survival. *Blood* 2012;120:3756-63.
208. Venkataraman L, Francis DA, Wang Z, Liu J, Rothstein TL, Sen R. Cyclosporin-A sensitive induction of NF-AT in murine B cells. *Immunity* 1994;1:189-96.
209. Choi MS, Brines RD, Holman MJ, Klaus GG. Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4. *Immunity* 1994;1:179-87.
210. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, et al. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 2002;16:881-95.
211. Feske S, Giltzane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature immunology* 2001;2:316-24.
212. Sheridan CM, Heist EK, Beals CR, Crabtree GR, Gardner P. Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:48664-76.

-
213. Koenig A, Linhart T, Schlegelmann K, et al. NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 2010;138:1189-99 e1-2.
214. Flockhart RJ, Armstrong JL, Reynolds NJ, Lovat PE. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *British journal of cancer* 2009;101:1448-55.
215. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer cell* 2007;12:115-30.
216. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807-15.
217. Hailfinger S, Nogai H, Pelzer C, et al. Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF-kappaB activation in lymphocytes and lymphoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:14596-601.
218. Singh G, Singh SK, Konig A, et al. Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:27241-50.
219. Naylor TL, Tang H, Ratsch BA, et al. Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer research* 2011;71:2643-53.
220. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G. NF-kB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999;96:9136-41.
221. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews Immunology* 2008;8:607-18.
222. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* 1999;401:921-3.
223. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature reviews Immunology* 2005;5:793-806.
224. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature immunology* 2002;3:999-1005.
225. del Campo AB, Kyte JA, Carretero J, et al. Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014;134:102-13.
226. Paschen A, Mendez RM, Jimenez P, et al. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003;103:759-67.
227. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of leukocyte biology* 2002;71:907-20.
228. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 2002;3:991-8.
229. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient

survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 2004;103:4251-8.

230. Marafioti T, Pozzobon M, Hansmann ML, et al. The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *British journal of haematology* 2005;128:333-42.

231. Nilsson K, Pontén J. Classification and biological nature of established human hematopoietic cell lines. *International Journal of Cancer* 1975;15:321-41.

232. Drexler HG, Macleod RA. History of leukemia-lymphoma cell lines. *Human cell* 2010;23:75-82.

233. Kamb A. What's wrong with our cancer models? *Nature reviews Drug discovery* 2005;4:161-5.

234. Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature reviews Genetics* 2013;14:100-12.

235. Bea S, Zettl A, Wright G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005;106:3183-90.

236. Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Molecular cell* 1998;1:627-37.

237. Kaplan BL, Ouyang Y, Rockwell CE, Rao GK, Kaminski NE. 2-Arachidonoyl-glycerol suppresses interferon-gamma production in phorbol ester/ionomycin-activated mouse splenocytes independent of CB1 or CB2. *Journal of leukocyte biology* 2005;77:966-74.

238. Monticelli S, Solymar DC, Rao A. Role of NFAT proteins in IL13 gene transcription in mast cells. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:36210-8.

239. Mukerjee N, McGinnis KM, Gnegy ME, Wang KKW. Caspase-Mediated Calcineurin Activation Contributes to IL-2 Release during T Cell Activation. *Biochemical and biophysical research communications* 2001;285:1192-9.

240. Bhattacharyya S, Deb J, Patra AK, et al. NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. *The Journal of experimental medicine* 2011;208:823-39.

241. Pham LV, Tamayo AT, Li C, Bueso-Ramos C, Ford RJ. An epigenetic chromatin remodeling role for NFATc1 in transcriptional regulation of growth and survival genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2010;116:3899-906.

242. Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 2002;109:719-31.

243. Heissmeyer V, Rao A. E3 ligases in T cell anergy--turning immune responses into tolerance. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004;2004:pe29.

244. Mattila PK, Feest C, Depoil D, et al. The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling. *Immunity* 2013;38:461-74.

245. Treanor B, Depoil D, Gonzalez-Granja A, et al. The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor. *Immunity* 2010;32:187-99.

246. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010;463:485-92.

247. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:782-98.
248. Lee S, Kim JY, Kim YJ, et al. Nucleolar protein GLTSCR2 stabilizes p53 in response to ribosomal stresses. *Cell death and differentiation* 2012;19:1613-22.
249. Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001;359:1-16.
250. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-9.
251. Moon JB, Kim JH, Kim K, et al. Akt Induces Osteoclast Differentiation through Regulating the GSK3 β /NFATc1 Signaling Cascade. *The Journal of Immunology* 2012;188:163-9.
252. Nurieva RI, Chuvpilo S, Wieder ED, et al. A Costimulation-Initiated Signaling Pathway Regulates NFATc1 Transcription in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 2007;179:1096-103.
253. Li Q, Wang L, Tan W, et al. Identification of C1qTNF-related protein 4 as a potential cytokine that stimulates the STAT3 and NF-kappaB pathways and promotes cell survival in human cancer cells. *Cancer letters* 2011;308:203-14.
254. Colleran A, Collins PE, O'Carroll C, et al. Deubiquitination of NF-kappaB by Ubiquitin-Specific Protease-7 promotes transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:618-23.
255. Glasgow JN, Wood T, Perez-Polo JR. Identification and characterization of nuclear factor kappaB binding sites in the murine bcl-x promoter. *Journal of neurochemistry* 2000;75:1377-89.
256. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* 2009;27:693-733.
257. Muhammad K, Alrefai H, Marienfeld R, et al. NF-kappaB factors control the induction of NFATc1 in B lymphocytes. *European journal of immunology* 2014.
258. Aramburu J, Drews-Elger K, Estrada-Gelonch A, et al. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochemical pharmacology* 2006;72:1597-604.
259. Abbott KL, Loss JR, 2nd, Robida AM, Murphy TJ. Evidence that Galpha(q)-coupled receptor-induced interleukin-6 mRNA in vascular smooth muscle cells involves the nuclear factor of activated T cells. *Molecular pharmacology* 2000;58:946-53.
260. Li-Weber M, Giaisi M, Baumann S, Palfi K, Krammer PH. NF-kappa B synergizes with NF-AT and NF-IL6 in activation of the IL-4 gene in T cells. *European journal of immunology* 2004;34:1111-8.
261. Sica A, Dorman L, Viggiano V, et al. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:30412-20.
262. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995;7:333-42.
263. Fu L, Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo A, Yoshimura L, Ford RJ. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 2006;107:4540-8.

264. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lin-Lee YC, Ford RJ. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* 2005;106:3940-7.
265. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;98:295-303.
266. Schlessinger K, Levy DE. Malignant transformation but not normal cell growth depends on signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer research* 2005;65:5828-34.
267. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-88.
268. Lagunas L, Clipstone NA. Deregulated NFATc1 activity transforms murine fibroblasts via an autocrine growth factor-mediated Stat3-dependent pathway. *Journal of cellular biochemistry* 2009;108:237-48.
269. Tripathi P, Wang Y, Coussens M, et al. Activation of NFAT signaling establishes a tumorigenic microenvironment through cell autonomous and non-cell autonomous mechanisms. *Oncogene* 2013.
270. Sproul TW, Cheng PC, Dykstra ML, Pierce SK. A role for MHC class II antigen processing in B cell development. *International reviews of immunology* 2000;19:139-55.
271. Avalos AM, Ploegh HL. Early BCR Events and Antigen Capture, Processing, and Loading on MHC Class II on B Cells. *Frontiers in immunology* 2014;5:92.
272. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews Immunology* 2009;9:15-27.
273. Muller KP, Schumacher J, Kyewski BA. Half-life of antigen/major histocompatibility complex class II complexes in vivo: intra- and interorgan variations. *European journal of immunology* 1993;23:3203-7.
274. Durand B, Sperisen P, Emery P, et al. RFXAP, a novel subunit of the RFX DNA binding complex is mutated in MHC class II deficiency. *The EMBO journal* 1997;16:1045-55.
275. Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 1993;75:135-46.
276. Steimle V, Durand B, Barras E, et al. A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes & development* 1995;9:1021-32.
277. Masternak K, Barras E, Zufferey M, et al. A gene encoding a novel RFX-associated transactivator is mutated in the majority of MHC class II deficiency patients. *Nature genetics* 1998;20:273-7.
278. Nagarajan UM, Louis-Pence P, DeSandro A, Nilsen R, Bushey A, Boss JM. RFX-B is the gene responsible for the most common cause of the bare lymphocyte syndrome, an MHC class II immunodeficiency. *Immunity* 1999;10:153-62.
279. Miller TP, Lippman SM, Spier CM, Slymen DJ, Grogan TM. HLA-DR (Ia) immune phenotype predicts outcome for patients with diffuse large cell lymphoma. *The Journal of clinical investigation* 1988;82:370-2.
280. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Advances in immunology* 2005;87:163-208.

281. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology* 2011;29:235-71.
282. Riemersma SA, Jordanova ES, Schop RF, et al. Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites. *Blood* 2000;96:3569-77.
283. Roberts RA, Wright G, Rosenwald AR, et al. Loss of major histocompatibility class II gene and protein expression in primary mediastinal large B-cell lymphoma is highly coordinated and related to poor patient survival. *Blood* 2006;108:311-8.
284. Wilkinson ST, Fernandez DR, Murphy SP, et al. Decreased major histocompatibility complex class II expression in diffuse large B-cell lymphoma does not correlate with CpG methylation of class II transactivator promoters III and IV. *Leukemia & Lymphoma* 2009;50:1875-8.
285. Wilkinson ST, Vanpatten KA, Fernandez DR, et al. Partial plasma cell differentiation as a mechanism of lost major histocompatibility complex class II expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2012;119:1459-67.

8. Publikationen

- 1 [A. Wolf](#), N. Akrap, B. Marg, H. Galliardt, M. Heiligentag, F. Humpert, M. Sauer, B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt, and T. Seidel, 'Elements of Transcriptional Machinery Are Compatible among Plants and Mammals', *PLoS One*, 8 (2013), e53737.
- 2 C. Pelzer, K. Cabalzar, [A. Wolf](#), M. Gonzalez, G. Lenz, and M. Thome, 'The Protease Activity of the Paracaspase Malt1 Is Controlled by Monoubiquitination', *Nat Immunol*, 14 (2013), 337-45.
- 3 K. Cabalzar, C. Pelzer, [A. Wolf](#), G. Lenz, J. Iwaszkiewicz, V. Zoete, S. Hailfinger, and M. Thome, 'Monoubiquitination and Activity of the Paracaspase Malt1 Requires Glutamate 549 in the Dimerization Interface', *PLoS One*, 8 (2013), e72051.
- 4 M. Pfeifer, M. Grau, D. Lenze, S. S. Wenzel, [A. Wolf](#), B. Wollert-Wulf, K. Dietze, H. Nogai, B. Storek, H. Madle, B. Dorken, M. Janz, S. Dirnhofer, P. Lenz, M. Hummel, A. Tzankov, and G. Lenz, 'Pten Loss Defines a Pi3k/Akt Pathway-Dependent Germinal Center Subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (2013), 12420-5.
- 5 S. S. Wenzel, M. Grau, C. Mavis, S. Hailfinger, [A. Wolf](#), H. Madle, G. Deeb, B. Dorken, M. Thome, P. Lenz, S. Dirnhofer, F. J. Hernandez-Ilizaliturri, A. Tzankov, and G. Lenz, 'Mcl1 Is Deregulated in Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma', *Leukemia*, 27 (2013), 1381-90.
- 6 H. Nogai, S. S. Wenzel, S. Hailfinger, M. Grau, E. Kaergel, V. Seitz, B. Wollert-Wulf, M. Pfeifer, [A. Wolf](#), M. Frick, K. Dietze, H. Madle, A. Tzankov, M. Hummel, B. Dorken, C. Scheidreit, M. Janz, P. Lenz, M. Thome, and G. Lenz, 'Ikappab-Zeta Controls the Constitutive Nf-Kappab Target Gene Network and Survival of Abc Dlbcl', *Blood*, 122 (2013), 2242-50.
- 7 A. Flörcken*, M. Grau*, [A. Wolf](#)*, A. Weilemann, J. Kopp, B. Dörcken, T. Blankenstein, A. Pezutto, p. Lenz, G. Lenz, J. Westermann, 'Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B', *Int J Cancer*, (2014), doi: 10.1002/ijc.29230, *Geteilte Erstautorenschaft

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Annette Wolf

Berlin, den 04.12.2014

10. Anhang

Tabelle 10.1: Signifikant herunterregulierte Gene nach *NFATc1* shRNA #1 Expression.

GenSymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
ABHD16A	7920	abhydrolase domain containing 16A	-0,5985	0,0011
ACADL	33	acyl-CoA dehydrogenase, long chain	-1,0398	0,0011
ADAMTS14	140766	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 14	-0,9616	0,0018
ADAP1	11033	ArfGAP with dual PH domains 1	-0,6763	0,0015
ADH1C	126	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	-0,8745	0,0014
ADORA3	140	adenosine A3 receptor	-1,2834	0,0015
AGRP	181	agouti related protein homolog (mouse)	-0,9873	0,0006
ALPL	249	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-1,4455	0,0009
AMD1	262	adenosylmethionine decarboxylase 1	-0,3876	0,0022
AMY2B	280	amylase, alpha 2B (pancreatic)	-1,3560	0,0020
ASPDH	554235	aspartate dehydrogenase domain containing	-0,8117	0,0017
ASPG	374569	asparaginase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,2241	0,0002
BMP10	27302	bone morphogenetic protein 10	-1,4074	0,0016
BST1	683	bone marrow stromal cell antigen 1	-1,6940	0,0022
C10orf82	143379	chromosome 10 open reading frame 82	-1,3247	4,5E-05
C16orf54	283897	chromosome 16 open reading frame 54	-2,2139	0,0002
C19orf71	100128569	chromosome 19 open reading frame 71	-1,7125	0,0003
C1QTNF4	114900	C1q and tumor necrosis factor related protein 4	-0,8660	0,0007
C20orf20	55257	chromosome 20 open reading frame 20	-0,2188	0,0007
C2orf56	55471	chromosome 2 open reading frame 56	-0,0914	0,0005
CABYR	26256	calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated	-1,0770	0,0018
CADM4	199731	cell adhesion molecule 4	-1,8093	6,6E-05
CAP2	10486	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	-0,9460	0,0015
CARD11	84433	caspase recruitment domain family, member 11	-0,4920	0,0009
CASP3	836	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	-0,6956	0,0017
CCDC136	64753	coiled-coil domain containing 136	-1,5437	0,0009
CCDC159	126075	coiled-coil domain containing 159	-0,9498	0,0017
CCDC42	146849	coiled-coil domain containing 42	-1,0977	0,0003
CD300LG	146894	CD300 molecule-like family member g	-0,7279	0,0018
CDIPT	10423	CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase	-0,6586	3,2E-05
CHI3L1	1116	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	-0,9326	0,0019
CLDN19	149461	claudin 19	-1,9617	0,0002
CLIC3	9022	chloride intracellular channel 3	-1,6730	0,0011
CLIP3	25999	CAP-GLY domain containing linker protein 3	-1,0867	0,0010
CLPP	8192	ClpP caseinolytic peptidase, ATP-dependent, proteolytic subunit homolog (<i>E. coli</i>)	-0,3557	0,0022
COL6A2	1292	collagen, type VI, alpha 2	-1,7410	7,7E-05
CORO7	79585	coronin 7	-0,5350	0,0025
CSNK1G2-AS1	255193	CSNK1G2 antisense RNA 1 (non-protein coding)	-1,2208	0,0020
CTU1	90353	cytosolic thiouridylase subunit 1 homolog (<i>S. pombe</i>)	-0,3287	0,0017
CYB561D2	11068	cytochrome b-561 domain containing 2	-0,2243	0,0020
DEFB1	1672	defensin, beta 1	-1,1611	0,0002
DKK2	27123	dickkopf 2 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	-0,8335	0,0019
DNAH9	1770	dynein, axonemal, heavy chain 9	-1,5674	0,0013
DNAJB8	165721	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8	-1,8614	0,0003
DPP3	10072	dipeptidyl-peptidase 3	-0,3429	0,0017
DTL	51514	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (<i>Drosophila</i>)	-0,6269	0,0022
ECE2	9718	endothelin converting enzyme 2	-0,2501	0,0024
EGFL6	25975	EGF-like-domain, multiple 6	-0,8109	0,0010
ERAL1	26284	Era G-protein-like 1 (<i>E. coli</i>)	-0,2312	0,0003
FAM159A	348378	family with sequence similarity 159, member A	-0,4209	0,0004
FAM182B	728882	family with sequence similarity 182, member B	-1,6391	0,0004
FAM183B	340286	acyloxyacyl hydrolase (neutrophil)	-1,5185	0,0016
FBXO44	93611	F-box protein 44	-0,3821	0,0014

Genesymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
FXVD6	53826	FXVD domain containing ion transport regulator 6	-0,3874	0,0020
GABRR2	2570	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, rho 2	-1,1412	0,0013
GCGR	2642	glucagon receptor	-1,1420	0,0014
GMPR	2766	guanosine monophosphate reductase	-1,6453	0,0020
GPR52	9293	G protein-coupled receptor 52	-1,1695	0,0002
GRM4	2914	glutamate receptor, metabotropic 4	-1,9100	0,0003
H1FX	8971	H1 histone family, member X	-1,0752	0,0008
HAPLN3	145864	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	-1,0872	0,0007
HECTD3	79654	HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 3	-0,6319	0,0014
HFM1	164045	HFM1, ATP-dependent DNA helicase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,5651	0,0002
HGD	3081	homogentisate 1,2-dioxygenase	-0,9713	0,0013
HLA-DQA2	3118	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2	-1,1820	0,0024
IL15	3600	interleukin 15	-0,5263	0,0019
INPPL1	3636	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	-0,2420	0,0018
ITGB5	3693	integrin, beta 5	-1,3615	0,0011
IVL	3713	involucrin	-1,4501	0,0015
JPH1	56704	junctionophilin 1	-1,3828	0,0006
KCND3	3752	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	-0,7335	0,0007
KHSRP	8570	KH-type splicing regulatory protein	-0,7257	0,0024
KLC4	89953	kinesin light chain 4	-0,7852	0,0002
KRT79	338785	keratin 79	-1,4630	0,0003
LOC200726	200726	hCG1657980	-1,3432	0,0005
LOC401847	401847	Ig heavy chain V-III region VH26-like	-1,3586	0,0016
LOC415056	415056	uncharacterized LOC415056	-1,9583	0,0006
LRRC15	131578	leucine rich repeat containing 15	-0,8083	0,0014
LRRC18	474354	leucine rich repeat containing 18	-1,2890	0,0002
LRRC29	26231	leucine rich repeat containing 29	-1,2419	0,0022
LRRC34	151827	leucine rich repeat containing 34	-0,3770	0,0006
LRRC4B	94030	leucine rich repeat containing 4B	-2,1493	0,0001
LSM12	124801	LSM12 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-0,4981	0,0006
LYPLA2P1	653639	lysophospholipase II pseudogene 1	-0,4369	0,0017
MARCO	8685	macrophage receptor with collagenous structure	-1,8250	0,0003
MGLL	11343	monoglyceride lipase	-0,3462	0,0004
MIXL1	83881	Mix paired-like homeobox	-1,7854	0,0016
MMAB	326625	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type	-0,2430	0,0021
MUC19	283463	mucin 19, oligomeric	-1,6915	0,0003
MYL6	4637	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	-1,3485	0,0001
NACAD	23148	NAC alpha domain containing	-1,2143	0,0010
NDUFV1	4723	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa	-0,2279	0,0021
NFATC1	4772	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	-1,3640	0,0004
NKPD1	284353	NTPase, KAP family P-loop domain containing 1	-1,2299	0,0017
NPAS2	4862	neuronal PAS domain protein 2	-1,7545	5,4E-05
NXPE1	120400	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 1	-1,3432	0,0004
OLFM2	93145	olfactomedin 2	-1,2067	0,0010
OSR2	116039	odd-skipped related 2 (<i>Drosophila</i>)	-0,8535	0,0005
PARP16	54956	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 16	-0,2269	0,0007
PDE6C	5146	phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	-1,9137	0,0006
PENK	5179	proenkephalin	-1,2956	0,0021
PER2	8864	period homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	-0,6542	0,0004
PFDN5	5204	prefoldin subunit 5	-0,2332	0,0016
PIGS	94005	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	-0,7196	0,0020
PLD2	5338	phospholipase D2	-1,4671	0,0004
PLEKHA6	22874	pleckstrin homology domain containing, family A member 6	-1,0249	0,0018
PLOD3	8985	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	-0,6196	0,0017
PNKP	11284	polynucleotide kinase 3'-phosphatase	-0,4986	0,0023
PPP2R1A	5518	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha	-0,7213	0,0018
PRR13	54458	proline rich 13	-0,5721	0,0004
PSG9	5678	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9	-1,4318	0,0010

Gen symbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
PTPN7	5778	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	-0,5474	0,0008
PVALB	5816	parvalbumin	-1,1094	0,0014
RASGRF1	5923	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	-0,3599	0,0021
RBPMS	11030	RNA binding protein with multiple splicing	-1,3064	0,0023
RESP18	389075	regulated endocrine-specific protein 18 homolog (rat)	-1,6969	0,0014
RNF151	146310	ring finger protein 151	-1,1693	0,0004
RPL11	6135	ribosomal protein L11	-0,2067	0,0014
RPS27L	51065	ribosomal protein S27-like	-0,9481	0,0004
SAA3P	6290	serum amyloid A3 pseudogene	-1,6913	0,0016
SCYL1	57410	SCY1-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-0,5719	0,0021
SERPIND1	3053	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1	-0,8904	0,0014
SH3RF2	153769	SH3 domain containing ring finger 2	-1,5015	0,0015
SLC22A6	9356	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	-1,2604	0,0023
SLC25A10	1468	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10	-0,5967	0,0024
SLC39A9	55334	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 9	-1,0856	0,0022
SLITRK1	114798	SLIT and NTRK-like family, member 1	-0,7762	0,0019
SLURP1	57152	secreted LY6/PLAUR domain containing 1	-1,9411	0,0015
SPACA4	171169	sperm acrosome associated 4	-1,7250	8,9E-05
SSNA1	8636	Sjogren syndrome nuclear autoantigen 1	-0,5139	0,0020
SSX5	6758	synovial sarcoma, X breakpoint 5	-0,6457	0,0017
STAT4	6775	signal transducer and activator of transcription 4	-1,0603	0,0018
STS	412	steroid sulfatase (microsomal), isozyme S	-1,4840	0,0010
TAS2R4	50832	taste receptor, type 2, member 4	-1,1186	0,0014
TBC1D27	96597	TBC1 domain family, member 27	-0,4710	0,0010
TCEAL8	90843	transcription elongation factor A (SII)-like 8	-0,8012	0,0025
TCHP	84260	trichoplein, keratin filament binding	-0,5649	0,0016
TIMM17B	10245	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog B (yeast)	-0,5645	0,0010
TINAGL1	64129	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	-1,2996	3,6E-05
TMC2	117532	transmembrane channel-like 2	-1,4011	4,4E-05
TMEM106C	79022	transmembrane protein 106C	-0,2822	0,0020
TMEM184A	202915	transmembrane protein 184A	-1,3787	0,0016
TMEM37	140738	transmembrane protein 37	-1,6985	0,0025
TMIE	259236	transmembrane inner ear	-1,8442	0,0021
TNNT2	7139	troponin T type 2 (cardiac)	-1,0981	0,0022
TPRN	286262	taperin	-0,7397	0,0001
TRAF2	7186	TNF receptor-associated factor 2	-0,4124	0,0019
TRHR	7201	thyrotropin-releasing hormone receptor	-1,5951	0,0014
TTY5	83863	testis-specific transcript, Y-linked 5 (non-protein coding)	-0,9476	0,0023
TXNRD2	10587	thioredoxin reductase 2	-0,7366	0,0022
USP20	10868	ubiquitin specific peptidase 20	-0,2933	0,0024
USP7	7874	ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)	-0,1771	0,0016
WASF2	10163	WAS protein family, member 2	-0,5255	0,0010
XAGE3	170626	X antigen family, member 3	-0,9198	0,0009
ZBTB46	140685	zinc finger and BTB domain containing 46	-0,8849	0,0017
ZDHHC22	283576	zinc finger, DHHC-type containing 22	-1,1040	0,0007
ZG16	653808	zymogen granule protein 16 homolog (rat)	-1,2828	0,0003
ZNF683	257101	zinc finger protein 683	-1,0957	0,0023
ZNF687	57592	zinc finger protein 687	-0,5869	0,0023
ZNF768	79724	zinc finger protein 768	-0,4990	0,0015
ZP1	22917	zona pellucida glycoprotein 1 (sperm receptor)	-1,3842	0,0023

Tabelle 10.2: Signifikant hochregulierte Gene nach *NFATc1* shRNA #1 Expression.

Gensymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
AHI1	54806	Abelson helper integration site 1	0,3835	0,0024
ANKRD19P	138649	ankyrin repeat domain 19, pseudogene	1,2118	0,0024
ANKRD46	157567	ankyrin repeat domain 46	1,2926	4,6E-05
ASGR2	433	asialoglycoprotein receptor 2	1,0020	0,0005
AVPR2	554	arginine vasopressin receptor 2	1,3504	0,0013
B3GNT4	79369	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	0,8454	0,0022
B4GALNT2	124872	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2	1,1899	0,0002
C3orf71	646450	chromosome 3 open reading frame 71	0,5965	0,0020
CAP1	10487	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	0,4716	0,0019
CHRNE	1145	cholinergic receptor, nicotinic, epsilon (muscle)	0,8597	0,0016
CNST	163882	consortin, connexin sorting protein	0,4587	0,0024
CPEB1	64506	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1	1,6031	0,0021
CPSF2	53981	cleavage and polyadenylation specific factor 2, 100kDa	0,2454	0,0018
CYGB	114757	cytoglobin	0,9502	0,0003
DIDO1	11083	death inducer-obliterator 1	0,2415	0,0023
DOCK10	55619	dedicator of cytokinesis 10	0,3916	0,0016
DYNC1LI2	1783	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 2	0,2624	0,0023
EP300	2033	E1A binding protein p300	1,0607	0,0004
FAM153A	285596	family with sequence similarity 153, member A	1,4522	0,0017
FAM168A	23201	family with sequence similarity 168, member A	0,8417	0,0021
FAM49B	51571	family with sequence similarity 49, member B	0,3714	0,0025
FBLN7	129804	fibulin 7	0,8139	0,0009
FKSG2	59347	tumor protein, translationally-controlled 1 pseudogene	0,7107	0,0018
FMO1	2326	flavin containing monooxygenase 1	1,7867	0,0010
FMR1	2332	fragile X mental retardation 1	0,2157	0,0017
GEMIN8P4	492303	gem (nuclear organelle) associated protein 8 pseudogene 4	1,7675	0,0010
GLTSCR1	29998	glioma tumor suppressor candidate region gene 1	0,4041	0,0014
GYPE	2996	glycophorin E (MNS blood group)	1,3059	0,0013
H2AFV	94239	H2A histone family, member V	0,2202	0,0006
HBBP1	3044	hemoglobin, beta pseudogene 1	1,0794	0,0018
HHLA1	10086	HERV-H LTR-associating 1	1,6601	0,0005
HNRNPH2	3188	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H')	0,6272	0,0006
HSPA2	3306	heat shock 70kDa protein 2	0,7463	0,0008
IGIP	492311	IgA-inducing protein homolog (Bos taurus)	0,8398	0,0023
KIAA0494	9813	KIAA0494	0,1828	0,0018
KLRF1	51348	killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1	1,1482	0,0024
KPNA5	3841	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)	1,4770	0,0002
KRT32	3882	keratin 32	1,3560	0,0010
KRTAP10-10	353333	keratin associated protein 10-10	0,3878	0,0006
LHFPL5	222662	lipoma HMGIC fusion partner-like 5	1,4023	0,0005
LINC00334	114042	long intergenic non-protein coding RNA 334	0,9710	0,0010
LOC282997	282997	uncharacterized LOC282997	1,8453	0,0011
LOC283587	283587	uncharacterized LOC283587	1,2237	0,0014
LOC647979	647979	uncharacterized LOC647979	0,4154	0,0008
LYST	1130	lysosomal trafficking regulator	1,2968	0,0015
MAP2K7	5609	mitogen-activated protein kinase kinase 7	1,1023	0,0021
OR1F2P	26184	olfactory receptor, family 1, subfamily F, member 2	0,8512	0,0012
OR2W3	343171	olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3	1,8998	0,0019
OR5H1	26341	olfactory receptor, family 5, subfamily H, member 1	1,4799	0,0023
PACSN1	29993	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	0,8810	0,0022
PBX2	5089	pre-B-cell leukemia homeobox 2	1,7187	0,0017
PHF20L1	51105	PHD finger protein 20-like 1	0,2824	0,0023
PITPNM2	57605	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2	0,5452	0,0020
PLAC1	10761	placenta-specific 1	1,3248	6,8E-05
PLCG2	5336	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	0,2710	0,0024
PLEKHB2	55041	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2	0,3466	0,0021
PPARA	5465	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	0,4691	0,0019

Gensymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
PPFIA1	8500	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1	0,2976	0,0003
PPP1R3B	79660	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B	0,2925	0,0006
RBM14	10432	RNA binding motif protein 14	0,3017	0,0010
RNF135	84282	ring finger protein 135	0,2796	0,0017
SEL1L	6400	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	1,0303	0,0003
SLC35D3	340146	solute carrier family 35, member D3	0,3564	0,0020
SP100	6672	SP100 nuclear antigen	0,0680	0,0016
STIM2	57620	stromal interaction molecule 2	0,4354	0,0015
TMEM109	79073	transmembrane protein 109	0,1765	0,0022
TMPRSS2	7113	transmembrane protease, serine 2	1,4145	0,0010
TNFSF10	8743	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	0,3544	0,0010
TSHZ1	10194	teashirt zinc finger homeobox 1	1,1301	0,0008
TSPAN15	23555	tetraspanin 15	1,6542	0,0014
VCAN	1462	versican	1,1360	0,0018
VPS26A	9559	vacuolar protein sorting 26 homolog A (S. pombe)	0,2759	0,0025
ZFP36	7538	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	0,1150	0,0015
ZNF252P	286101	zinc finger protein 252, pseudogene	0,9661	0,0016
ZNF449	203523	zinc finger protein 449	1,1209	0,0007
ZNF654	55279	zinc finger protein 654	0,5033	0,0018
ZNF746	155061	zinc finger protein 746	0,1209	0,0017
ZNF780A	284323	zinc finger protein 780A	1,4584	0,0008

Tabelle 10.3: Signifikant herunterregulierte Gene nach *NFATc1* shRNA #2 Expression.

Gensymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
A4GALT	53947	alpha 1,4-galactosyltransferase	-2,6548	3,3E-05
AARS	16	alanyl-tRNA synthetase	-0,4145	0,0009
ABCA7	10347	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	-0,4898	0,0023
ABCB8	11194	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8	-0,5716	0,0012
ABHD16A	7920	abhydrolase domain containing 16A	-0,3879	0,0024
ACAP3	116983	ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 3	-0,4559	0,0012
ACSM5	54988	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5	-1,3193	0,0020
ACTL8	81569	actin-like 8	-2,0096	0,0019
ACTN3	89	actinin, alpha 3	-1,2667	0,0010
ADAP1	11033	ArfGAP with dual PH domains 1	-0,8766	0,0004
ADORA2A	135	adenosine A2a receptor	-0,3655	0,0022
AFAP1L1	134265	actin filament associated protein 1-like 1	-1,5012	0,0007
AGPAT2	10555	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)	-0,6812	0,0017
AIF1	199	allograft inflammatory factor 1	-1,2348	0,0008
AKT1	207	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	-0,8953	0,0015
ALOX12B	242	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	-0,8998	0,0009
ALPL	249	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-1,2917	0,0011
ALX3	257	ALX homeobox 3	-1,2866	0,0024
ALX4	60529	ALX homeobox 4	-1,5208	0,0011
ANKLE1	126549	ankyrin repeat and LEM domain containing 1	-0,5913	0,0003
APOB	338	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	-0,5187	0,0020
APTX	54840	aprataxin	-0,0918	3,1E-05
ARAF	369	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	-0,7177	0,0011
ARFGAP2	84364	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 2	-0,9708	0,0006
ARFRP1	10139	ADP-ribosylation factor related protein 1	-0,4151	0,0024
ARHGAP35	2909	Rho GTPase activating protein 35	-0,5249	0,0024
ASCC2	84164	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	-0,5326	0,0019
ASNA1	439	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)	-0,7379	0,0015
ATP5B	506	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	-0,1564	0,0022
AURKB	9212	aurora kinase B	-0,5080	0,0018
BAHCC1	57597	BAH domain and coiled-coil containing 1	-1,6426	0,0019
BCL2L1	598	BCL2-like 1	-0,6216	0,0019

Genesymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
BEND7	222389	BEN domain containing 7	-1,1890	0,0017
BOC	91653	Boc homolog (mouse)	-1,7497	0,0003
BRD3	8019	bromodomain containing 3	-0,4671	0,0019
BST1	683	bone marrow stromal cell antigen 1	-2,3773	0,0023
BST2	684	bone marrow stromal cell antigen 2	-0,3507	0,0016
C10orf82	143379	chromosome 10 open reading frame 82	-0,7976	0,0024
C11orf24	53838	chromosome 11 open reading frame 24	-0,3106	0,0012
C16orf5	29965	chromosome 16 open reading frame 5	-0,3588	0,0024
C16orf54	283897	chromosome 16 open reading frame 54	-2,0811	0,0004
C17orf53	78995	chromosome 17 open reading frame 53	-0,5774	0,0006
C19orf71	100128569	chromosome 19 open reading frame 71	-2,6686	0,0002
C1QL2	165257	complement component 1, q subcomponent-like 2	-1,5174	0,0009
C20orf27	54976	chromosome 20 open reading frame 27	-0,5138	0,0024
C22orf24	25775	chromosome 22 open reading frame 24	-1,4049	0,0003
C6orf10	10665	chromosome 6 open reading frame 10	-0,9011	0,0003
C7orf50	84310	chromosome 7 open reading frame 50	-0,4865	0,0017
CACNG2	10369	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 2	-1,0511	0,0015
CADM4	199731	cell adhesion molecule 4	-1,3984	0,0019
CALML6	163688	calmodulin-like 6	-1,8539	0,0008
CAMK1	8536	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I	-0,6892	0,0006
CARD11	84433	caspase recruitment domain family, member 11	-0,5266	0,0003
CASR	846	calcium-sensing receptor	-1,7116	0,0025
CCDC86	79080	coiled-coil domain containing 86	-0,6193	0,0004
CCDC9	26093	coiled-coil domain containing 9	-0,5718	0,0024
CCND3	896	cyclin D3	-0,4085	0,0024
CD2BP2	10421	CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2	-0,5643	0,0012
CD81	975	CD81 molecule	-0,4757	0,0021
CDIPT	10423	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	-0,5656	0,0012
CELF3	11189	CUGBP, Elav-like family member 3	-1,5308	0,0013
CERS5	91012	ceramide synthase 5	-0,5059	0,0005
CFH	3075	complement factor H	-0,8420	0,0015
CFTR	1080	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)	-0,9827	0,0025
CHMP1A	5119	charged multivesicular body protein 1A	-0,3780	0,0025
CHPF	79586	chondroitin polymerizing factor	-0,7368	0,0018
CHRD2	25884	chordin-like 2	-1,3116	0,0021
CLIC3	9022	chloride intracellular channel 3	-1,6779	0,0017
CLN6	54982	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6, late infantile, variant	-0,5539	0,0022
CNKSR2	22866	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2	-1,2544	0,0022
CNTN4	152330	contactin 4	-0,8922	0,0011
COL6A2	1292	collagen, type VI, alpha 2	-1,4839	0,0017
COX8A	1351	cytochrome c oxidase subunit VIIIA (ubiquitous)	-0,1770	0,0013
CPNE1	8904	copine I	-0,6342	0,0019
CPSF1	29894	cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa	-0,3761	0,0025
CPZ	8532	carboxypeptidase Z	-2,0664	0,0014
CRB2	286204	crumbs homolog 2 (Drosophila)	-1,7056	0,0011
CREB3	10488	cAMP responsive element binding protein 3	-0,4054	0,0013
CT47B1	643311	cancer/testis antigen family 47, member B1	-1,6182	0,0006
CTU1	90353	cytosolic thiouridylase subunit 1 homolog (S. pombe)	-0,8534	0,0023
CUEDC2	79004	CUE domain containing 2	-0,4376	0,0003
CYBASC3	220002	cytochrome b, ascorbate dependent 3	-0,3482	0,0021
DDX19A	55308	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19A	-0,2625	0,0020
DKK2	27123	dickkopf 2 homolog (Xenopus laevis)	-0,8015	0,0015
DNAH6	1768	dynein, axonemal, heavy chain 6	-0,8760	0,0020
ECE1	1889	endothelin converting enzyme 1	-0,9829	0,0012
EEFSEC	60678	eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA-specific	-0,5375	0,0001
ELOF1	84337	elongation factor 1 homolog (S. cerevisiae)	-0,4152	0,0012
EML3	256364	echinoderm microtubule associated protein like 3	-0,6415	0,0016
ENO2	2026	enolase 2 (gamma, neuronal)	-0,6207	0,0003

Gen symbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
EPHA2	1969	EPH receptor A2	-2,4656	0,0010
ESYT1	23344	extended synaptotagmin-like protein 1	-0,4083	0,0020
ETV7	51513	ets variant 7	-1,1093	0,0020
F2	2147	coagulation factor II (thrombin)	-0,8690	0,0015
FAM110C	642273	family with sequence similarity 110, member C	-0,8015	0,0021
FAM163A	148753	family with sequence similarity 163, member A	-1,3508	0,0025
FAM189A2	9413	family with sequence similarity 189, member A2	-0,7977	0,0012
FAM3A	60343	family with sequence similarity 3, member A	-0,4709	0,0007
FAM83A	84985	family with sequence similarity 83, member A	-1,3882	0,0015
FAM83B	222584	family with sequence similarity 83, member B	-1,4889	0,0023
FAM9C	171484	family with sequence similarity 9, member C	-0,7369	0,0024
FBXO24	26261	F-box protein 24	-1,4528	0,0010
FDPSSL2A	619190	MGC44478	-0,3023	0,0024
FGFBP2	83888	fibroblast growth factor binding protein 2	-1,5443	0,0006
FGFR3	2261	fibroblast growth factor receptor 3	-0,7029	0,0016
FLG	2312	filaggrin	-1,3765	0,0012
FLNC	2318	filamin C, gamma	-1,6560	0,0005
FOXM1	2305	forkhead box M1	-0,4481	0,0017
FPR1	2357	formyl peptide receptor 1	-1,4608	0,0014
FRMPD1	22844	FERM and PDZ domain containing 1	-0,5682	0,0020
FRZB	2487	frizzled-related protein	-1,4553	0,0005
G6PD	2539	glucose-6-phosphate dehydrogenase	-0,4666	0,0018
GAS2L2	246176	growth arrest-specific 2 like 2	-1,2672	0,0016
GDF2	2658	growth differentiation factor 2	-1,3880	0,0018
GJB1	2705	gap junction protein, beta 1, 32kDa	-1,9696	0,0001
GJD4	219770	gap junction protein, delta 4, 40.1kDa	-1,5816	0,0022
GMPPA	29926	GDP-mannose pyrophosphorylase A	-0,3178	0,0016
GMPR	2766	guanosine monophosphate reductase	-1,2610	0,0016
GNB2	2783	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2	-0,5328	0,0008
GNPDA1	10007	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	-0,5548	0,0013
GOLGA7	51125	golgin A7	-0,3855	0,0015
GPR135	64582	G protein-coupled receptor 135	-0,4120	0,0006
GPR162	27239	G protein-coupled receptor 162	-1,6440	0,0012
GPR4	2828	G protein-coupled receptor 4	-1,2613	0,0020
GPS1	2873	G protein pathway suppressor 1	-0,4807	0,0021
GRAMD1B	57476	GRAM domain containing 1B	-0,3723	0,0017
GRASP	160622	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	-0,6389	0,0022
GYS1	2997	glycogen synthase 1 (muscle)	-0,2661	0,0009
H1FX	8971	H1 histone family, member X	-0,5369	0,0014
HDGFRP2	84717	hepatoma-derived growth factor-related protein 2	-0,4912	0,0014
HNF1A-AS1	283460	HNF1A antisense RNA 1 (non-protein coding)	-1,3246	0,0013
HPD	3242	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	-1,6296	0,0009
ICA1	3382	islet cell autoantigen 1, 69kDa	-1,3180	0,0009
IGFBP3	3486	insulin-like growth factor binding protein 3	-0,7091	0,0024
IKBKB	3551	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	-0,1340	0,0004
IL26	55801	interleukin 26	-1,8232	0,0007
IPO13	9670	importin 13	-0,4729	0,0015
IRAK1	3654	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-0,4541	0,0024
IRF1	3659	interferon regulatory factor 1	-0,5775	0,0006
IRF3	3661	interferon regulatory factor 3	-0,5475	0,0021
ITGA3	3675	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	-1,1017	0,0004
ITPR3	3710	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3	-0,3187	0,0018
KANK4	163782	KN motif and ankyrin repeat domains 4	-0,7592	0,0024
KCNAB2	8514	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	-0,2083	0,0004
KCNJ3	3760	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	-1,3299	0,0003
KIAA0195	9772	KIAA0195	-0,6541	0,0017

Genesymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
KIAA0664	23277	KIAA0664	-0,5859	0,0008
KIAA1755	85449	KIAA1755	-0,4924	0,0003
KLF1	10661	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	-1,6473	0,0010
KLHDC3	116138	kelch domain containing 3	-0,8083	0,0009
KLK13	26085	kallikrein-related peptidase 13	-0,7654	0,0022
KLK5	25818	kallikrein-related peptidase 5	-1,2959	0,0021
LAMA3	3909	laminin, alpha 3	-0,7716	0,0023
LDHA	3939	lactate dehydrogenase A	-0,3984	0,0023
LIM2	3982	lens intrinsic membrane protein 2, 19kDa	-1,5319	0,0014
LIN28A	79727	lin-28 homolog A (C. elegans)	-1,1421	0,0008
LOC100288144	100288144	uncharacterized LOC100288144	-1,2943	0,0004
LOC389332	389332	uncharacterized LOC389332	-1,8140	0,0022
LOC407835	407835	mitogen-activated protein kinase kinase 2 pseudogene	-0,6229	0,0014
LOC440337	440337	uncharacterized LOC440337	-1,6968	0,0014
LOC440792	440792	proline dehydrogenase (oxidase) 1 pseudogene	-1,2224	0,0011
LOC494150	494150	prohibitin pseudogene	-0,3252	0,0008
LONP2	83752	lon peptidase 2, peroxisomal	-0,1954	0,0020
LRIT1	26103	leucine-rich repeat, immunoglobulin-like and transmembrane domains 1	-2,5804	0,0011
LRP1	4035	low density lipoprotein receptor-related protein 1	-1,4751	0,0011
LRRC15	131578	leucine rich repeat containing 15	-0,9550	0,0016
LRRC4	64101	leucine rich repeat containing 4	-2,3730	0,0003
LRRC4B	94030	leucine rich repeat containing 4B	-1,3058	0,0013
LY6E	4061	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	-0,6699	0,0016
LYPLA2P1	653639	lysophospholipase II pseudogene 1	-0,7266	0,0005
LZTR1	8216	leucine-zipper-like transcription regulator 1	-0,8527	0,0014
MAP4K2	5871	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2	-0,3535	0,0008
MAP7D2	256714	MAP7 domain containing 2	-1,0126	0,0024
MAPK3	5595	mitogen-activated protein kinase 3	-0,6274	0,0021
MAPKAP1	79109	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	-0,6612	0,0023
MCOLN1	57192	mucolipin 1	-0,3443	0,0005
MDFI	4188	MyoD family inhibitor	-1,2095	0,0008
MED15	51586	mediator complex subunit 15	-0,7021	0,0016
MED25	81857	mediator complex subunit 25	-0,4869	0,0021
MGC45800	90768	uncharacterized LOC90768	-0,8650	0,0009
MIP	4284	major intrinsic protein of lens fiber	-1,4490	0,0012
MIXL1	83881	Mix paired-like homeobox	-1,2452	0,0020
MLST8	64223	MTOR associated protein, LST8 homolog (S. cerevisiae)	-0,5642	0,0009
MTCH1	23787	mitochondrial carrier 1	-0,6190	0,0007
MYBL2	4605	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	-0,5956	0,0023
MYH7B	57644	myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, beta	-1,4224	0,0002
NAV3	89795	neuron navigator 3	-0,8408	0,0012
NEFL	4747	neurofilament, light polypeptide	-0,9265	0,0021
NFATC1	4772	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	-0,9672	6,6E-05
NFATC2	4773	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	-0,7507	0,0014
NGRN	51335	neugrin, neurite outgrowth associated	-0,3500	0,0016
NPPC	4880	natriuretic peptide C	-1,4494	0,0021
NPR3	4883	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	-0,8878	0,0015
NRBP1	29959	nuclear receptor binding protein 1	-0,4835	0,0008
NTF3	4908	neurotrophin 3	-2,3102	0,0007
NYAP1	222950	neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adaptor 1	-2,2518	0,0013
OS9	10956	osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin	-0,6953	8,9E-05
PAK1	5058	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1	-0,2258	0,0014
PARD3B	117583	par-3 partitioning defective 3 homolog B (C. elegans)	-0,9804	0,0007
PARVB	29780	parvin, beta	-0,5904	0,0006
PCDHB12	56124	protocadherin beta 12	-0,8916	0,0020
PDE6G	5148	phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma	-1,5727	0,0021

Gen symbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
PDE9A	5152	phosphodiesterase 9A	-0,8244	0,0015
PENK	5179	proenkephalin	-2,0082	0,0007
PERP	64065	PERP, TP53 apoptosis effector	-1,1125	0,0016
PHF7	51533	PHD finger protein 7	-0,7163	0,0018
PIGS	94005	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	-0,4960	0,0017
PIN1	5300	peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1	-0,6155	0,0019
PITPNM1	9600	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1	-0,5388	0,0017
PKHD1	5314	polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)	-0,7952	0,0016
PKMYT1	9088	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1	-0,8200	0,0018
PKN1	5585	protein kinase N1	-0,6333	0,0014
PLA2G2F	64600	phospholipase A2, group IIF	-1,2037	0,0014
PLEKHM2	23207	pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN domain) member 2	-0,6835	0,0017
PNPLA6	10908	patatin-like phospholipase domain containing 6	-0,6118	0,0001
POLA2	23649	polymerase (DNA directed), alpha 2, accessory subunit	-0,4184	0,0018
POLD2	5425	polymerase (DNA directed), delta 2, accessory subunit	-0,5460	0,0007
POLL	27343	polymerase (DNA directed), lambda	-0,2644	0,0001
POLR2E	5434	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25kDa	-0,5980	0,0008
PPP1CA	5499	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyme	-0,3701	0,0003
PPP5C	5536	protein phosphatase 5, catalytic subunit	-0,9007	0,0003
PRKAG1	5571	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit	-0,2782	0,0013
PRKCSH	5589	protein kinase C substrate 80K-H	-0,7658	0,0021
PRNT	149830	prion protein (testis specific)	-0,7570	0,0007
PTGES2	80142	prostaglandin E synthase 2	-0,7584	0,0003
PTOV1	53635	prostate tumor overexpressed 1	-0,4420	0,0005
R3HDM4	91300	R3H domain containing 4	-0,5351	0,0011
RAC2	5880	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	-0,2224	0,0024
RADIL	55698	Ras association and DIL domains	-1,2055	0,0023
RAPGEF1	2889	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	-0,6751	5,3E-05
RASGRF2	5924	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2	-1,3046	0,0004
RASL10B	91608	RAS-like, family 10, member B	-1,5746	0,0019
RCN2	5955	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	-0,7900	0,0011
RDH13	112724	retinol dehydrogenase 13 (all-trans/9-cis)	-0,4671	0,0021
REXO1	57455	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)	-1,1041	0,0008
RIN1	9610	Ras and Rab interactor 1	-1,1047	0,0023
RNF144A	9781	ring finger protein 144A	-1,1703	0,0006
RNF40	9810	ring finger protein 40, E3 ubiquitin protein ligase	-0,6357	0,0004
RNPEPL1	57140	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1	-0,4985	0,0025
ROGDI	79641	rogdi homolog (Drosophila)	-0,5967	0,0006
RPL36	25873	ribosomal protein L36	-0,1738	0,0011
RXRB	6257	retinoid X receptor, beta	-0,6523	0,0023
SAMD4B	55095	sterile alpha motif domain containing 4B	-0,4837	0,0017
SCMH1	22955	sex comb on midleg homolog 1 (Drosophila)	-0,5942	0,0013
SCYL1	57410	SCY1-like 1 (S. cerevisiae)	-0,6807	0,0023
SEMG2	6407	semenogelin II	-1,2394	0,0021
SETD1A	9739	SET domain containing 1A	-1,1388	0,0004
SF1	7536	splicing factor 1	-0,1391	0,0022
SGTA	6449	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, alpha	-0,5900	0,0013
SIGLEC1	6614	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	-1,1744	0,0020
SIGLEC10	89790	sialic acid binding Ig-like lectin 10	-0,3165	0,0021
SLC1A5	6510	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	-0,8825	0,0004
SLC25A11	8402	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11	-0,4710	0,0009
SLC25A39	51629	solute carrier family 25, member 39	-0,5902	0,0023
SLC27A4	10999	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	-0,7262	0,0016
SLC39A3	29985	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 3	-0,5050	0,0012
SLC8A1	6546	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	-1,1861	0,0010
SLCO1A2	6579	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	-0,8622	0,0018

Gensymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
SMARCB1	6598	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1	-0,7355	0,0017
SMG9	56006	smg-9 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)	-0,2858	0,0009
SPRN	503542	shadow of prion protein homolog (zebrafish)	-1,3050	0,0007
SRCAP	10847	Snf2-related CREBBP activator protein	-0,5545	0,0022
STARD3	10948	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 3	-0,6814	0,0017
STIP1	10963	stress-induced-phosphoprotein 1	-0,4113	0,0015
SUN2	25777	Sad1 and UNC84 domain containing 2	-0,8423	0,0023
SUV39H1	6839	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)	-0,8899	0,0016
SYNGR2	9144	synaptogyrin 2	-0,4614	0,0021
TAGLN2	8407	transgelin 2	-0,3731	0,0020
TIMM44	10469	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)	-0,3496	0,0021
TMC2	117532	transmembrane channel-like 2	-1,3075	0,0019
TMEM184A	202915	transmembrane protein 184A	-1,6143	0,0005
TMEM240	339453	transmembrane protein 240	-1,4958	0,0005
TMEM37	140738	transmembrane protein 37	-2,0214	0,0007
TMEM55B	90809	transmembrane protein 55B	-0,4431	0,0007
TMIGD2	126259	transmembrane and immunoglobulin domain containing 2	-1,1304	0,0009
TPRA1	131601	transmembrane protein, adipocyte associated 1	-0,6146	0,0012
TRAF2	7186	TNF receptor-associated factor 2	-0,5675	0,0011
TRAFD1	10906	TRAF-type zinc finger domain containing 1	-0,6692	0,0010
TREM2	54209	triggering receptor expressed on myeloid cells 2	-0,8482	0,0021
TRPC4AP	26133	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein	-0,4958	0,0007
TRPV3	162514	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3	-0,9498	0,0006
TSPAN2	10100	tetraspanin 2	-1,0449	0,0012
TSPYL6	388951	TSPY-like 6	-1,2259	0,0014
TSR2	90121	TSR2, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae)	-0,8655	0,0010
TSSK3	81629	testis-specific serine kinase 3	-1,5458	0,0015
TUB	7275	tubby homolog (mouse)	-1,1587	0,0007
UBE2MP1	606551	ubiquitin-conjugating enzyme E2M pseudogene 1	-0,6537	0,0023
USH1C	10083	Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)	-0,7964	0,0022
USP5	8078	ubiquitin specific peptidase 5 (isopeptidase T)	-0,7954	0,0019
VMO1	284013	vitelline membrane outer layer 1 homolog (chicken)	-1,7361	0,0002
WDR46	9277	WD repeat domain 46	-0,4974	0,0006
WRAP53	55135	WD repeat containing, antisense to TP53	-0,5343	0,0005
YKT6	10652	YKT6 v-SNARE homolog (S. cerevisiae)	-0,4711	0,0022
ZBED1	9189	zinc finger, BED-type containing 1	-0,3950	0,0019
ZBTB7B	51043	zinc finger and BTB domain containing 7B	-0,5076	0,0025
ZNF581	51545	zinc finger protein 581	-0,5038	0,0004

Tabelle 10.4: Signifikant hochregulierte Gene nach *NFATc1* shRNA #2 Expression.

Gensymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
ABCB7	22	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7	0,3467	0,0025
AKAP7	9465	A kinase (PRKA) anchor protein 7	1,2604	0,0016
AMMECR1	9949	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region gene 1	0,3707	0,0015
ARHGEF15	22899	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 15	0,4340	0,0017
ARV1	64801	ARV1 homolog (S. cerevisiae)	0,2147	0,0012
ATP5I	521	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E	0,2438	0,0016
ATP6V1C2	245973	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2	1,2041	0,0023
B4GALT6	9331	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6	1,1691	0,0011
C12orf42	374470	chromosome 12 open reading frame 42	1,6563	0,0018
C14orf45	80127	chromosome 14 open reading frame 45	0,9443	3,3E-05
C14orf79	122616	chromosome 14 open reading frame 79	0,7137	0,0025
C1orf123	54987	chromosome 1 open reading frame 123	0,2594	0,0011
C9orf53	51198	chromosome 9 open reading frame 53	1,1647	0,0015

Genesymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
CCDC87	55231	coiled-coil domain containing 87	0,6927	0,0017
CELF5	60680	CUGBP, Elav-like family member 5	1,4632	0,0005
CNDP1	84735	carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family)	1,2504	0,0012
CNOT7	29883	CCR4-NOT transcription complex, subunit 7	0,2241	0,0021
CPQ	10404	carboxypeptidase Q	1,0217	0,0017
DPH1	1801	DPH1 homolog (S. cerevisiae)	1,0540	0,0023
DPM3	54344	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3	0,2461	0,0021
DPY19L1P1	100129460	dpy-19-like 1 pseudogene 1 (C. elegans)	0,7819	0,0016
DZANK1	55184	double zinc ribbon and ankyrin repeat domains 1	0,3294	0,0022
ERLEC1	27248	endoplasmic reticulum lectin 1	0,4051	0,0012
FAHD1	81889	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	0,1106	0,0023
FAM189B	10712	family with sequence similarity 189, member B	0,1221	0,0024
FAM214A	56204	family with sequence similarity 214, member A	0,4761	0,0020
FAM98A	25940	family with sequence similarity 98, member A	0,4880	0,0021
FBXO11	80204	F-box protein 11	0,3647	0,0020
FZD6	8323	frizzled family receptor 6	1,6953	0,0016
GABRA3	2556	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 3	0,8343	0,0019
GALNTL1	57452	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	1,2680	0,0018
GBP3	2635	guanylate binding protein 3	0,8123	0,0019
GLTSCR2	29997	glioma tumor suppressor candidate region gene 2	0,1943	0,0024
GPSM2	29899	G-protein signaling modulator 2	0,1941	0,0017
HOXA9	3205	homeobox A9	1,8077	0,0004
IFT80	57560	intraflagellar transport 80 homolog (Chlamydomonas)	0,1749	0,0002
ING3	54556	inhibitor of growth family, member 3	0,4293	0,0015
ISM2	145501	isthmin 2 homolog (zebrafish)	1,2345	0,0024
ITGAM	3684	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	1,3195	0,0009
KCNRG	283518	potassium channel regulator	1,5659	0,0012
KDM6B	23135	lysine (K)-specific demethylase 6B	1,3009	0,0007
KRCC1	51315	lysine-rich coiled-coil 1	1,4316	0,0010
LOC100130428	100130428	IGYY565	1,0391	0,0014
LOC100289341	100289341	uncharacterized LOC100289341	0,1222	0,0018
LOC158960	158960	uncharacterized protein BC009467	0,3718	0,0017
LOC645195	645195	uncharacterized LOC645195	0,3148	0,0024
MBIP	51562	MAP3K12 binding inhibitory protein 1	0,2523	0,0023
MMACHC	25974	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblC type, with homocystinuria	0,2878	0,0017
MMGT1	93380	membrane magnesium transporter 1	0,2102	0,0001
MORF4L2	9643	mortality factor 4 like 2	0,3701	0,0022
MPC1	51660	mitochondrial pyruvate carrier 1	0,3879	0,0003
NIPSNAP3A	25934	nipsnap homolog 3A (C. elegans)	0,5088	0,0020
NOTCH2	4853	notch 2	0,1616	0,0013
NPTN	27020	neuroplastin	0,3488	0,0017
NUDT3	11165	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 3	0,3184	0,0024
P2RY14	9934	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	1,4815	0,0022
PCDHB14	56122	protocadherin beta 14	1,8710	0,0024
PIGB	9488	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class B	0,3803	0,0002
PLA2G5	5322	phospholipase A2, group V	1,4342	0,0013
PLAT	5327	plasminogen activator, tissue	1,1237	0,0012
PPP2CB	5516	protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyme	0,2196	0,0005
PQLC3	130814	PQ loop repeat containing 3	0,3837	0,0022
PROSC	11212	proline synthetase co-transcribed homolog (bacterial)	0,1716	0,0018
PSG2	5670	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 2	1,3229	0,0010
RAB3D	9545	RAB3D, member RAS oncogene family	0,5277	0,0016
RASL11A	387496	RAS-like, family 11, member A	1,0235	0,0008
RC3H2	54542	ring finger and CCCH-type domains 2	0,1991	0,0014
RGN	9104	regucalcin (senescence marker protein-30)	1,1818	0,0005
RRAGA	10670	Ras-related GTP binding A	0,3474	0,0017
S100Z	170591	S100 calcium binding protein Z	1,1431	0,0022
SEL1L	6400	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	0,2605	0,0019

Gensymbol	Gen ID	Genbezeichnung	Log ₂ Ratio	p-Wert
SEPT7L	285961	septin 7-like	1,4023	0,0013
SERPINB9	5272	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	0,4818	0,0003
SESN1	27244	sestrin 1	0,9145	0,0019
SIDT1	54847	SID1 transmembrane family, member 1	1,4321	0,0002
SIX1	6495	SIX homeobox 1	0,9186	0,0024
SLC25A27	9481	solute carrier family 25, member 27	0,9263	0,0018
SLC33A1	9197	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1	0,3990	0,0005
SP4	6671	Sp4 transcription factor	1,3184	0,0003
SPG11	80208	spastic paraplegia 11 (autosomal recessive)	0,4297	0,0012
SPP1	6696	secreted phosphoprotein 1	0,7860	0,0008
STAM2	10254	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2	0,2522	0,0005
SYBU	55638	syntabulin (syntaxin-interacting)	1,2981	0,0008
TMED10P1	286102	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) pseudogene 1	0,0834	0,0019
TMEM17	200728	transmembrane protein 17	1,0990	0,0018
TRAF3	7187	TNF receptor-associated factor 3	1,2221	0,0021
UBE2O	63893	ubiquitin-conjugating enzyme E2O	0,2283	0,0007
USP34	9736	ubiquitin specific peptidase 34	0,2492	0,0016
UTS2D	257313	urotensin 2 domain containing	1,7323	0,0003
VN1R10P	387316	vomeronal 1 receptor 10 pseudogene	1,2012	0,0010
ZCCHC9	84240	zinc finger, CCHC domain containing 9	0,1209	0,0020
ZFP36	7538	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	0,3993	0,0004
ZFR	51663	zinc finger RNA binding protein	0,2404	0,0013
ZMYM1	79830	zinc finger, MYM-type 1	1,0215	0,0016
ZNF25	219749	zinc finger protein 25	1,0947	0,0009
ZNF423	23090	zinc finger protein 423	1,1224	0,0023
ZNF484	83744	zinc finger protein 484	0,3936	0,0010
ZNF8	7554	zinc finger protein 8	0,1710	0,0006

Tabelle 10.5: Differenziell regulierte Gensignaturen nach *NFATc1* shRNA #1-Expression.

