

Aus dem Institut für Immunologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof Dr. T. Brocker

und

dem Institut für  
molekulare Immunologie der GSF  
Leiterin: Prof. Dr. D. Schendel

**Hämatologische Neoplasien**  
**in einem transgenen Mausmodell:**  
**Ein Modell für das Hodgkin-Lymphom?**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Silke Heike Raffegerst**

aus

**Coburg**

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Johnson  
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. Spiekermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. A. W. Rupp  
Priv. Doz. Dr. R. Kappler

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. D. Schendel

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2007

Inhaltsverzeichnis	1
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Die Biologie des Hodgkin-Lymphoms</b>	<b>9</b>
1.1.1. Ursprung und Klonalität des Hodgkin-Lymphoms	9
1.1.2. Epstein-Barr-Virus (EBV) und andere Kandidatenviren	10
1.1.3. Analyse von Onko- und Tumorsuppressorgenen	11
1.1.4. Konstitutive Aktivität von NF $\kappa$ B im Hodgkin-Lymphom	12
1.1.5. H/RS-Zellen und das umgebende Infiltrat	13
1.1.6. Relevante Mausmodelle für das Hodgkin-Lymphom	15
<b>1.2. Die transgene DR4-IE-Maus</b>	<b>16</b>
1.2.1. Die transgene DR4-Maus (DR4-P) – ein Mausmodell für Diabetes?	21
1.2.2. Die transgene DR4-P-Maus – eher ein Mausmodell für hämatopoietische Tumoren	21
<b>2. Aufgabenstellung</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Mechanismen der Tumorentstehung</b>	<b>24</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Mögliche Mechanismen der Tumorentstehung in DR4-P-Mäusen</b>	<b>29</b>
3.1.1. Aktivierung des ekotropischen, endogenen Emv-2-Provirus?	29
3.1.2. Infektion durch das gamma-Herpesvirus MHV-68?	31
3.1.2.1. Kultivierung von Tumorzellen auf BKH21-Fibroblasten und Untersuchung des Tumorsерums auf NIH3T3-Zellen	33
<b>3.2. Bestimmung des Integrationsortes des DR4-Transgens</b>	<b>35</b>
3.2.1. <i>In silico</i> Rekonstruktion der DR4-alpha- und beta-Konstrukte für die Generierung von Exon-2-spezifischen Sonden	35
3.2.2. Lokalisation des Transgens mittels FISH-Analyse	37
3.2.3. „Genom Walking“ – vom Transgen zum exakten Integrationsort?	39
3.2.4. Wie viele Konstrukte sind integriert?	43
3.2.5. Die entferntere Nachbarschaft des Integrationsortes	46

<b>3.3. Zucht der DR4-F1 Generation .....</b>	<b>49</b>
3.3.1. Tumorentstehung in DR4-F1-Mäusen .....	49
3.3.2. Vergleich der Tumorfrequenz in Abhängigkeit vom Alter zwischen DR4-P- und DR4-F1-Mäusen .....	52
3.3.3. Generelle Unterschiede zwischen DR4-P- und DR4-F1-Mäusen .....	55
3.3.3.1. Untersuchungen des Geburtsgewichtes bei Neugeborenen .....	56
<b>3.4. Chromosom 16 – Der Ursprung der Tumorentwicklung? .....</b>	<b>57</b>
3.4.1. Das Kandidaten-Onkogen Trat1 (Trim) .....	57
3.4.2. Untersuchungen der Trat1- Genexpression .....	58
<b>3.5. Liegt in DR4-P-transgenen Mäusen eine Störung in der Hämatopoiese       vor? .....</b>	<b>64</b>
3.5.1. Untersuchung der Hämatopoiese des Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie ..	65
3.5.2. Untersuchung der Differenzierungskapazität von Stamm- und Vorläuferzellen .....	70
3.5.2.1. Kolonie-Assay der myeloischen Linie .....	71
3.5.2.2. Kolonie-Assay der Prä-B-Zellen .....	73
3.5.3. Untersuchung von peripheren Zellen im Schwanzblut .....	74
3.5.4. Untersuchung der lymphoiden Organe (Lymphknoten, Milz, Thymus) und des peripheren Blutes .....	78
<b>3.6. Nähere Untersuchungen der verschiedenen Tumoren .....</b>	<b>87</b>
3.6.1. Analyse der sezernierten Zytokine .....	87
3.6.2. Untersuchung verschiedener Transkriptionsfaktoren in klassifizierten Tumoren der DR4-P-Generation .....	90
3.6.3. Sind die entstandenen Tumoren monoklonal oder oligoklonal? .....	95
3.6.3.1. Klonalität der T-Zell Tumoren .....	95
3.6.3.2. Klonalität der B-Zell-Tumoren .....	102
<b>3.7. Hodgkin Lymphome in der DR4-P-Maus .....</b>	<b>109</b>
3.7.1. Konalität der begleitenden Tumoren von Mäusen mit diagnostiziertem Hodgkin- Lymphom .....	111
<b>3.8. Untersuchung möglicher Signalwege in der Entwicklung von       hämatopoietischen Tumoren der DR4-P-Mäuse .....</b>	<b>118</b>
3.8.1. Der NF $\kappa$ B-Signalweg .....	118

3.8.2.	Untersuchung des IKK-Signalosoms .....	124
3.8.3.	Mutationen in IKK-Komplex-Genen? .....	126
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>127</b>
<b>4.1.</b>	<b>Mechanismen der Tumorentstehung .....</b>	<b>127</b>
<b>4.2.</b>	<b>Grundlegende Unterschiede zwischen DR4-P-, DR4-F1- und Bl6-Kontrollmäusen .....</b>	<b>134</b>
<b>4.3.</b>	<b>Unterschiede in der Tumorentwicklung von DR4-P- und DR4-F1-Mäusen .....</b>	<b>136</b>
<b>4.4.</b>	<b>Untersuchungen der Tumoren aus DR4-P-Mäusen .....</b>	<b>137</b>
4.4.1.	Zytokine .....	137
4.4.2.	Transkriptionsfaktoren .....	139
4.4.3.	Überexprimierte und herunterregulierte Gene im NF $\kappa$ B-Array .....	141
4.4.4.	Mutationen in IKK-Komplex-Genen .....	144
4.4.5.	Onkogen Trat1 .....	145
<b>4.5.</b>	<b>Klonalität der Tumoren .....</b>	<b>147</b>
4.5.1.	Lymphoblastoide T-Zell-Lymphome .....	147
4.5.2.	Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome .....	148
4.5.3.	Hodgkin-Lymphome .....	148
<b>5.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>153</b>
<b>6.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>156</b>
6.1.	Probenaufbereitung der Maus-Organe .....	156
6.2.	RNA Isolierung (Tri-Reagent) .....	156
6.3.	RNA-Isolierung mit dem QIAgen RNeasy-Kit .....	157
6.4.	DNase-Verdau .....	157
6.5.	DNA-Isolierung aus Einzelzellsuspensionen .....	158
6.6.	Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren .....	158
6.7.	cDNA Synthese mit dem AMV-Kit der Firma Roche .....	158
6.8.	cDNA-Synthese mit Superarray-Kit .....	159
6.9.	Primerdesign und Arbeitslösung .....	160
6.10.	NF $\kappa$ B-Array mit dem RT2-Profiler-Kit der Firma Superarray .....	161

6.11.	PCR mit anschließender Fragmentanalyse .....	162
6.12.	Genome Walking auf DNA Ebene .....	163
6.13e	Analyse des TZR-V $\beta$ -Repertoires .....	163
6.14.	PCR für IgH-Umlagerungen .....	165
6.15.	Quantitative PCR – Genexpressionsanalyse .....	165
6.16.	PCR für die Detektion von $\gamma$ -Herpesviren-DNA .....	167
6.17.	Klonierung .....	168
6.18.	Plasmid-Amplifikation .....	168
6.19.	Enzym-Restriktionsverdau .....	168
6.20.	Kolonien-PCR („Colony“-PCR) .....	169
6.21.	Multiplex-PCR zur Bestimmung der Anzahl der integrierten Konstrukte .....	170
6.22.	Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten .....	171
6.23.	Gel Extraktion von PCR-Amplifikaten .....	171
6.24.	Sequenzierung .....	171
6.25.	FISH-ANALYSE .....	171
6.26.	Southern-Blot nach Southern – Nachweis endogener Retroviren .....	178
6.27.	Histologie .....	180
6.28.	Immunhistochemie .....	180
6.29.	Mausstämme .....	181
6.30.	Präparation von Blutserum aus Mäuseblut .....	181
6.31.	Luminex-System zur Bestimmung von Zytokinen aus Seren .....	181
6.32.	Magnetische Anreicherung von T- und B-Zellen .....	182
6.33.	Durchflusszytometrie (FACS) .....	183
6.34.	Colony-Forming Unit (CFU)-Assay (Kolonie-Assay) .....	184
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>186</b>
<b>Danksagung .....</b>		<b>196</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>197</b>
A)	Primerliste .....	197
B)	Antikörperliste .....	200
C)	Liste der im NF $\kappa$ b-Array überexprimierten – oder herunterregulierten Gene.....	202
D)	Veröffentlichungen .....	213
E)	Lebenslauf .....	214

**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle ("antigen-presenting cell")
Bl6	C57BL6-Mausstamm
BSA	Rinderserumalbumin ("Bovine Serum Albumin")
bp	Basenpaar
BZR	B-Zell-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
CD	Differenzierungscluster ("cluster of differentiation")
CDR	"complementarity determining region"
CMV	Zytomegalie-Virus
DZ	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLBZL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DLBZL-HA	Histiozytenreiches diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
DR4-P	Parentaler DR4-IE-Mausstamm
DR4-F1	F1-Generation der DR4-P-Mäuse
EBV	Epstein-Barr-Virus
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zell-Sorter ("Fluorescence Activated Cell Sorter")
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
GEMm	Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten/Makrophagen
GM	Granulozyten und Makrophagen
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
HL	Hodgkin-Lymphom
HPLC	"High Performance Liquid Chromatography"
H/RS	Hodgkin/Reed-Sternberg
HSZ	Hämatopoietische Stammzellen
KCl	Kaliumchlorid
KSL	Stammzellen, die positiv für ckit, Sca1 und für „Lineage“ negativ sind
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	Destilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IgH	Schwere Immunglobulinkette
IL	Interleukin

kb	Kilobasen
LB	Luria Bertani
LC	Light Cycler
LT-HSZ	Langzeit-Wiederherstellungsfähige hämatopoietische Stammzelle („long term-reconstituting hematopoietic stemcell“)
LTZL	Lymphoblastoides T-Zell-Lymphom
MB	Megabasen
ME	Megakaryozyten und Erythrozyten
MEM	Modifiziertes Eagle-Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major-Histocompatibility-Complex“)
MHV	Murines-Herpes-Virus
NK	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PB	Pacific Blue
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
SMZL	Marginalzonen-Lymphom aus der Milz („splenic marginal-zone lymphoma“)
ST-HSZ	Kurzzeit-Wiederherstellungsfähige hämatopoietische Stammzelle („short term-reconstituting hematopoietic stemcell“)
UpM	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RTF	Regulatorischer Transkriptionsfaktor
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt („severe combined immune deficiency“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus (Bakterium)
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tg	Transgen
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen



## Zusammenfassung

Transgene Mäuse, die ein chimäres HLA-DR4-IE-Klasse-II-Gen exprimierten und mit MHC-Klasse-II-defizienten Mäusen rückgekreuzt wurden, entwickelten spontan hämatologische Tumoren, mit einer Frequenz von 69,5%. Dies wurde mit Hilfe von phänotypischen FACS-Analysen sowie histopathologischen und immunhistologischen Untersuchungen bestätigt. Die Aktivierung eines endogenen Provirus sowie die MHC-Klasse-II-Immundefizienz kamen zunächst als mögliche Ursachen für die hohe Inzidenz an hauptsächlich lymphoiden Tumoren (B-Zell-Tumoren 26,7%, T-Zell-Tumoren 25,2%) in Frage. Diese Ursachen konnten jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Darüber hinaus zeigten die meisten T-Zell-Tumoren (66,6%) einen  $CD4^+CD8^-$ -Phänotyp, wohingegen die B-Zell-Tumoren hauptsächlich einen reifen ( $IgM^+IgD^+$ ; 37,5%) Phänotyp aufwiesen. Es wurde eine DR4-F1-Generation gezüchtet, die ebenfalls mit einer hohen Frequenz (52,8%) Tumoren entwickelten. Die DR4-F1-Mäuse waren heterozygot in Bezug auf das chimäre MHC-Klasse-II-Gen, besaßen aber einen normalen MHC-Klasse-II-Haplotyp. Dadurch konnte ein Onkogeneffekt als primäre Ursache für die Tumorentstehung bestimmt werden. Unter den hämatologischen Tumoren wurden auch erstmalig murine Hodgkin-ähnliche Tumoren detektiert, die als Charakteristikum  $CD30^+$ -Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen mit einer Frequenz von 1% der Tumormasse aufwiesen. In der DR4-Generation konnten etwa 9,9% der erkrankten Mäuse mit diesen Hodgkin-ähnlichen Tumoren diagnostiziert werden, in der DR4-F1-Generation noch etwa 6,1%. Im humanen System werden in etwa 40% der Hodgkin-Lymphome (HL) Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) nachgewiesen. Dagegen konnte in den DR4-Mäusen eine Infektion mit dem murinen Ortholog MHV-68 ausgeschlossen werden. Hier kam als Ursache für die Tumorentstehung eventuell ein ähnlicher Mechanismus in Frage wie bei den 60% der HL-Patienten, die EBV negativ sind. Für die EBV-negativen HL-Patienten wird ein Onkogen oder Tumorsuppressorgen als Kandidat für die Entstehung der Hodgkin-Lymphome vermutet. Die Annahme, dass durch die Transgen-Integration der Locus eines Proto-Onkogens getroffen wurde, konnte in den DR4-Mäusen nicht bestätigt werden. Mittels FISH-

Analyse und Genome-Walking wurde die exakte Integrationsstelle des Transgens in Chromosom 16 (B4) bestimmt, die allerdings nicht in einem kodierenden Bereich eines bekannten Gens erfolgte. Zudem war die Integration der DR4-IE $\alpha$ - und IE $\beta$ -Konstrukte in nur dieser einen Stelle des Genoms erfolgt, allerdings mit unterschiedlicher Kopienanzahl der Konstrukte (Verhältnis alpha:beta etwa 1:5). Zudem konnte ein Onkogen-Kandidat ermittelt werden, der im Vergleich zu C57BL6-Mäusen in Tumorproben der DR4-Mäuse überexprimiert war und nur 8,7 MB von der Integrationsstelle entfernt lag. Hierbei wurde vermutet, dass das Kandidaten-Onkogen über so genannte „long-range“-Effekte durch multiple Kopien des integrierten Transgens beeinflusst worden sein könnte. Es stellte sich heraus, dass aber nicht alle DR4-Mäuse in einem höheren Alter (6-12 Monate) Tumoren entwickelten, diese zudem hauptsächlich monoklonalen Ursprungs waren und in jedem Entwicklungsstadium der Lymphozyten auftraten. Das führte zu der Annahme, dass noch zusätzliche Ereignisse aufgetreten sein mussten, um die Tumorentstehung zu begünstigen. Die Klonalität der Tumoren konnte durch die Charakterisierung der T-Zell-Rezeptor- und IgH-Umlagerungen bestimmt werden. Zusätzlich wurden die Tumoren auf die Sezernierung von Zytokinen und für das hämatopoietische System relevante Transkriptionsfaktoren untersucht, wobei hierbei keine bedeutenden Beobachtungen gemacht werden konnten. Vergleichende immunphänotypische Untersuchungen zwischen gesunden jungen DR4-Mäusen und C57BL6-Kontrollmäusen ergaben eine massive Erhöhung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zwischen 28%-55% in Blut, Lymphknoten, Milz und Thymus sowie eine reduzierte Anzahl von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen in den DR4-Mäusen, die sich zusätzlich auf eine unzureichende Anti-Tumorantwort der DR4-Mäuse auswirken könnte. Als Ursache für diese Verschiebung des CD4/CD8-Verhältnisses wird die chimäre MHC-Klasse-II-Expression vermutet.