Herunterregulierte Signaturen	Physiologische Kategorie	Definierte Gene in der Signatur	Enrichment Score	p-Wert (GSEA)	FDR (GSEA)
Blood_Module-3.5_Undetermined	Zelluläre Differenzierung	13	0,716	0,1481	19,2%
Epithelium_Node5693	Zelluläre Differenzierung	9	0,677	0,0818	25,9%
MHC_classII_Node528	Zellulärer Prozess	8	0,670	0,2074	30,8%
Erythrocytic_Node1660	Zelluläre Differenzierung	14	0,651	0,0663	50,6%
Ribosomal_protein	Zellulärer Prozess	19	0,602	0,0547	21,6%
MHC_classII_DLBC	Tumorspezifisch	8	0,599	0,2472	12,4%
Normal_mesenchymal-2_Node1615	Zelluläre Differenzierung	10	0,564	0,2225	7,2%
Follicular_lymphoma_Immune_Response2	Tumorspezifisch	24	0,556	0,0639	15,4%
Glutamine_Glucose_starve_both_up	Zellulärer Prozess	10	0,556	0,3364	23,2%
Metallothionein_Node595	Zellulärer Prozess	8	0,533	0,5974	14,9%
Hematopoietic_Node1659	Zelluläre Differenzierung	18	0,514	0,1819	11,8%
Adrenal_cortex_Node4284	Zelluläre Differenzierung	16	0,513	0,1630	17,7%
Lung_Node3969	Zelluläre Differenzierung	15	0,513	0,2481	3,5%

Hochregulierte Signaturen	Physiologische Kategorie	Definierte Gene in der Signatur	Enrichment Score	p-Wert (GSEA)	FDR (GSEA)
Lipid_enzyme_Node3152	Zellulärer Prozess	8	-0,866	0,0012	0,1%
GCB_gt_ABC_Affy	Tumorspezifisch	10	-0,658	0,0955	9,5%
Immediate_early	Zellulärer Prozess	9	-0,644	0,1728	17,6%
TGFbeta_down_epithelial_small	Signaling pathway	10	-0,576	0,1561	15,6%
Epithelium_Node1413	Zelluläre Differenzierung	11	-0,538	0,3301	16,5%
Blood_Module-1.6_Undetermined	Zelluläre Differenzierung	32	-0,509	0,0568	16,4%
Quiescence_heme_cluster3	Zellulärer Prozess	12	-0,509	0,3054	10,2%

Angereicherte Signaturen mit einem *Enrichment Score* von $\leq -0,5$ bzw. $\geq 0,5$.
GSEA *Gene Set Enrichment Analysis*; FDR *False Discovery Rate*

Tabelle 10.6: Differenziell regulierte Gensignaturen nach *NFATc1* shRNA #2-Expression.

Herunterregulierte Signaturen	Physiologische Kategorie	Definierte Gene in der Signatur	Enrichment Score	p-Wert (GSEA)	FDR (GSEA)
Epithelium_Node5693	Zelluläre Differenzierung	9	0,618	0,1944	12,0%
Erythrocytic_Node1660	Zelluläre Differenzierung	14	0,604	0,1345	18,5%
Metallothionein_Node595	Zellulärer Prozess	8	0,589	0,4426	44,3%
NK_U133plus	Zelluläre Differenzierung	33	0,572	0,0217	10,9%
Liver_fetal_lung_Node1634	Zelluläre Differenzierung	32	0,559	0,0164	19,0%
Follicular_lymphoma_Immune_Response2	Tumorspezifisch	24	0,552	0,0869	8,7%
Normal_mesenchymal-2_Node1615	Zelluläre Differenzierung	10	0,525	0,3196	5,3%
Epithelial_keritin_Node1641	Zelluläre Differenzierung	19	0,510	0,2328	9,8%

Hochregulierte Signaturen	Physiologische Kategorie	Definierte Gene in der Signatur	Enrichment Score	p-Wert (GSEA)	FDR (GSEA)
MHC_classII_Node528	Zellulärer Prozess	8	-0,778	0,1131	14,6%
MHC_classII_DLBCl	Tumorspezifisch	8	-0,701	0,1542	15,8%
Notch_T-ALL_down_Palomero	Signaling pathway	14	-0,634	0,0348	3,5%
Immediate_early	Zellulärer Prozess	9	-0,598	0,2485	17,1%
GC_T_helper_up_Kim	Zelluläre Differenzierung	63	-0,566	0,0010	0,1%
PMBLhigh_HLlow	Tumorspezifisch	9	-0,552	0,3287	11,0%
Epithelium_Node1413	Zelluläre Differenzierung	11	-0,549	0,2290	3,8%
Blood_Module-3.4_Undetermined	Zelluläre Differenzierung	299	-0,532	0,0010	0,1%
Blood_Module-1.6_Undetermined	Zelluläre Differenzierung	32	-0,519	0,0356	2,4%
STAT3_up_OCILy10	Tumorspezifisch	42	-0,512	0,0106	5,9%
STAT3_up_OCILy10	Transkriptionsfaktor	42	-0,512	0,0106	1,1%
Blood_Module-2.9_Undetermined	Zelluläre Differenzierung	150	-0,512	0,0010	0,1%
Quiescence_heme_cluster3	Zellulärer Prozess	12	-0,510	0,2893	7,2%
Proliferation_Node1640	Zellulärer Prozess	56	-0,503	0,0051	4,5%
Blood_Module-3.9_Undetermined	Zelluläre Differenzierung	243	-0,501	0,0010	0,1%

Angereicherte Signaturen mit einem *Enrichment Score* von $\leq -0,5$ bzw. $\geq 0,5$.

GSEA *Gene Set Enrichment Analysis*; FDR *False Discovery Rate*

Tabelle 10.7: Weitere NF- κ B-Signaturen werden in der GSEA nicht angereichert.

Signaturname	Physiologische Kategorie	Definierte Gene in der Signatur	Enrichment Score	p-Wert (GSEA)	FDR (GSEA)
NFkB_Up_OCILy3_only	NF- κ B	10	-0,527	0,3507	35,1%
NFkB_Up_BCR_paper	NF- κ B	68	-0,493	n.b.	n.b.
NFkB_Up_OCILy10_only	NF- κ B	19	-0,390	n.b.	n.b.
NFkB_Up_HBL1	NF- κ B	220	-0,402	n.b.	n.b.
NFkB_Up_bothOCILy3andLy10	NF- κ B	39	-0,399	n.b.	n.b.
NFkB_Up_all_OCILy3_Ly10	NF- κ B	68	-0,387	n.b.	n.b.
NFkB_Up_K1106	NF- κ B	17	-0,313	n.b.	n.b.
NFkB_ChIPCHIP_Young_5factors	NF- κ B	15	-0,273	n.b.	n.b.
NFkB_ChIPCHIP_Young_all	NF- κ B	344	-0,194	n.b.	n.b.
NFkB_ChIPCHIP_Young_4factors	NF- κ B	37	-0,203	n.b.	n.b.

Der p-Wert und die FDR wurden für Signaturen mit einem *Enrichment Score* von $\leq -0,5$ bzw. $\geq 0,5$ berechnet. Ein *Enrichment Score* zwischen diesen beiden Werten wurde nicht als Anreicherung und somit nicht als signifikant gewertet. GSEA *Gene Set Enrichment Analysis*; FDR *False Discovery Rate*; n.b. *nicht berechnet*