Nach der vollständigen Aufklärung des Mechanismus, der zu der Entstehung von Hodgkin-ähnlichen Tumoren führt, soll deshalb die DR4-Maus als erstes Maus-Modell für das Hodgkin-Lymphom eingeführt werden.

## **1. Einleitung**

### **1.1. Die Biologie des Hodgkin-Lymphoms**

Das charakteristische Merkmal für die Diagnose des Hodgkin-Lymphoms (HL) ist das Auffinden einer geringen Anzahl von riesigen und häufig multinukleären Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen (H/RS). Diese werden meist in einem für die H/RS-Zellen typischen zellulären Infiltrat aufgefunden (Weiss et al., 1999). Der Anteil der H/RS-Zellen an den Gesamtzellen im Tumor beträgt in der Regel weniger als 1%, während sich die infiltrierenden Zellen hauptsächlich aus normalen gesunden T- und B-Zellen, Plasmazellen, Histiozyten, Eosinophilen und Neutrophilen zusammensetzen (Hansmann et al., 1999).

Mit einer Inzidenz von nur ca. 2 – 4 Patienten auf 100.000 pro Jahr ist das HL eine eher selten auftretende maligne Erkrankung. Die Hodgkin-Lymphome werden in zwei verschiedene Entitäten unterteilt: Das klassische HL, das etwa in 95% aller Fälle diagnostiziert wird, und das Lymphozyten-prädominante HL (Harris et al., 1999).

Zudem wird das klassische HL aufgrund pathologischer Unterschiede im Tumorgewebe in vier verschiedene Subtypen unterteilt: Nodulär sklerotisierendes HL (ca. 60-80%), Gemischtzelliges HL (ca. 15-30%), Lymphozyten-reiches HL und Lymphozyten-armes HL (ca. 1%) (Harris et al., 1999).

H/RS-Zellen weisen meist einen unklaren Immunphänotyp auf, der sich keinem anderen hämatopoetischen Zelltyp zuordnen lässt. So exprimieren H/RS-Zellen zum Beispiel das CD30-Protein auf der Oberfläche, aber nur in wenigen Fällen auch andere B-Zell-Marker (Watanabe et al., 2000; Re et al., 2001; Stein et al., 2001).

#### **1.1.1 Ursprung und Klonalität des Hodgkin-Lymphoms**

Der Ursprung und die klonale Verwandtschaft der H/RS-Zellen blieben für lange Zeit ungeklärt. Erst Küppers und Kollegen konnten durch die Isolierung einzelner H/RS-Zellen mittels „Mikro-Laser-Capture-Manipulation“ die Frage nach dem Ursprung und der Klonalität der H/RS-Zellen klären (Küppers et al., 1998). Durch die spezifische Amplifikation der VDJ-

Umlagerungen des IgH-Lokus konnte festgestellt werden, dass die H/RS-Zellen in den meisten Fällen von B-Zellen abstammten. Die somatische Hypermutation in H/RS-Zellen deutete auf einen direkten Ursprung dieser Zellen aus Keimzentrums-B-Zellen hin. Des Weiteren wies das Muster der somatischen Mutationen in der IgH-V-Region der H/RS-Zellen auf die Selektion eines funktionellen B-Zell-Rezeptors (BZR) hin (Küppers et al., 2002). In H/RS-Zellen wurden in 25% der analysierten Fälle inaktivierende Mutationen identifiziert. Das sind zum Beispiel Stop-„Codons“, Deletionen oder Insertionen, die zur Verschiebung des Leserasters führen (Küppers et al., 2002). B-Zellen, die die Expression ihres BZR verlieren, sterben im Normalfall durch Apoptose ab (Lam et al., 1997). Daher war die Identifizierung von H/RS-Zellen, die den Verlust des BZR durch die somatische Hypermutation überleben konnten, sehr ungewöhnlich, denn auch in diesen Zellen wäre die Induktion von Apoptose zu erwarten. Dies führte zu der Annahme, dass H/RS-Zellen generell von Keimzentrums-B-Zellen abstammen. Diese haben ihre Fähigkeit einen funktionellen BZR auszuprägen aufgrund „verkrüppelter“ Mutationen („crippled mutations“) verloren und daraufhin die Apoptose eingeleitet. Wegen dieses Phänomens wurden diese Zellen als prä-apoptische Keimzentrums-B-Zellen bezeichnet (Kanzler et al., 1996; Küppers et al., 1998).

### **1.1.2 Epstein-Barr-Virus (EBV) und andere Kandidatenviren**

EBV ist ein gamma-Herpesvirus mit dem mehr als 90% aller Menschen weltweit infiziert sind. Die primäre Infektion in der Kindheit verläuft normalerweise ohne Symptome. Nach der Infektion verbleibt das Virus mit einer Frequenz von etwa einer infizierten Zelle pro  $10^5$ - $10^6$  B-Zellen latent in Gedächtnis-B-Zellen erhalten (Khan et al., 1996). Das EBV exprimiert latente Membranproteine (LMPs) in diesen B-Zellen, die die Funktion des BZR übernehmen können. Dadurch können infizierte B-Zellen überleben, obwohl sie keinen funktionellen BZR tragen. Das fehlende BZR-Signal würde normalerweise dazu führen, dass diese Zellen in Apoptose gehen. Bei einer Infektion im jungen Erwachsenenalter durch Tröpfchenübertragung kann es zur Ausbildung der infektiösen Mononukleose kommen, die

deshalb auch als „kissing disease“ bekannt ist. Menschen, die an einer infektiösen Mononukleose erkrankt waren, haben später ein signifikant höheres Risiko ein HL zu entwickeln (Hjalgrim et al., 2000). In ca. 40% der HL-Patienten sind die H/RS-Zellen nachweislich mit dem EBV infiziert (Diehl et al., 2002). In den verbleibenden 60% müssten demnach andere Ereignisse zu dieser Erkrankung führen. Lange Zeit wurde nach anderen Pathogenen, speziell Viren, gesucht, die eine Rolle in der Entstehung des HL spielen könnten. Allerdings konnte keine Infektion mit anderen Herpesviren, Papovaviren oder Adenoviren nachgewiesen werden (Armstrong et al., 1998; Jarrett et al., 1999). Erst in den vergangenen Jahren sind Arbeiten erschienen, die einen Zusammenhang mit Masernviren oder Cytomegaloviren nahelegten (Benharroch et al., 2003; Huang et al., 2002). Die Gruppe von Prof. Ralf Küppers konnte diese Ergebnisse trotz Verwendung des gleichen Patientenmaterials jedoch nicht bestätigen (Vortrag von Ralf Küppers im Oktober 2006 in München; unveröffentlichte Daten), so dass die Rolle von Masernviren im HL als eher unwahrscheinlich zu betrachten ist.

### **1.1.3 Analyse von Onko- und Tumorsuppressorgenen**

Bislang gab es nur einige wenige Studien zu Mutationen in Onko- oder Tumorsuppressorgenen beim HL. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Notwendigkeit, einzelne H/RS-Zellen zu analysieren. Einzelzellstudien wurden bisher für die folgenden Gene durchgeführt: N-ras, p53, CD95 und für I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor von NF $\kappa$ B). Für das N-ras Proto-Onkogen konnten keine Mutationen identifiziert werden (Trümper et al., 1996), zudem wurde nur eine geringe Anzahl von Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 beschrieben (Maggio et al., 2001; Montesinos-Rongen et al., 1999). Des Weiteren konnten nur in etwa 10% der HL-Fälle Mutationen detektiert werden, die den Apoptose-induzierenden Rezeptor CD95 inaktivieren (Müschen et al., 2000; Maggio et al., 2003). Auch das I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen wurde aufgrund einer konstitutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B auf Mutationen hin analysiert. Allerdings konnten auch hier nur in fünf von insgesamt 23

analysierten HL-Fällen inaktivierende Mutationen in I $\kappa$ B $\alpha$  nachgewiesen werden (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Jungnickel et al., 2000). Erst in den letzten Jahren wurden einige wenige Studien der Genexpressionsprofile von HL-Linien, Primär-Tumoren, Non-Hodgkin-Linien und anderen Kontrolllinien mittels Affymetrix-Mikroarray bzw. der SAGE-Technologie (serielle Analyse der Genexpression) beschrieben (Küppers et al., 2003; Schwering et al., 2003). Insgesamt konnten mit Hilfe dieser Studien einige „neue“ Gene gefunden werden, die in H/RS-Zellen (Primär-Tumoren) gegenüber den Kontrollen hochreguliert waren: So zum Beispiel das Proto-Onkogen rhoC, ATBF1 und p21<sup>SNFT</sup> (Schwering et al., 2003) und das Tumor-Antigen PRAME, IPL, FER, Rab13 und EAR3 (Küppers et al., 2003). Ob in diesen Genen Mutationen vorliegen und inwieweit diese die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms beeinflussen könnten, wurde aber bis heute nicht beschrieben. Die Suche nach dem Kandidaten-Onko- oder Suppressorgen bleibt deshalb ein essentieller Faktor in der Erforschung des Hodgkin-Lymphoms.

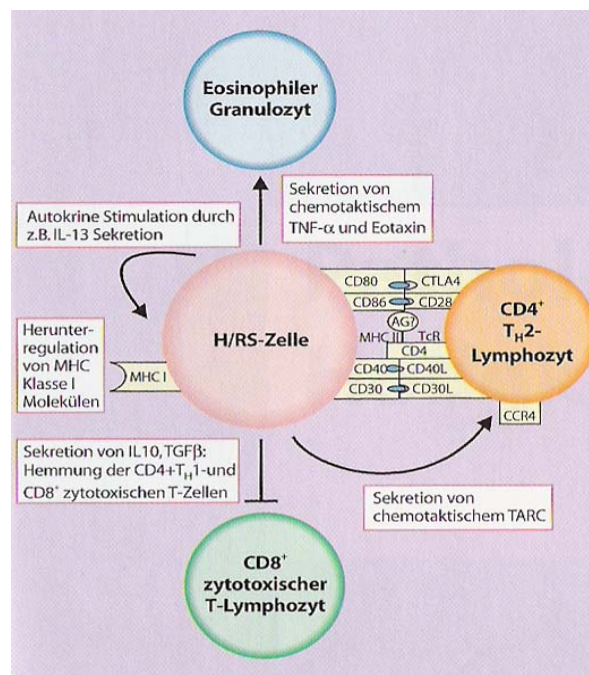
#### **1.1.4 Konstitutive Aktivität von NF $\kappa$ B im Hodgkin-Lymphom**

Eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B kann in fast allen Fällen des HL nachgewiesen werden (Bargou et al., 1997). In den meisten B-Zellen liegt das NF $\kappa$ B durch die Bindung an I $\kappa$ B in inaktiver Form im Zytoplasma vor. Die Aktivierung durch diverse Signale führt zur Phosphorylierung und zur anschließenden Degradierung von I $\kappa$ B. Daraufhin kann NF $\kappa$ B in den Nukleus wandern und dort die Transkription verschiedener Gene aktivieren. Die konstitutive Aktivierung von NF $\kappa$ B ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben der H/RS-Zellen. Ein Hinweis hierfür ist die Verminderung der Aktivität durch die Transfektion eines dominant-negativen Inhibitors der I $\kappa$ B-Familie, der in HL-Zelllinien zur Induktion von Apoptose (Bargou et al., 1997; Hinz et al., 2001) führte. In einem geringen Anteil der HL-Fälle wird die konstitutive NF $\kappa$ B-Aktivität vermutlich durch Mutationen im I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen verursacht. Darüber hinaus konnten in 90% aller HL-Fälle die Zytokine IL-13 und der entsprechende Rezeptor (IL-13R) in einer durch NF $\kappa$ B induzierten, erhöhten Expression

detektiert werden. Daraus folgte die Vermutung, dass sich die H/RS-Zellen durch IL-13 in autokriner Form stimulieren könnten (Kapp et al., 1999; Skinnider et al., 2001).

### 1.1.5 H/RS-Zellen und das umgebende Infiltrat

Ein besonderes Merkmal des Hodgkin-Lymphoms ist die Tatsache, dass H/RS-Zellen nur ca. 1% der Tumormasse repräsentieren. Die restlichen Zellen bestehen aus einem gemischten zellulären Infiltrat. Es existieren Hinweise, dass H/RS-Zellen stark von der Interaktion mit diesem Infiltrat abhängig sind. Diese Hinweise deuten einerseits auf die Schwierigkeit hin, Zelllinien aus primären H/RS-Zellen zu etablieren (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996) und andererseits auf das Unvermögen der H/RS-Zellen in immundefizienten Mäusen anzuwachsen (Kapp et al., 1993; Meggetto et al., 1996). Hier stellt sich folgende Frage: Welcher Art ist diese Interaktion zwischen H/RS-Zellen und dem Infiltrat?



**Abb. 1: Interaktion zwischen H/RS-Zellen und den umliegenden reaktiven Zellen und Zytokinen (aus Diehl et al., 2002).**

H/RS-Zellen und das umliegende Gewebe synthetisieren eine große Anzahl von Molekülen, die für die Interaktion zwischen den H/RS-Zellen und den umliegenden Zellen von großer

Bedeutung sind. H/RS-Zellen sind häufig von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen eng umgeben, die die Liganden der von den H/RS-Zellen exprimierten Moleküle auf der Oberfläche tragen. So werden z.B. die Adhäsionsmoleküle CD58 (ICAM-1) und CD54 (LFA-3) von H/RS-Zellen exprimiert (Delabie et al., 1995). Zudem sind die Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf der Oberfläche von H/RS-Zellen vertreten (Munro et al., 1994). Diese können wiederum an CD28 bzw. CTLA4 auf den umliegenden T-Zellen binden. Die Expression dieser Moleküle stellt vermutlich die Ursache für den starken zellulären Kontakt dar. Die H/RS-Zellen sezernieren zudem das Chemokin TARC, das auch von Dendritischen Zellen (DZ) synthetisiert wird und mit seinem Rezeptor CCR4 auf Th<sub>2</sub>-Zellen interagiert (van den Berg et al., 1999). Die massive Einwanderung von Th<sub>2</sub>-Zellen, die schon häufig in der Pathogenese des HLs festgestellt wurde, könnte somit durch TARC verursacht werden. Neben den oben genannten Adhäsionsmolekülen exprimieren H/RS-Zellen zudem verschiedene Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie (z.B. CD30, CD40) (Fiumara et al., 2001), deren Signale zur Aktivierung von NFκB führt (Skinnider et al., 2002). Von den umliegenden Zellen im Infiltrat werden einige der Liganden dieser Rezeptoren an der Oberfläche präsentiert. So werden zum Beispiel der CD40-Ligand von den umgebenden T-Zellen und der CD30-Ligand von Eosinophilen oder Mastzellen im Tumor exprimiert (Skinnider et al., 2002). Die eosinophilen Zellen scheinen zudem eine besondere Rolle im Infiltrat der HL zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass eosinophile Zellen, die Hauptproduzenten des Chemokins Eotaxin, einen Anti-Tumor-Effekt durch die Infiltration in das Tumorgewebe vermitteln können (Kataoka et al., 2004). Dies erscheint zunächst widersprüchlich, da dies zur Folge haben müsste, dass die Tumorzellen abgetötet werden. Vielleicht trifft hier aber die gleiche Hypothese zu, die schon bei den Th<sub>1</sub>- und zytotoxischen T-Zellen (CTL) beschrieben wurde. Die Hypothese besagt, dass die Tumorzellen durch einen rosetten-förmigen Ring von Th<sub>2</sub>-Zellen abgeschirmt werden. Dieser Th<sub>2</sub>-Ring versorgt die Tumorzellen nicht nur mit notwendigen Signalen und Zytokinen, sondern bietet den Tumorzellen zudem Schutz vor Kontakt mit anderen Zellen, die die Tumorzellen abtöten könnten (Poppema et al., 2000). Zudem wird eine verstärkte



Einwanderung eosinophiler Zellen hauptsächlich in Verbindung mit Th<sub>2</sub>-Zellen beschrieben (Jundt et al. 1999; Rothenberg et al., 2006). Das Zytokin IL-13 und sein Rezeptor (IL-13R) wird, wie oben beschrieben, in H/RS-Zellen in einem Großteil der HL-Fälle synthetisiert (Kapp et al., 1999; Skinnider et al., 2001). IL-13 wird normalerweise von T-Zellen synthetisiert und übt einen starken Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von B-Zellen aus. Der IL-13R wird zudem auf umliegenden Histozyten und Lymphozyten exprimiert (Skinnider et al., 2001). Das von den H/RS-Zellen sezernierte Zytokin IL-13 und der IL-13R könnten also sich selbst und die umgebenden B-Zellen beeinflussen. Weitere Zytokine, die von H/RS-Zellen sezerniert werden, sind unter anderem auch IL-10 und TGF- $\beta$  (Skinnider et al., 2002). Das sind zwei Moleküle, die eine immunsupprimierende Wirkung auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ausüben (Herbst et al., 1996) und somit die Anti-Tumor-Antwort der HL-Patienten beeinflussen könnten.

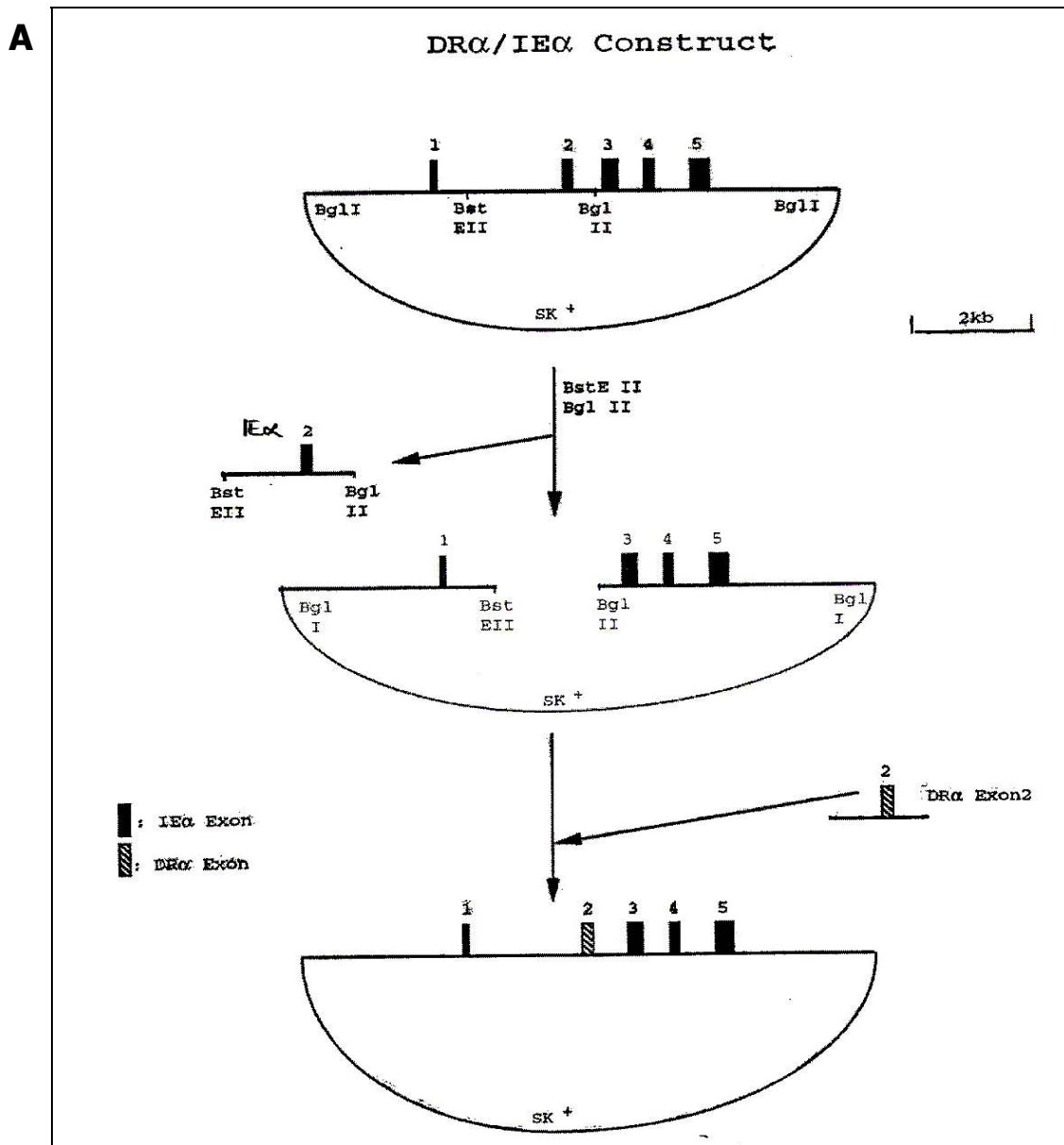
### **1.1.6 Relevante Mausmodelle für das Hodgkin-Lymphom**

Die Etablierung von HL-Zelllinien wird durch enorme Schwierigkeiten eingeschränkt. So sind bis heute etwa nur 13 HL-Zelllinien verfügbar (Drexler et al., 1993; Wolf et al., 1996). Für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien des Hodgkin-Lymphoms ist es aber ganz wesentlich, ein effektives und verlässliches Tiermodell zu etablieren. Momentan gibt es einige verfügbare Tiermodelle, bei denen hauptsächlich immundefiziente SCID-Mäuse verwendet werden (von Kalle et al., 1992; Kapp et al., 1993). Diese Mausmodelle haben allerdings einige Nachteile. So zeigen Tumorbiopsien von HL-Patienten oder von HL-Zelllinien, die in SCID-Mäuse transplantiert wurden, eine geringe „Engraftment“-Effektivität von 23%. Das heißt, dass die transplantierten Zellen sehr schlecht von den SCID-Mäusen angenommen und deshalb sehr oft abgestoßen wurden (von Kalle et al., 1992; Kapp et al., 1993). Aufgrund dieser niedrigen „Engraftment“-Effektivität der Tumorbiopsien wurden die Tumorzellen in den SCID-Mäusen deshalb durch eine EBV-Superinfektion von H/RS-Zellen oder von EBV-infizierten, unbeteiligten („bystander“) Zellen generiert (Kapp et al., 1993;

Ambinder et al., 1999). In einem Ansatz wurden Nude- und SCID-Mäuse unter anderem mit einem Anti-Asialo-GMI-Antikörper behandelt, welcher das Wachstum unterstützt und die angeborene Immunität blockiert. Hierbei konnten 50% der Mäuse erfolgreich transplantiert werden (von Kalle et al., 1992). Dennoch überwiegen im Allgemeinen in diesen Mausmodellen die Nachteile, wie zum Beispiel die niedrige „Engraftment“-Effektivität, das Fehlen der Reproduzierbarkeit und die Notwendigkeit der immunsuppressiven Behandlung. Darüber hinaus gibt es einige transgene Mausmodelle, die durch das Einschleusen chimärer Konstrukte, zum Beispiel von den latenten EBV-Membranproteinen LMP1 und LMP2A, Hodgkin-Lymphome induzieren sollen (Thornburg et al., 2006; Caldwell et al., 2000). Die EBV-Membranproteine LMP1 und LMP2A können das Signal des CD40-Moleküls ersetzen und so eine Aktivierung des BZR imitieren. Das größte Problem dieser Modelle war allerdings, dass diese Mäuse keinen klassischen HL-Phänotyp ausbildeten. Da der Phänotyp aber im Wesentlichen mit der Aufklärung der Mechanismen verbunden ist, die zur Entstehung der Hodgkin-Lymphome führen, sind diese Modelle nur beschränkt einsetzbar.

## **1.2. Die transgene DR4-IE-Maus**

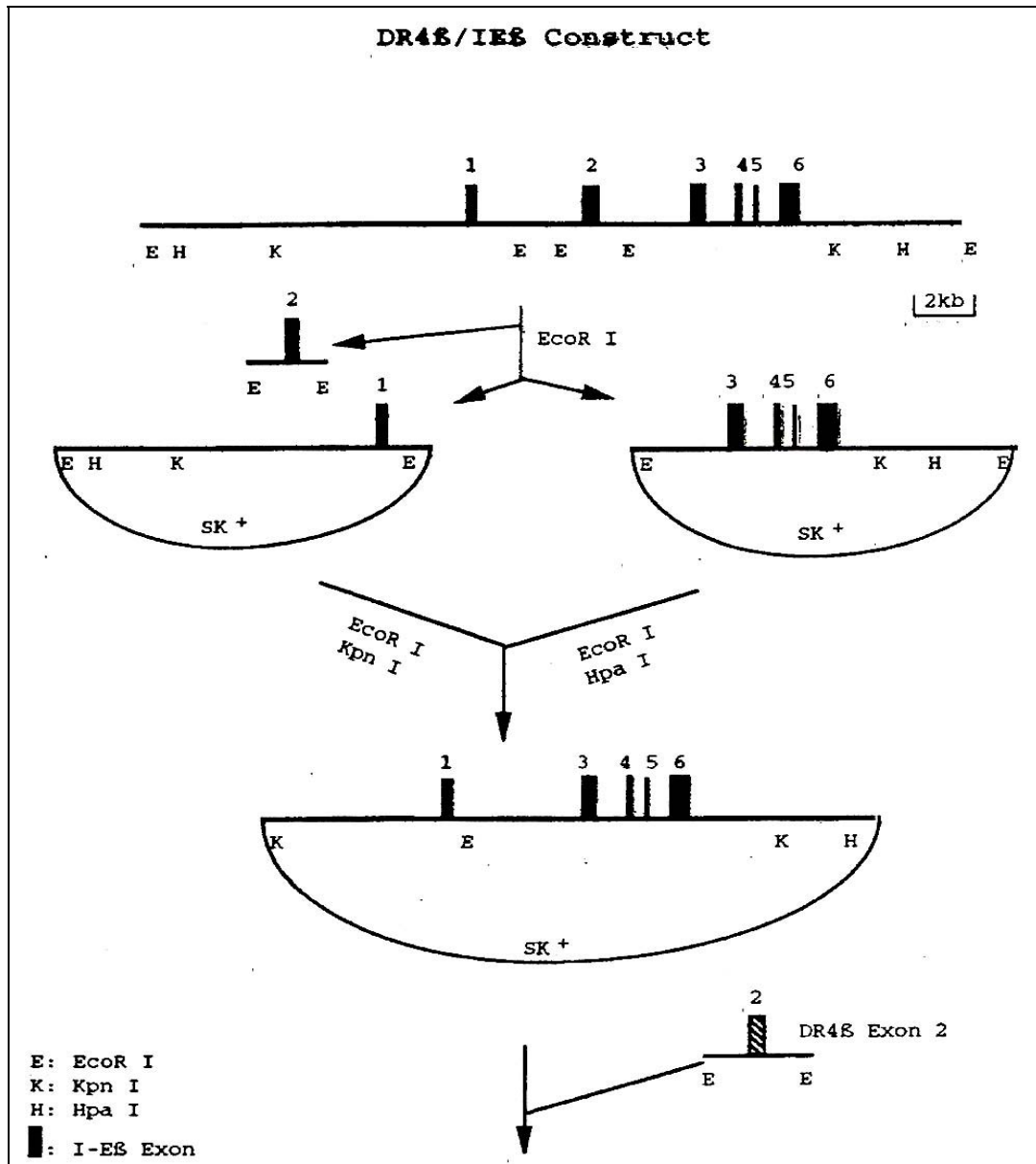
Mittelpunkt dieser Arbeit ist die homozygote transgene DR4-IE-Maus, die 1996 von Prof. Kouicho Ito generiert wurde (Ito et al., 1996) und auf dem genetischen Hintergrund der C57BL6 (Bl6) beruht (H2-E<sup>b</sup>). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Maus als DR4-P-Maus (P für parental) bezeichnet. Das humane HLA-DRB1\*0104-Allel ist mit der Entwicklung autoimmuner Erkrankungen, wie zum Beispiel chronischem Gelenkrheumatismus („Rheumatoid Arthritis“ - RA), multipler Sklerose (MS) und Diabetes assoziiert (Muller-Hilke et al., 2006). In einem Versuch, ein Mausmodell für diese Krankheiten zu etablieren, wurde ein chimäres MHC-Klasse-II-Molekül konstruiert (Abb. 2A und B). Als Transgen (Tg) wurden die kompletten MHC-Klasse-II-Loci, IE $\alpha$  und IE $\beta$  aus einer Balb/c-Maus (H2-E<sup>d</sup>-Haplotyp) verwendet. Die Konstrukte in ihrer Original-Form waren leider nicht mehr verfügbar, aber Prof. Kouichi Ito überließ uns freundlicherweise folgende Konstruktions-Schemata:



**Abb. 2A: Schema der DR4-IE $\alpha$ -Konstruktion.** Das DR4-IE $\alpha$ -Gen besteht aus fünf Exons und die Größe des gesamten Konstruktes beträgt ca. 9,5 kb.

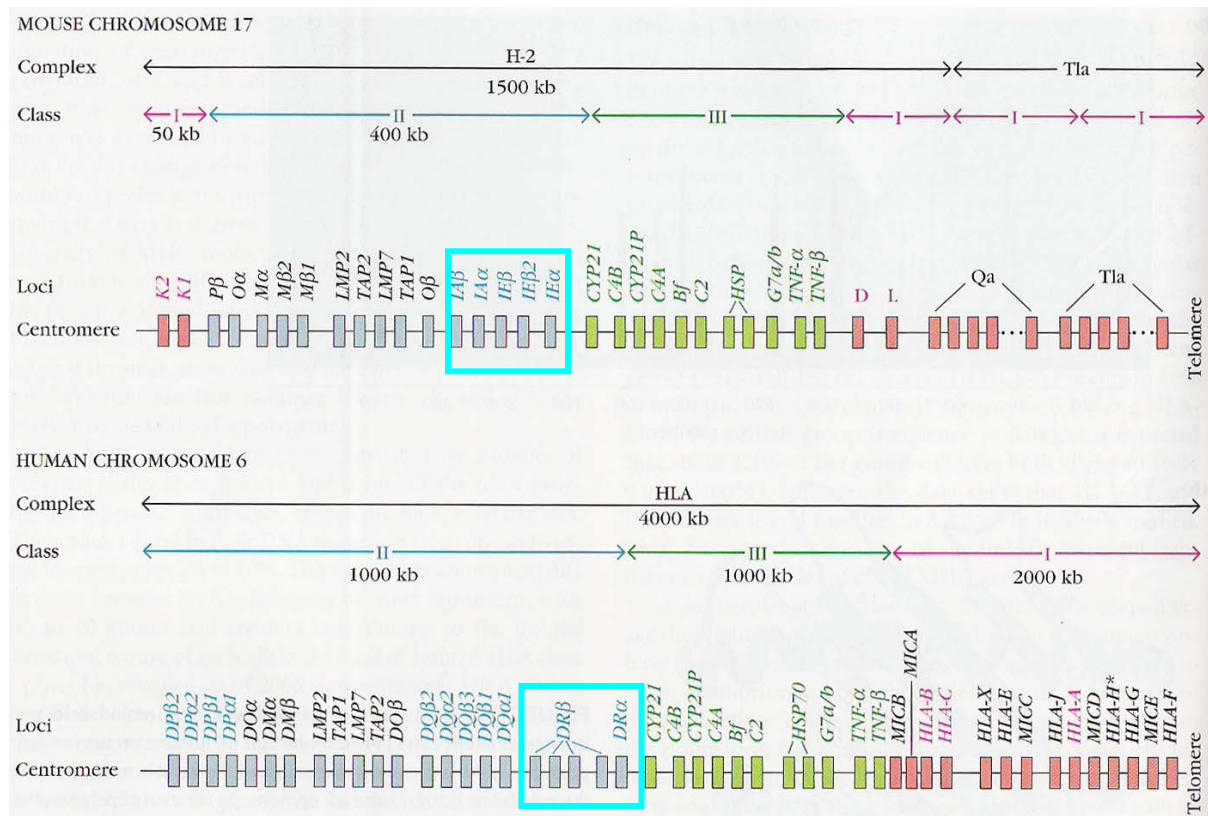
Im oberen Bild (Abb. 2A) ist das Schema der Generierung des DR4-IE $\alpha$ -Konstruktes zu sehen und im darauf folgenden Bild (Abb. 2B) das des DR4-IE $\beta$ -Konstruktes. Im Prinzip wurden bei beiden Konstrukten nur die Exon-2-Regionen der Maussequenzen durch humane Sequenzen ersetzt.

**B**



**Abb. 2B: Schema der DR4-IE $\beta$ -Konstruktion.** Das DR4-IE $\beta$ -Gen besteht aus sechs Exons und die Größe des gesamten Konstrukts beträgt ca. 18 kb.

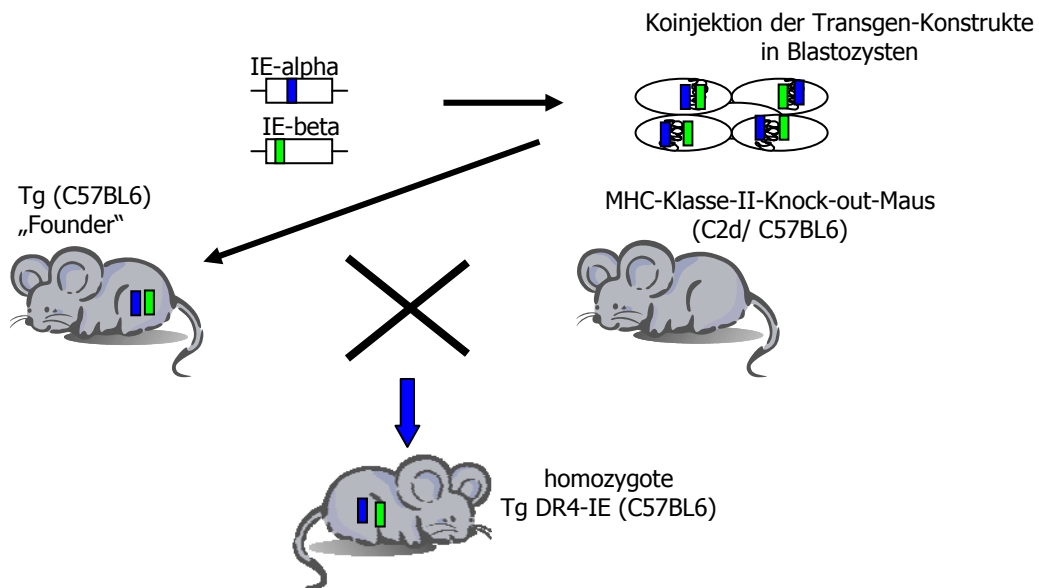
Die Antigen-bindenden Domänen von HLA-DRA\*0101 und HLA-DRB1\*0401 wurden mit den Membran-proximalen Domänen der H2-Ea- und H2-Eb-Loci verbunden. In den IE-alpha und IE-beta-Konstrukten wurde dann das murine Exon-2 durch das entsprechende humane Exon-2 ersetzt.



**Abb. 3: Detaillierte genomische Karte des Maus- und des humanen MHC-Lokus, inklusive klassischer und nicht-klassischer MHC-Moleküle (aus „Kuby Immunology“ 6. Ausgabe)**

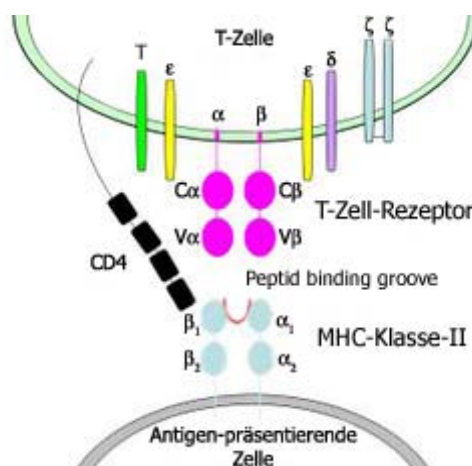
MHC-Klasse-I-Gene sind rot markiert; MHC-II-Gene blau und MHC-III-Gene in grün. Klassische MHC-Klasse-I-Gene sind in roten Buchstaben markiert, klassische MHC-Klasse-II-Gene in blauen und die nicht-klassischen Gene in schwarzen Buchstaben. In den türkisfarbenen Boxen liegen die MHC-Klasse-II-Gene, die bei der DR4-transgenen Maus verwendet wurden.

Mittels Koinjektion wurden die Transgen-Konstrukte in Blastozysten einer C57BL6 Maus transferiert (Ito et al., 1996). Die transgenen „Founder“-Nachkommen wurden anschließend mit einer MHC-Klasse-II-defizienten Maus aus der C2d-Linie gekreuzt, um die Expression endogener muriner MHC-Klasse-II-Proteine zu verhindern. Die C2d-Maus ist heute bekannt als Taconic-Modell C57BL6/NTac-Abbtm1, bei dem der IA-Lokus (IA $\alpha$  und IA $\beta$ ) durch Einbau einer Neo-Kassette deaktiviert wurde. Zudem besitzt diese Linie ein IE $\alpha$ -Allel, das aber in diesen Mäusen aufgrund des fehlenden IE $\beta$ -Allels nicht exprimiert wird.



**Abb. 4: Konstruktion der transgenen DR4-Maus (vereinfachtes Schema).** Durch Koinjektion der IE $\alpha$ - und IE $\beta$ -Konstrukte in Blastozysten und Rückkreuzung der Founder-Mäuse mit der MHC-Klasse-II-defizienten C2d-Linie wurde die DR4-IE-transgene Maus konstruiert.

Durch die Integration und Rückkreuzung blieb das Transgen unter der Kontrolle des murinen MHC-Klasse-II-Promotors voll funktionsfähig, so dass nachweislich nur die chimären MHC-Klasse-II-Proteine an der Oberfläche exprimiert werden und die Wechselwirkungen zwischen dem MHC-Peptid-Komplex und dem CD4-Korezeptor der T-Zellen bewahrt wurden (Ito et al., 1996).



**Abb. 5: Interaktion zwischen einer CD4-T-Zelle und einer Antigen-präsentierenden Zelle - vereinfachtes Schema** (adaptiert aus [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). Die  $\alpha_2$ - und  $\beta_2$ -Ketten des MHC-Moleküls stammen aus der Balb/c-Maus ( $H-2^d$ ), wohingegen Teile der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Ketten, die die Peptidbindetasche bilden (rote Markierung) aus dem Menschen stammen.

### **1.2.1. Die transgene DR4-Maus (DR4-P) – ein Mausmodell für Diabetes?**

Wie schon oben beschrieben, wurden die DR4-P-Mäuse konstruiert, um ein Mausmodell für Autoimmunerkrankungen zu erschaffen. Für die Erforschung von Typ-1-Diabetes wurde dieser Mausstamm deshalb in die Tierhaltung des Instituts für Molekulare Immunologie (IMI) der GSF aufgenommen. Nach einem Zeitraum von etwa 9 Monaten wurden die Versuche zur Diabetes-Erforschung allerdings eingestellt, da bei einigen der DR4-P-Mäuse eine spontane Tumorentwicklung auftrat. Aufgrund dieser spontanen Tumorentwicklung konnten die DR4-P-Mäuse nicht als Mausmodell für die Diabetes-Forschung verwendet werden. Im Folgenden werden die entstandenen Tumoren näher beschrieben, da diese Daten noch vor Beginn dieser Arbeit erhoben wurden.

### **1.2.2. Die transgene DR4-P-Maus – eher ein Mausmodell für hämatopoietische Tumoren**

Nachdem die ersten DR4-P-Mäuse Tumoren entwickelt hatten, wurden diese in Kooperation mit der Pathologie in Neuherberg (PATH-GSF) unter der Leitung von Dr. Leticia Quintanilla-Fend immunhistologisch untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass es sich bei diesen Tumoren hauptsächlich um Lymphome, also Tumoren lymphoiden Ursprungs handelte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden insgesamt 131 DR4-P-Mäuse im Alter zwischen 6-24 Monaten einer genaueren Studie unterzogen. In Zusammenarbeit mit der Pathologie wurden die auffälligen Gewebe und Organe von 131 Mäusen mittels immunhistologischer Methoden und parallel durchgeführten FACS-Analysen von Dr. Josef Mysliwicz (IMI) phänotypisiert. In 91 Mäusen konnten Tumoren klassifiziert werden, wohingegen 40 Mäuse keinerlei Erkrankungen zeigten. Neben Tumoren lymphoiden Ursprungs traten auch wenige myeloische Tumoren auf. Die Frequenz der DR4-P-Tumoren lag demnach bei knapp 70% (91 von 131). Die analysierten Tumoren wurden anhand der „Bethesda Proposals 2002“ (Einteilung von Tumoren) in verschiedene Entitäten unterteilt (Kogan et al., 2002; Morse et al., 2002). Aus Gründen der Vereinfachung wurden alle T-Zell-Tumoren als lymphoblastoide

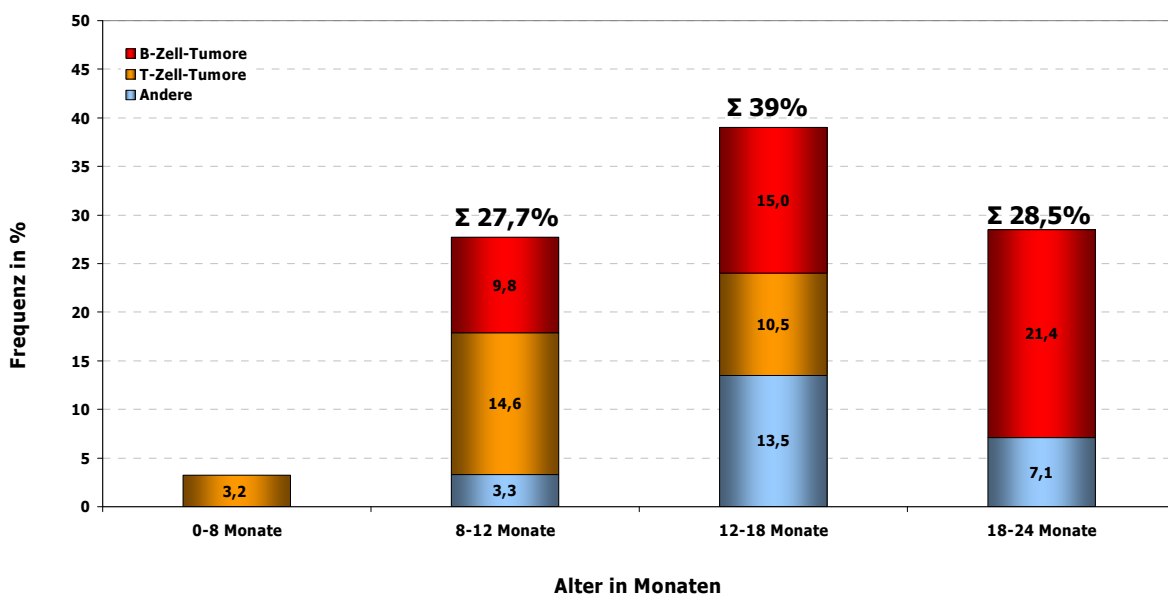
T-Zell-Lymphome (LTZL) und die verschiedenen B-Zell-Lymphome als diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBZL) bezeichnet. In der Gruppe der DLBZL-Tumoren waren unter anderem folliculäre B-Zell-Lymphome (FBL), Marginalzonen-Lymphome der Milz (SMZL) und histiozytenreiche diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBZL-HA) enthalten. Die myeloischen Tumoren konnten allesamt als akute myeloische Leukämien (AML) klassifiziert werden. In einigen DR4-P-Mäusen setzte sich die Erkrankung aus mehr als einem Tumor zusammen und trat in den verschiedensten Kombinationen auf: AML+LTZL, AML+DLBZL, LTZL+DLBZL, DLBZL-HA+SMZL.

**Tab. 1: Tumor-Frequenz in DR4-P-Mäusen**

<b>Gesamt: 91 erkrankte DR4-P-Mäuse Anzahl [%]</b>	<b>LTZL Anzahl [%]</b>	<b>DLBZL Anzahl [%]</b>	<b>AML Anzahl [%]</b>	<b>Mehr als 1 Tumor Anzahl [%]</b>	<b>Nicht- klassifizierte Anzahl [%]</b>
91 [69,5]	33 [25,2]	35 [26,7]	4 [3,1]	10 [7,6]	9 [6,9]

Die Entwicklung spontaner Tumorerkrankungen wird in Bl6-Mäusen relativ selten beobachtet, da sie nur bei etwa 2% auftritt (Hoag et al., 1963).

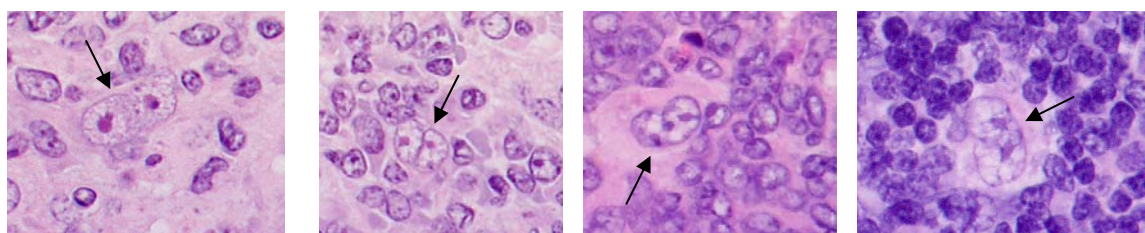
Betrachtete man die altersabhängige Entstehung der Tumoren, so war zu erkennen, dass der „Peak“ der Tumorentstehung mit 39% im Alter zwischen 12-18 Monaten zu finden war.



**Abb. 6: Altersabhängige Frequenz der Tumorentstehung in DR4-P-Mäusen.**



In der Gruppe der „anderen“ Tumoren waren auch diejenigen Tumoren enthalten, die sich aus mehreren Tumoren zusammensetzten. Durch morphologische und immunhistologische Untersuchungen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)) konnten in 80% dieser Fälle (8 von 10) große multinukleäre Zellen gefunden werden, die im humanen System als Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen bezeichnet werden.



**Abb. 7: H/RS-ähnliche Zellen in Lymphknoten und Milz von DR4-P-Mäusen, die an mehr als zwei Tumoren erkrankt waren.** H&E-Färbung an 2-3  $\mu\text{m}$  dicken, in Paraffin eingebetteten, Gewebeschnitten. Die Aufnahme der Bilder erfolgte in 640x-facher Vergrößerung. Zellkerne blauviolett; Zytoplasma rötlich. Die Pfeile deuten auf die morphologisch typischen, riesigen, oft multinukleären H/RS-ähnlichen Zellen hin, die hauptsächlich von großen aktivierten T- und B-Zellen, Eosinophilen und Histiozyten (Gewebsmakrophagen) umgeben sind.

Das Auftreten dieser H/RS-ähnlichen Tumorzellen, die ganz charakteristisch für das Hodgkin-Lymphom im Menschen sind, war der „Anstoß“ für die Durchführung dieser Arbeit. Da es bislang weder ein verlässliches Mausmodell für das Hodgkin-Lymphom gibt, noch die charakteristischen H/RS-Zellen in Mäusen beschrieben wurden, sollten die Umstände aufgeklärt werden, die zu der Entstehung dieser HL-ähnlichen Tumoren in den transgenen DR4-P-Mäusen führten. Durch die Aufklärung der Mechanismen der Tumorentstehung in den transgenen DR4-P-Mäusen sollen deshalb neue Einblicke in die Pathophysiologie des Hodgkin-Lymphoms gewährt werden, die vielleicht zu der Etablierung eines neuen Mausmodells für das Hodgkin-Lymphom führen könnten.

## 2. Aufgabenstellung

### 2.1 Mechanismen der Tumorentstehung in transgenen Mäusen

Folgende Mechanismen, die zu einer Tumorentstehung bei den DR4-P-transgenen Mäusen führen könnten, sind denkbar. Durch einen 1) aktivierten, endogenen, retroviralen Provirus, durch 2) Infektion mit exogenen Viren, durch 3) die so genannte insertionale Mutagenese und durch 4) eine generelle Störung der Hämatopoiese aufgrund der MHC-Klasse-II-Immunsuffizienz, die durch die Integration ausgelöst worden sein könnte. Die insertionale Mutagenese wird im klassischen Fall durch die Integration aktivierter Retroviren beschrieben. Im folgenden Verlauf dieser Arbeit wird der Prozess der insertionalen Mutagenese der Integration des Transgens zugeschrieben.

**1)** Retroviren sind RNA-Viren, die nach Infektion einer Zelle einerseits ihr eigenes Genom mit Hilfe einer reversen Transkriptase in DNA umschreiben und andererseits ihr Genom gleichzeitig in die Chromosomen der Wirtszellen integrieren. Durch die Transkription der retroviralen DNA entstehen mRNA-Moleküle für die benötigten Virusproteine und genomische RNAs zur Bildung neuer Viren. Die Transkription dieser proviralen Einheit wird durch eine regulatorische Sequenz aktiviert, die als LTR („*long terminal repeat*“) bezeichnet wird. Die von der LTR-Einheit umfassten Strukturgene werden in die Gruppen *gag*, *pol* und *env* gegliedert. *Gag* („*group-specific antigen*“) kodiert die Proteinbestandteile des Nukleokapsids, *pol* die Polymerase/reverse Transkriptase und *env* („*envelope*“) die Hüllproteine des Virus.

Es ist bekannt, dass das Genom des Mausstammes C57BL6 (Bl6) einen ekotropen, endogenen Provirus Emv-2 enthält (Jenkins et al., 1982). Ein Provirus wird als solches bezeichnet, wenn es nicht aktiv ist. Der Lokus dieses Provirus ist aber nicht annotiert, das heißt, sein Integrationsort ist nicht bekannt. Da die transgene DR4-P-Maus auf dem Bl6-Hintergrund basiert, könnte die Integration des Transgens in die regulatorische LTR-Sequenz die Aktivierung dieses Proviruses zur Folge haben. Die Aktivierung des Provirus würde dazu führen, dass das Retrovirus nun in der Lage ist sich zu vermehren, weitere Zellen zu

infizieren und durch replikative Transposition mehrfach in das Wirtsgenom zu integrieren. Dabei hinterlässt es nach jeder Integration eine Kopie seines Genoms in dem der infizierten Zelle. Dies wiederum kann zu einer Störung benachbarter Gene führen, wobei eine oder mehrere gestörte Gene an der Tumorentstehung beteiligt sein könnten.

**2)** Die Infektion durch exogene Viren ist beim Menschen stark mit der Entstehung von Tumoren assoziiert. Bestimmte Viren fördern die Entwicklung dieser spezifischen Neoplasien: Humanes Papilloma Virus (HPV) – Zervixkarzinom (DiMaio et al., 2006); Hepatitis B-Virus (HBV), Hepatitis C-Virus (HCV) - Hepatozelluläres Karzinom (Branda et al., 2006); Humanes Herpes Virus (HHV-8) und Humanes Immundefizienz Virus (HIV) - Kaposi-Sarkom (Carbone et al., 2006; Jessop et al., 2006); Humanes T-Zell lymphotropes Virus (HTLV-1) - adulte T-Zell-Leukämie (Elgui de Oliveira et al. 2006); Epstein Barr Virus (EBV) - Burkitt-Lymphom, Hodgkin Lymphom (HL), nasopharyngeales Karzinom (Pattle et al., 2006). Beim Menschen sind, wie schon weiter oben beschrieben, ca. 40% der HL-Patienten EBV-positiv. Anders als bei Retroviren integrieren die humanen gamma-Herpesviren (EBV) bei einer Erstinfektion nicht in das Wirtsgenom. Sie bleiben aber als permanente Bestandteile in Form eines episomalen, genetischen Elements in den B-Zellen erhalten. Dieses Element repliziert sich synchron in den sich teilenden B-Zellen und bleibt dabei in allen Tochterzellen erhalten. Das EBV verändert also nicht die DNA des Wirtes, sondern produziert seine eigenen Proteine, die zu Veränderungen der Zellfunktion führen. Unter anderem baut das EBV manche seiner eigenen Proteine in die Membran von B-Zellen (z.B. „latent membrane proteins“, LMPs) ein (Cohen et al., 2002). Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung der B-Zellen, die nachfolgend weder ausreifen noch selbständig in Apoptose gehen können. Die Infektion kann nicht vollständig bekämpft werden, so dass noch einige wenige latent infizierte Zellen übrig bleiben. Diese können auch nach mehreren Jahren noch der Ursprung der oben genannten Neoplasien sein. Da bei einigen Tieren des parentalen DR4-P-Mausstammes Hodgkin-ähnliche Zellen gefunden wurden, lag die Vermutung nahe, dass ein gamma-

Herpesvirus involviert sein könnte. Es sind fünf murine Herpesviren der Gattung MHV4 bekannt, die aus zwei verschiedenen, frei lebenden Nagern isoliert wurden. Die Virusstämme 60, 68 (Bezeichnung für beide Stämme: MHV-68) und 72 (MHV-72) wurden aus der Wühlmaus (*Clethrionomys glareolus*) isoliert; die Stämme 76 und 78 (MHV-76; MHV-78) aus der Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) (Blaskovic et al., 1980).

Das murine gamma-Herpesvirus (MHV-68) ist ein interessanter Kandidat für die Entstehung der B-Zell-Tumoren in den DR4-P-Mäusen. Es ruft in Mäusen eine vergleichbare Infektion hervor, wie das EBV beim Menschen. Das MHV-68 infiziert, ähnlich wie das EBV, sowohl epitheliale als auch lymphoide Zellen, ist aber nur latent in lymphoiden Geweben auffindbar (Flano et al., 2002). Dieser Mechanismus ist bei dem DR4-P-Mausstamm nur denkbar, weil das MHV-68-Virus in unserem Institut verwendet wird und eine zufällige Infektion aufgetreten sein könnte. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Infektion ist allerdings sehr gering, da die Versuche mit dem MHV-68 nicht in der Maustierhaltung, sondern nur in den örtlich getrennten Laboren durchgeführt werden.

**3)** Im Allgemeinen ist die insertionale Mutagenese der am häufigsten beobachtete Mechanismus für die Tumorentstehung bei transgenen Mäusen (Woychik et al., 1998). Dabei kann das Transgen in einen Lokus eines a) Proto-Onkogens oder b) Suppressorgens integrieren. Durch die Integration eines Transgens in die nähere Umgebung oder in die regulatorische Einheit (Promotor oder Enhancer) eines potentiellen Proto-Onkogens kann dieses auf verschiedene Arten eingeschaltet bzw. aktiviert werden. Man bezeichnet dies auch als eine „*Gain of function*“ oder aktivierende Mutation. Diese tritt aber eher selten auf. Die meisten Mutationen führen dazu, dass das kodierte Protein nicht mehr funktionell ist. Durch die Integration des Transgens in die kodierende Region oder in der Umgebung eines Suppressorgens kann dessen Funktion gestört oder inaktiviert werden und somit die Entstehung von Tumoren begünstigen. Diese inaktivierenden Mutationen nennt man „*Loss of function*“ Mutationen, die nur bei Suppressorgenen relevant sind (Wang et al., 2006).

Um dieser These nachzugehen war die Zucht einer DR4-F1-Generation nötig. Die DR4-P-Mäuse sind homozygot, sowohl für das Transgen als auch für das ausgeschaltete murine Klasse-II-Gen. Die DR4-F1-Mäuse sind heterozygot in Bezug auf das integrierte Transgen und das H2-IA-Molekül, das durch den Einbau einer Neo-Kassette ausgeschaltet wurde. Sie besitzen ein normales murines MHC-Klasse-II-Gen des B16-Stammes und gelten deshalb nicht als immuninsuffizient. Sollten bei der DR4-F1-Generation auch Tumoren entstehen, würde die Immuninsuffizienz der DR4-P-Mäuse nur eine untergeordnete Rolle in der Tumorentwicklung spielen. Darüber hinaus gibt die DR4-F1-Generation Aufschluss darüber, ob durch die Integration des Transgens ein Proto-Onkogen oder ein Suppressorgen betroffen ist. Entwickeln die heterozygoten DR4-F1-Mäuse Tumoren, so würde das für einen dominanten - oder Onkogeneffekt sprechen, da ein Allel ausreicht, um die Tumorentwicklung zu begünstigen. Sollten keine Tumoren entstehen, kommt eher ein Suppressorgen als Kandidat in Frage oder die Immuninsuffizienz würde eine wichtige Rolle in der Entstehung der Tumoren spielen. Eine weitere Erklärung wäre, dass der MHC-Klasse-II-Promotor des Transgens durch die Integration in der Nähe eines bestimmten Locus die Regulation des benachbarten Genes übernimmt.

**4)** Ein weiterer, denkbarer Mechanismus ist eine grundlegende Störung der Hämatopoiese aufgrund der veränderten MHC-Klasse-II-Gene der transgenen DR4-Mäuse. Der DR4-P-Stamm besitzt wie schon vorher beschrieben, nur ein funktionell exprimiertes, chimäres MHC-Klasse-II-Molekül (H2-DR4-E). Die Präsentation von Peptiden auf MHC-Klasse-II-Molekülen spielt eine wichtige Rolle in der zentralen Toleranz von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Thymus. Diese präsentierten Peptide stammen hauptsächlich von Proteinen, die im endosomalen/lysosomalen System abgebaut werden, wie zum Beispiel extrazelluläre Proteine, aber auch endogene, membranständige und endosomale Proteine der Zelle (Rammensee et al., 1993). Bindet der T-Zell-Rezeptor (TZR) einer CD4<sup>+</sup>-T-Zelle nicht mit einem Mindestmaß, bzw. zu stark an den MHC-Peptid-Komplex, so werden diese Zellen

eliminiert. Hierbei spricht man von der positiven bzw. negativen Selektion. Ist diese Selektion durch die veränderte Variabilität von MHC-Molekülen nicht gewährleistet, kann das zu einer folgenschweren Dysregulation des Immunsystems führen. Dies kann weitreichende Konsequenzen für die Entwicklung von Immunantworten gegen exogene Faktoren, z.B. verschiedene Pathogene, haben. Die gestörte Regulation der Lymphozyten würde sich auch negativ auf die periphere Toleranz auswirken. Der Grund hierfür: Regulatorische T-Zellen werden auch im Thymus durch Kontakt mit MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexen ausgebildet. Solche regulatorischen T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Die periphere Toleranz ist ein essentieller Mechanismus, der dafür sorgt, dass alle autoreaktiven bzw. überreaktiven Zellen auch noch in der Peripherie eliminiert oder in ihre Funktion unterdrückt werden können. Ist die periphere Toleranz gestört, fehlt dort ein zentraler Kontrollpunkt. Dies könnte dazu führen, dass die immuninsuffizienten DR4-P-Mäuse aufgrund der Dysregulation der Lymphozyten anfälliger in der Entwicklung von hämatologischen Erkrankungen sind. Die Immuninsuffizienz könnte also teilweise als Ursache für die Entstehung der Tumoren in Frage kommen.

Ziel dieser Arbeit war diese Mechanismen zu untersuchen, um am Ende anhand der Ergebnisse den Mechanismus herauszufiltern, der für die Tumorentstehung verantwortlich ist. Darüber hinaus sollen die Komponenten aufgeklärt werden, die in den Mechanismus involviert sind, um abschließend die DR4-Mäuse als Mausmodell für das Hodgkin-Lymphom einführen zu können.

### **3. Ergebnisse**

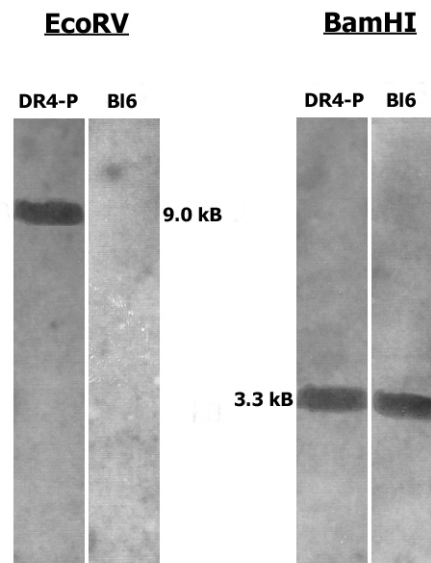
#### **3.1 Mögliche Mechanismen der Tumorentstehung in DR4-Mäusen**

In den folgenden Kapiteln sollen anhand der Ergebnisse die bereits vorgestellten Mechanismen der Tumorentstehung auf ihre Richtigkeit hin überprüft und der wahrscheinlichste Mechanismus aufgedeckt werden.

##### **3.1.1 Aktivierung des ekotropischen, endogenen Emv-2-Provirus?**

Mit Hilfe eines radioaktiven Southern-Blots sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Aktivierung des endogenen C57BL6-Emv-2-Provirus der Grund für die Entstehung der Tumoren in den DR4-P-transgenen Mäusen ist. Hierfür wurde zunächst die DNA von Tumoren aus der Milz von DR4-P-Mäusen isoliert, mit Restriktionsenzymen verdaut und mit einer spezifischen,  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierten env-Sonde hybridisiert. Diese Sonde sollte das kodierende Gen des Emv-2 Hüllproteins detektieren. Als Kontrolle diente das gleiche Gewebe aus gesunden C57BL6-Mäusen (Bl6). Jedes Restriktionsenzym schneidet an verschiedenen Stellen, so dass die Sonde an verschieden große Fragmente hybridisiert. Zudem wurden die verwendeten Restriktionsenzyme so ausgewählt, dass sie keine Schnittstellen innerhalb der Sonden besaßen. Das sollte gewährleisten, dass die Sonde pro Virus-enthaltendes Fragment nur einmal hybridisiert. Außerdem ist es höchst unwahrscheinlich, dass durch spontane Mutationen zusätzliche Restriktionsschnittstellen im env-Lokus entstehen, da es sich hierbei um eine hoch konservierte Sequenz handelt. Bindet die Sonde also pro Restriktionsverdau nur einmal, so spricht das für einen nicht aktivierten Emv-2-Provirus, da nur ein Virus-DNA-enthaltendes Fragment spezifisch detektiert wird. Sollte die Sonde aber mehrere Banden pro Restriktionsverdau ergeben, so wäre das ein Hinweis darauf, dass das Provirus aktiviert wurde und bereits replikativ transpositioniert ist. Das Enzym EcoRV ergibt in Bl6-Mäusen ein Fragment der ungefähren Größe von 9.0 kb (persönliche Mitteilung von Prof. Jörg Schmidt), an welches die Sonde hybridisiert (Abb. 8). Unter Verwendung von BamHI sind in Bl6-Mäusen Fragmente der Größe 3.3 kb zu erwarten (Jenkins und Copeland et al., 1982). Da

die DR4-P-Maus auf dem C57BL6-Hintergrund basiert, ist zu erwarten, dass ein Verdau mit gleichen Enzymen auch gleichgroße Fragmente hervorbringt.



**Abb. 8: Charakterisierung der endogenen ekotropischen *Env-2*-Sequenz in der TumordNA der DR4-P-Maus sowie der DNA aus der BI6-Kontrollmaus.**

10  $\mu$ g der DNA wurden mit *EcoRV* oder *BamHI* verdaut, auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch ein Southern Blot-Verfahren wurde die  $p^{32}$  markierte 330 bp große *env*-Sonde an die Membran hybridisiert. Die Größe der Virus-DNA-enthaltenden Fragmente wurde mittels eines Standardmarkers bestätigt.

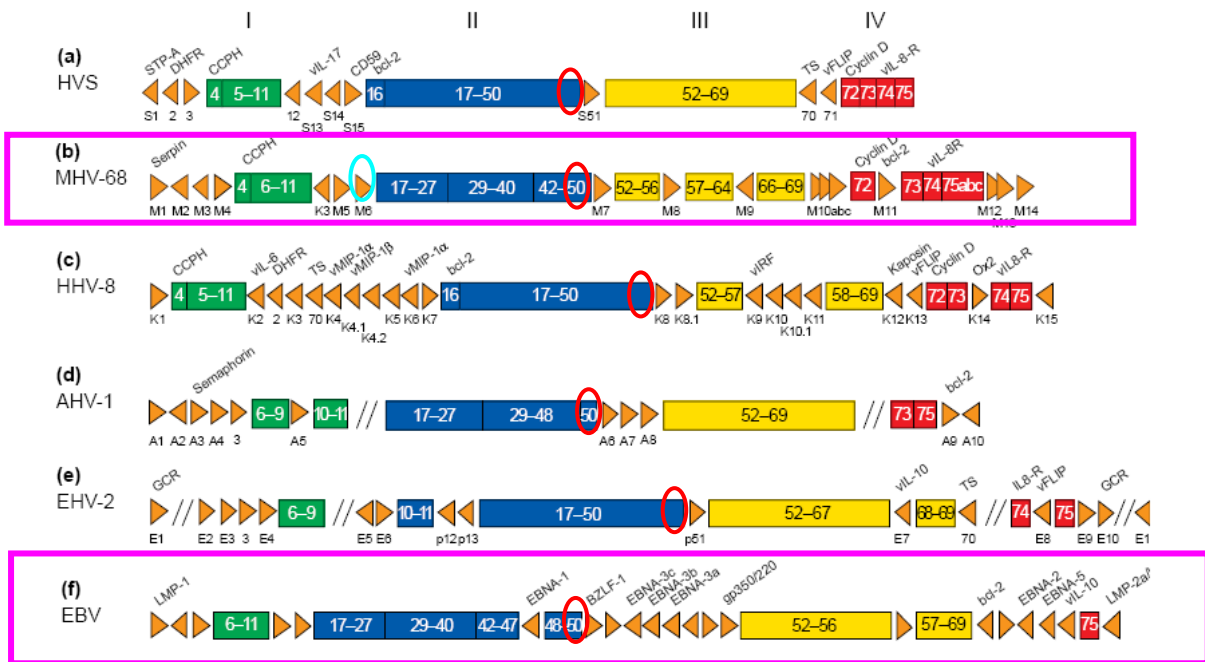
Wie in Abb. 8 gut zu erkennen ist, ergab der Restriktionsverdau mit *EcoRV* nur ein Hybridisierungssignal der DR4-P-Maus bei einer Größe von 9 kb. Bei dem Verdau mit *BamHI* zeigten beide Mäuse ein gleich großes Signal bei 3.3 kb. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beiden Mausstämme zwar einen hohen Verwandtschaftsgrad besitzen, sich in ihrem Genom aber dennoch etwas unterscheiden. Der Grund hierfür könnte sein, dass die BI6-Mäuse für die Rückkreuzung mit dem DR4-P-Stamm aus einer anderen Zucht aus den USA stammten. Unsere BI6-Mäuse stammen aus der dänischen Zucht der Firma Taconic. Es ist bekannt, dass durch die Trennung der BI6-Zuchten über Jahre hinweg spontane Mutationen auftreten können. Der Unterschied nach dem Verdau mit *EcoRV* könnte ein Beleg hierfür sein. Das würde bedeuten, dass durch eine spontane Mutation in den BI6-Mäusen die Restriktionsschnittstelle entweder nicht mehr vorhanden war oder durch den Verdau zu kleine oder zu große Fragmente entstanden sind, die auf dem Gel nicht mehr sichtbar waren.



Die kleinen Fragmente könnten bereits aus dem Gel ausgelaufen sein und die großen Fragmente würden noch in der Geltasche verbleiben, so dass die Sonde an kein Fragment in der entsprechenden Größe hätte hybridisieren können. Ausschlaggebend war allerdings, dass bei jedem einzelnen Verdau sowohl in der Bl6-Kontrollmaus als auch in der DR4-P-Tumormaus die spezifische env-Sonde nur maximal ein Fragment detektierte. Daraus folgt: Ein endogenes Provirus wurde nicht durch die Integration des Transgens aktiviert, da keine Hinweise für eine mehrfache Transposition gefunden werden konnten.

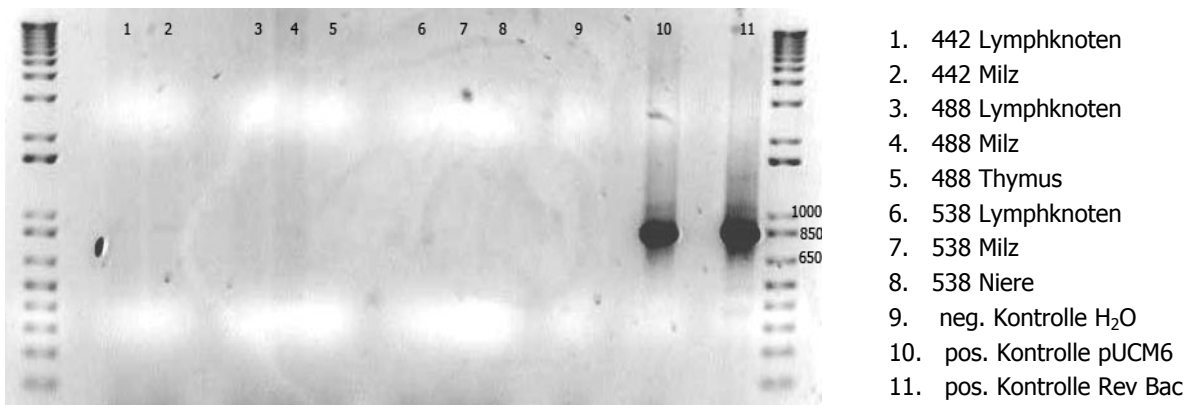
### **3.1.2 Infektion durch das gamma-Herpesvirus MHV-68?**

Das wichtigste biologische Charakteristikum der gamma-Herpesviren ist die Fähigkeit, sich latent im Wirtsgenom von Lymphozyten zu etablieren und so lymphoproliferative Krankheiten zu induzieren. Das murine MHV-68 ist dem humanen EBV sehr ähnlich. So gibt es Bereiche in deren Genome, die bei beiden gleich sind wie zum Beispiel der „Open Reading Frame“ 50 (ORF= Open Reading Frame) - siehe Abb. 9 - rote Kreise. Ebenso gibt es Bereiche, in denen sich die beiden Viren stark unterscheiden. Das ORF M6 findet man nur im MHV-68, siehe Abb. 9 - türkisfarbener Kreis. Mittels PCR-Methode kann bestimmt werden, ob Zellen mit einem Herpes-Virus infiziert sind. Für eine allgemeine Untersuchung, also ob generell ein gamma-Herpesvirus involviert ist, wurden Primer verwendet, die an alle gamma-Herpesviren-Sequenzen binden können (ORF50). Dem ORF50 wird die Funktion des transkriptionellen Aktivators des Glykoproteins 150 zugeschrieben (Virgin IV et al., 1999). Um nur spezielle Subtypen, wie zum Beispiel den MHV-68 nachzuweisen, sucht man sich Primer, die spezifisch an die ORF M6-Sequenz des MHV-68 binden. Die Funktion des ORF M6 ist bislang noch nicht bekannt. Seine Position ist allerdings homolog zu den Genen anderer gamma-Herpesviren. Diese Gene werden in latent infizierten Zelllinien oder Tumoren exprimiert (Virgin IV et al., 1999). Die Infektion von DR4-P-Mäusen mit einem gamma-Herpesvirus würde gut zu der Entstehung der HL-ähnlichen Tumoren passen, da dieser Mechanismus beim Menschen eine zentrale Rolle in der Entstehung von Hodgkin-Lymphomen spielt.

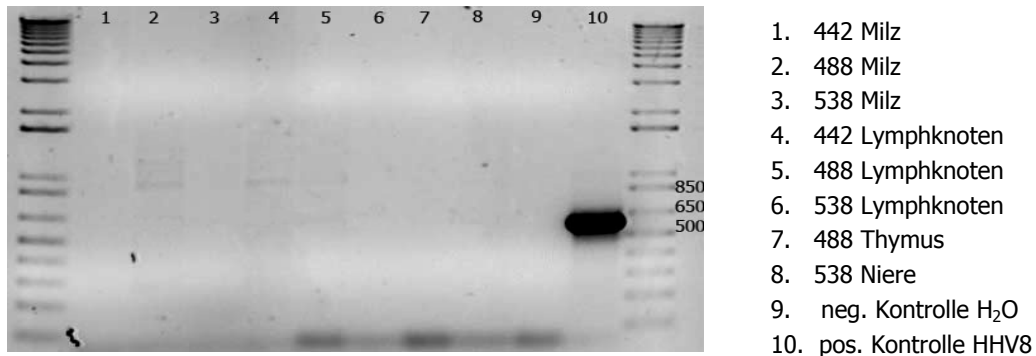


**Abb. 9: Ein Vergleich der genetischen Organisation von vollständig sequenzierten gamma-Herpesviren.** (Adaptiert aus Simas et al., 1998.). (a) Herpesvirus saimiri (Totenkopffaffe); (b) muriner Herpesvirus 68 (Nager); (c) humaner Herpesvirus 8 (Mensch); (d) alcelaphines Herpesvirus 1 (Rind); (e) equines Herpesvirus 2 (Pferd); (f) Epstein Barr Virus (Mensch). Die konservierten Gene sind I (grün), II (blau), III (gelb) und IV (rot) markiert. Hervorgehoben wurden das MHV-68 und das EBV in den rosafarbenen Boxen. Rote Kreise: ORF50, in allen gamma Herpesviren vorhanden. Türkisfarbener Kreis: ORF M6, nur spezifisch für MHV-68.

Zunächst wurde versucht spezifische Amplifikate mittels PCR herzustellen, um zu überprüfen, ob bei den DR4-P-Mäusen tatsächlich eine Infektion mit MHV-68 vorlag. Dazu wurde die DNA aus verschiedenen nicht-klassifizierten Tumorgeweben isoliert.



**Abb. 10: PCR-Analyse für das MHV-68 M6-Gen.** Die beiden Positivkontrollen sind: ein Plasmid (10), das den ORF M6 enthält, sowie ein BAC-Klon („Bacterial Artificial Chromosome“) (11), der das gesamte MHV-68 beinhaltet. Durch die Amplifikation entstehen Produkte, die 820 bp lang sind.



**Abb. 11: PCR-Analyse für das ORF50-Gen.** Die Positivkontrolle ist ein mit HindIII geschnittenes Plasmid (10), das den ORF50 aus dem humanen Herpesvirus 8 (HHV8) enthält. Durch die Amplifikation entstehen Produkte die **586 bp** lang sind.

Wie auf beiden Gelen gut zu erkennen ist, zeigten nur die Positivkontrollen ein Amplifikat. Das bedeutete für unsere DR4-P Mäuse: Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann eine Infektion durch das MHV-68 oder ein anderes gamma-Herpesvirus ausgeschlossen werden.

### 3.1.2.1. Kultivierung von Tumorzellen auf BKH21-Fibroblasten und Untersuchung des Serums auf antivirale Antikörper

Für einen weiteren Hinweis, dass keine Virus-Infektion mit MHV-68 vorliegt, wurden zusätzlich frisch isolierte Tumorzellen mit der BHK21-Fibroblastenlinie (Babyhamsterzellen aus der Niere von *Mesocricetus auratus* (Syrischer Goldhamster)) kokultiviert. Diese Fibroblasten sind sehr empfindlich gegenüber bestimmten viralen Infektionen, wie zum Beispiel von MHV-68. Sollten die Tumorzellen, mit einem Virus infiziert sein, so würden die Fibroblasten, durch Virus-Transfer von Tumor zu Fibroblasten, sehr schnell absterben. Man spricht hier von einem zytopathischen Effekt des Virus (cpe= cytopathic effect). Er führt zu morphologischen Veränderungen der Zellen, die ganz typisch für bestimmte Viren sind. Die BHK21 proliferierten nach der Kokultur mit den Tumorzellen normal und zeigten auch nach drei Passagen keine morphologischen Veränderungen. Das bedeutet: Es gab keine Hinweise auf eine Virus-Produktion in den Tumorzellen von Viren, die in der Lage wären die BHK-21-Zellen zu infizieren.

Zusätzlich wurden die Seren aus sechs Tumor-tragenden DR4-P-Mäusen auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MHV-68 untersucht. Hierfür wurden die Seren auf die Bindung mit MHV-68-infizierten NIH3T3-Fibroblasten mittels ELISA getestet. Auch in dem ELISA zeigten die Proben (Daten nicht gezeigt) keinerlei Hinweise auf Antikörper gegen MHV-68-Produkte. Eine Infektion mit dem MHV-68-Virus konnte also auch durch die Untersuchung der Seren sowie der Tumorzellen als Ursache für die Tumorentstehung ausgeschlossen werden.

## **3.2 Bestimmung des Integrationsortes des DR4-Transgens**

Der Mechanismus der insertionalen Mutagenese, der, wie schon vorher beschrieben wurde, zur Entwicklung von Tumoren führt, kann nur aufgeklärt werden, wenn der Integrationsort des Transgens exakt bestimmt wird. Für die Detektion des Integrationsortes mussten zunächst zumindest Teile der Transgen-Konstrukte bekannt sein, um spezifische Sonden für weiterführende Experimente generieren zu können.

### **3.2.1. *In silico*-Rekonstruktion der DR4-alpha- und beta-Konstrukte für die Generierung von Exon-2-spezifischen Sonden**

Die Konstrukte in ihrer Original-Form waren leider nicht mehr verfügbar, aber Prof. Kouichi Ito, überließ uns freundlicherweise die Schemata der DR4-IE $\alpha$ - und DR4-IE $\beta$ -Konstrukte (Abb. 2A und B). Mit Hilfe dieser Konstruktions-Schemata wurde es möglich, mittels *in silico*-Analyse die genaue Größe und Sequenz der jeweiligen Exon-2-Bereiche zu ermitteln. Hierfür wurden verschiedene Programme, wie der „NEBcutter“ (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) für die Restriktionsverdau und die NCBI-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) für die Sequenzen verwendet. Die Exon-2-Sequenzen der beiden Konstrukte sind deshalb so wichtig, weil sie die Sequenzen des humanen Genoms enthalten. Nur in diesen Sequenzen unterscheiden sich die integrierten Transgene von dem endogenen, murinen MHC-Klasse-II-Lokus. Es konnten somit die exakten Größen der beiden Exon-Bereiche bestimmt werden. Die Länge des DR4-IE $\alpha$ -Exon-2-Fragments lag bei 1500 bp, wohingegen das DR4-IE $\beta$ -Exon-2-Fragment nur 850 bp enthielt. Über Vergleiche der Originalsequenzen des jeweiligen humanen DR4-Allels mit den Sequenzen des Vektorverdaus konnten die verbleibenden Vektorsequenzen *in silico* eliminiert werden. So blieben nur die humanen Exon-2-Sequenzen übrig. Für diese spezifischen Sequenzen wurden Primer ausgesucht, die für das DR4-IE $\alpha$ -Exon-2 mittels PCR 1232 bp große Produkte amplifizierten. Die DR4-IE $\beta$ -Exon-2-spezifischen Primer amplifizierten spezifische Produkte der Größe von 620 bp. Diese beiden Amplifikate konnten dann als Sonden für weitere Versuche verwendet werden.

→ 5' hEx2a

GGGAAGCAGGGGGACTATGACGCTACAAGGTCTCAGTCTTAATTTTTGGAGTACTTCAGTCCCAGGTATATT  
 TTCCATAGATTTGGCCCTTAAATAAAGAGAAGCTTCTGACTCTAAAATGTAAACAGTGCTTGTTACAGTCTTGT  
 TGATATATTAAGAAATTACTIONACTCACCTTATCTCATTTAATCTTAAAAACAAACCCCTGACAGGATCAAAACCACAGC  
 AGGGCTACATAATAGGAAAACATAACATAAATAGGTAGAATAATCTGCTCAGGATCACTAGGTAAGTTGCTGAA  
 TAAGAATTCAAGATGTTTTTATGCCAGAGTTTAAAACCCAACCTTCAAACAGCGTTTTCTTTCTTCTTAGAGTA  
 CAATGTTCTGAGAAAGAGATCCTCTGGAATTCTGGCCTAAGTGATTTAATGCCCGGGTAAAGAAAGTGAGAG  
 AACATTTCTCTTTAGGGGCTGCTGCTGGATTTCTAAAAGAAAATAATTTCTCAGCTAGTAACATGGAGCCAAA  
 CAACAGCTTACAAGACTCTGGGTTCTTTAGCCCTCATCTCCTTCAATCCACCCTCTTTATAACCAGTCTTCTT  
 GTTTTCCCCTCCCAGCTTTGTTTCTGAGCAGCATGCCCTTACCCAGACCTTGTCTTGTCACTCATCCCTACTCGCC  
 ATCATTCTTTTATTCTCTTGGCCCAATCTCTCTCCACTACTTCTGCCTACATGTATGTAGGTTATTCATTTCC  
 CTCTCTTGATTCCCCCACCAACTCTCTTTCTCCATTTCTTGCCTTTCAAGAACATGTGATCATCCAGGCCG  
 AGTTCTATCTGAATCCTGACCAATCAGGCGAGTTTATGTTTGACTTTGATGGTGATGAGATTTTCCATGTGGAT  
 ATGGCAAAGAAGGAGACGGTCTGGCGGCTTGAAGAATTTGGACGATTTGCCAGCTTTGAGGCTCAAGGTGCAT  
 TGGCCAACATAGCTGTGGACAAAGCCAACCTGGAAATCATGACAAAGCGCTCCAACATACTCCGATCACCAAT  
 GGTACCTCCCTCTCTGCTGCACTCCTGGACATGGGAATCCATAGTTTGAAGTAGTTGCTTCACTCTTTGTGT  
 TAGATTATTGTAAGTATTTTCCCTCCAAGGTCTAACCTTGCCATTAACAAGCCCCAAATTCTCATGCCAGAG  
 GTCTGAGAACTTTATGGGTTTATCCTATCTTGTGTGCTCAAGTCTTGTCTCTGTCATCCATGGTCTACGAA  
 GTCATTGCCCTAA

← 3' hEx2a

**Abb. 12: Sequenz des integrierten humanen HLA-DRA-Gens.** Die für das Exon-2 kodierende Region wurde hellblau hinterlegt. Größe 1232bp. Die Primer für die FISH-Sonde wurden grau hinterlegt und der 5'  $\alpha$ GSP1-Primer für den Genome-Walk (3.2.3.) wurde gelb hinterlegt.

→ 5' hEx2b

TGAAAGCGGTGCGTGCTGTTTAAGGAAAGGGTAAAGCCTTTAAATGGTAAAGGGTTGAGAGAAGGAGCAAAGT  
 GCCTTTGGGGTGGAGGCTCCCAGGAGGAGGCGGCGGGCTGCGGTGCTGGACGGATCCTCCTCCAGCTCCT  
 GCCTGGAGGTCTCCAGAACAGGCTGGAGGCAGGGAGGGGTTCCAAAAGCCTTGGGATCAGGGGTAGTTTTT  
 CCACCTGGTCCCCCAGACCCCCGTCCGCCTCAGAAAGACAGAGGATGAGCCCCTGGGCTGCGTGTTGTCGGGG  
 TTGCGGGTGGGGCCAGATAGTGTCTTCCCCGGAGGCGCTTCTGTAACCGGATCGTTCTTGTCCCCCAGCAC  
 GTTTCTTGAGCAGGTTAAACATGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGCAGTTTCTGGACAGATA  
 CTTCTATACCAAGAGGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTGACGGAGCTGGG  
 GCGGCCTGATGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGAAGCGGGCCGCGGTGGACACCTA  
 CTGCAGACACAACACTACGGGGTTGGTGAGAGCTTTCACAGTGCAGCGGCGAG

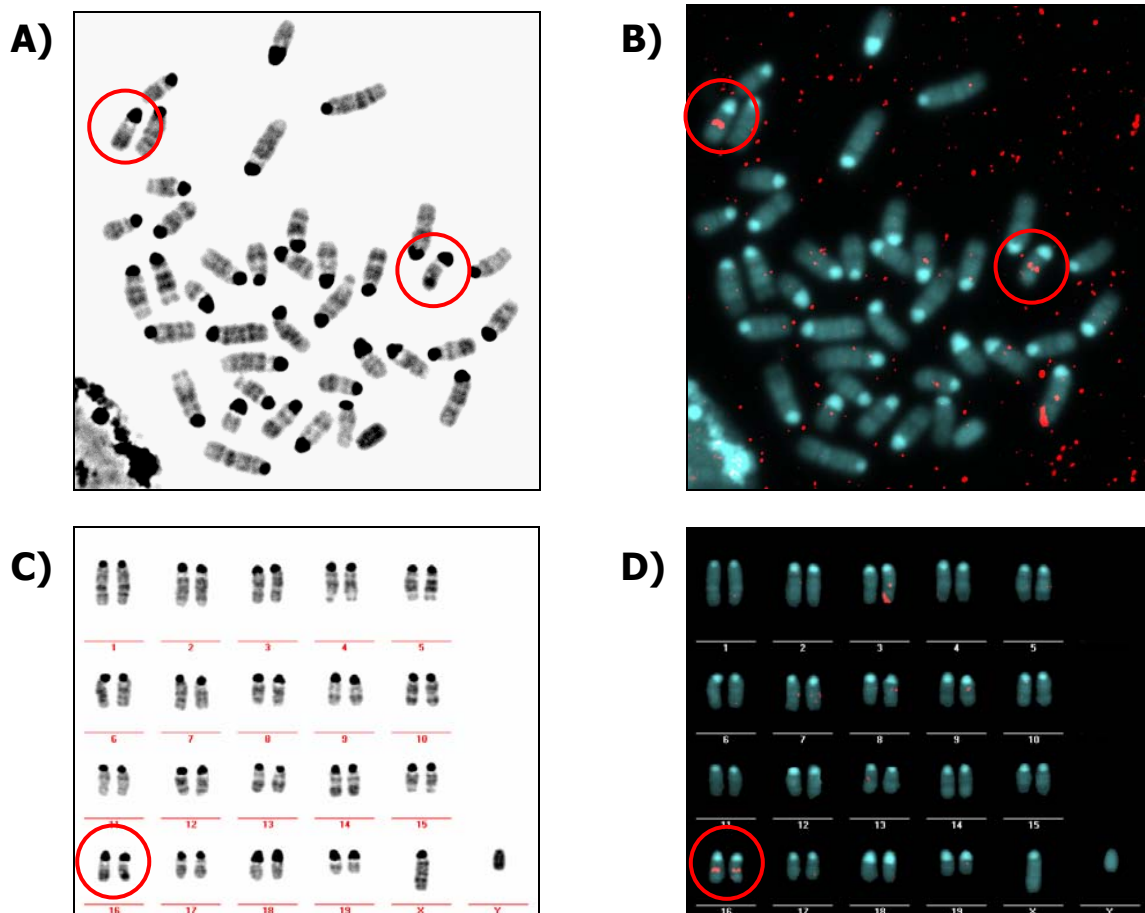
← 3' hEx2b

**Abb. 13: Sequenz des integrierten humanen HLA-DRB-Gens.** Die für das Exon-2 kodierende Region wurde hellblau hinterlegt. Größe 629 bp. Die Primer für die FISH-Sonde wurden grau hinterlegt und der 5'  $\beta$ GSP1-Primer für den Genome-Walk (3.2.3.) wurde gelb hinterlegt.

### **3.2.2. Lokalisation des Transgens mittels FISH-Analyse (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung)**

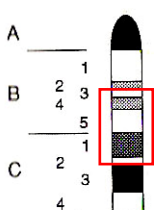
Die FISH-Analyse ist eine gängige Methode, mit der man z.B. in der Diagnostik von Karzinomen Veränderungen der Chromosomen detektieren kann, die beispielsweise Translokationen oder Deletionen aufweisen (Knight et al., 1997). Hierbei werden Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die an die komplementären DNA-Abschnitte (*in situ*) im untersuchten Genom binden (Hybridisierung). Die Signale können dann mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Diese Methode wurde verwendet, um den Integrationsort des DR4-Transgens zu bestimmen. Die generierten Exon-2-Sonden (spezifisch für DR4-IE $\alpha$  und DR4-IE $\beta$ ) wurden zunächst mittels PCR mehrfach amplifiziert, die Amplifikate aufgereinigt und mit der Fluoreszenz Avidin Cy3.5 angefärbt. Anschließend wurde aus Milzzellen von DR4-P-Mäusen die Chromosomen in der Metaphase auf Objektträgern fixiert, um die einzelnen Chromosomen gut erkennen zu können. Im Anschluss wurden die mit Avidin Cy3.5 angefärbten DR4-IE $\alpha$ - und DR4-IE $\beta$ -Sonden getrennt voneinander an die präparierten Chromosomen in der Metaphase hybridisiert.

In Abb. 14 B) und D) sind die roten Signale der mit der Fluoreszenz Avidin Cy3.5 markierten DR4-IE $\alpha$ -Sonde gut zu erkennen. Deutlich zu sehen sind auch die doppelten Signale auf beiden Allelen des jeweiligen Chromosoms. Dies war für homozygote Mäuse auch zu erwarten.



**Abb. 14: Chromosomale Lokalisation der DR4-IEa- und IEβ-Konstrukte am Beispiel der DR4-IEa-Sonde. A) + C) Chromosomen im invertierten DAPI-Kanal mit zytogenetischem Bandenmuster; B) + D) Die roten Signale (rote Kreise) von Avidin Cy3.5 zeigen die Lokalisation der DR4-IEa-Sonde; A) + B) Chromosomen in der Metaphase; C) + D) Chromosomen in einem Karyogramm angeordnet. Die roten Kreise zeigen die Hybridisierungs-Signale der Sonde, die an beide Allele des humanen Exon-2 von DR4-IEa auf Chromosom 16 gebunden haben.**

Das Resultat der Hybridisierung an die DR4-IEβ-Sonde war absolut identisch und wurde deshalb nicht noch einmal gesondert gezeigt. Die Position des Integrationsortes wurde auf die Chromosomen 16 in den Bereichen der zytogenetischen Banden zwischen B3 und C2 geschätzt. Der Integrationsort des Transgens konnte also eindeutig dem Chromosom 16 zugeordnet werden.



**Abb. 15: Zytogenetisches Bandenmuster des Chromosoms 16 in der Maus.** aus „Mouse Genetics“ von Lee M. Silver (1995)  
Die rote Box zeigt den ungefähren Integrationsort des DR4-Transgens in der zytogenetischen Bänderung zwischen **B3-C2**.

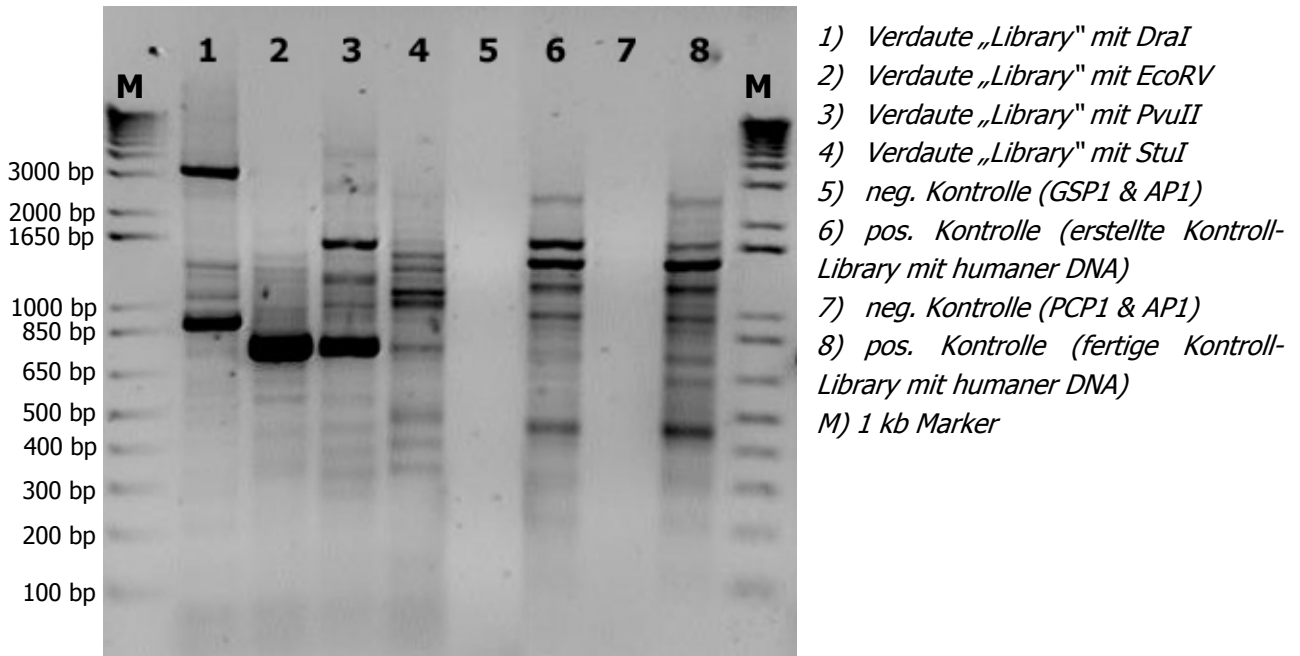


Glücklicherweise zeigte die FISH-Analyse nur einen Integrationsort im Genom. Hätte das Transgen mehrfach in das Genom integriert, wäre die Aufklärung des Mechanismus der Tumorentstehung wahrscheinlich unmöglich gewesen. Die genaue Position im Chromosom 16 musste natürlich noch exakter bestimmt werden. Vorher war man nicht in der Lage eine Aussage darüber zu treffen, welche Gene von der Integration des Transgens betroffen sind.

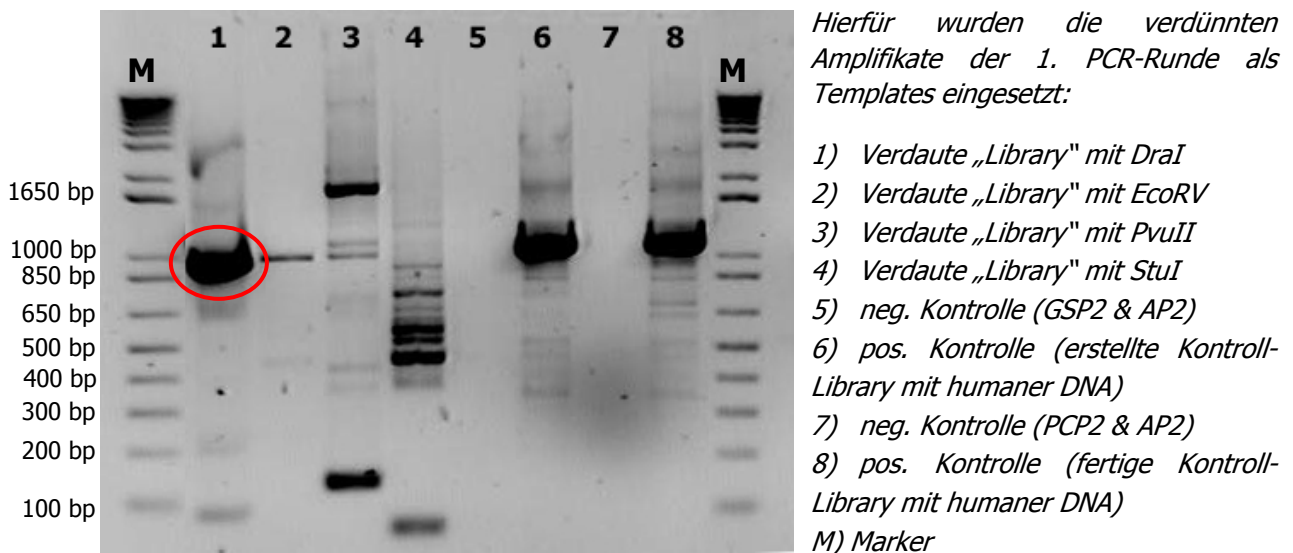
### **3.2.3. „Genom Walking“ – vom Transgen zum exakten Integrationsort?**

Unter „Genome Walking“ versteht man eine auf PCR basierende Methode, die es ermöglicht unbekannte und direkt benachbarte DNA-Sequenzen einer bekannten Sequenz zu analysieren. Diese benachbarten DNA-Sequenzen können sowohl in „upstream“ oder „downstream“ – Richtung liegen. Hierfür wurde zunächst die DNA aus DR4-P-Mäusen isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, um so genannte „Libraries“ zu generieren. Durch die Ligation der einzelnen verdauten DNAs („Libraries“) mit Adaptoren sollten Bindestellen für die entsprechenden AP-Primer (Adapter-Primer) gebildet werden. Mit einer ersten PCR wurden dann Fragmente zwischen dem bekannten Gen-spezifischen Primer (GSP1-Exon-2) und dem äußeren Adaptor-Primer (AP1) amplifiziert. Der Gen-spezifische Primer GSP1 wurde so ausgewählt, dass dieser an den humanen Teil des Transgens im Exon-2 bindet, um zu gewährleisten, dass die Amplifikation nur spezifisch für das Transgen war und keine Sequenzen im endogenen MHC-Klasse-II-Gen amplifiziert wurden. Diese Amplifikate (Abb. 16) dienten in verdünnter Form als Vorlage für die zweite oder „nested“ PCR. Die in dieser „nested“ PCR verwendeten Primer banden für die Gen-spezifischen Primer etwa 2 kb weiter innerhalb des amplifizierten, ersten Produktes (AP2 und GSP2-Exon-5). Der zweite Gen-spezifische Primer hatte seine Erkennungssequenz im Exon-5 des DR4-IE-Gens. Als Kontrolle dienten eine selbst generierte humane Library sowie eine vorgefertigte humane Library, bei denen der humane Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator (tPA) mit den Primern PCP1 & AP1 und PCP2 & AP2 amplifiziert wurde. Die markanten entstandenen Produkte

wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 16), aus dem Gel eluiert und sequenziert.




**Abb. 16: Produkte der 1. Genome-Walk-PCR durch Amplifikation mit GSP1 und AP1.**



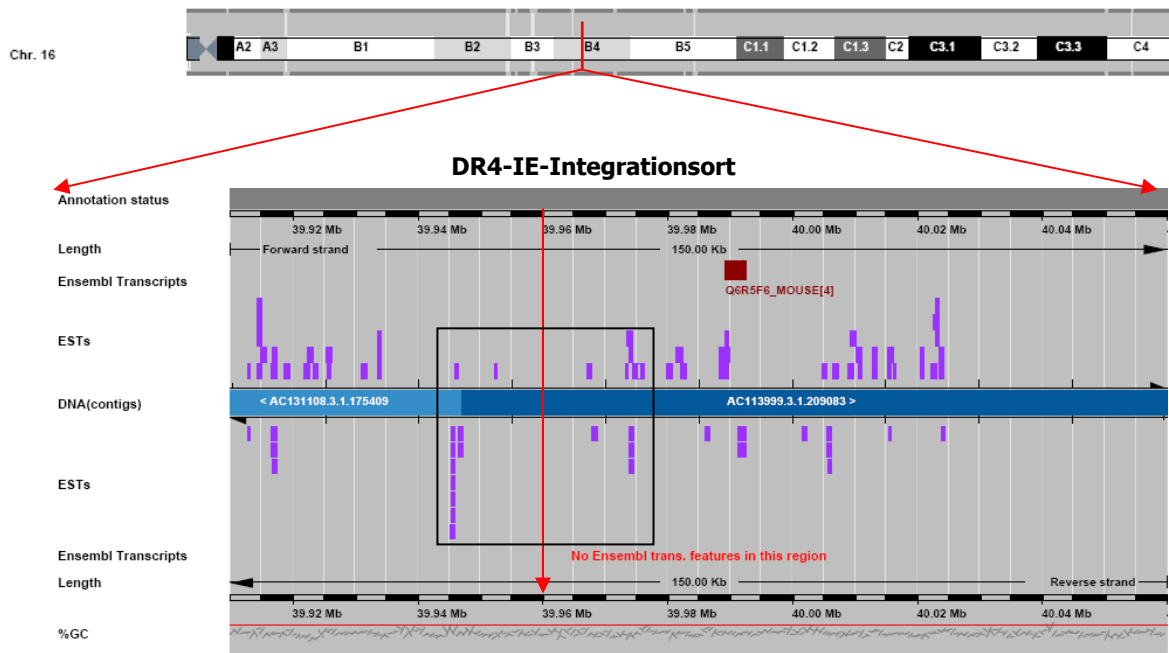
**Abb. 17: Produkte der 2. Nested-PCR durch Amplifikation mit GSP2 und AP2.** Die Positivkontrollen 6) und 8) sollten spezifische Produkte des humanen Gewebetyp-Plasminogen-Aktivators in der Größe von 1,5 kb liefern. Die rote Ellipse markiert das Produkt mit der Fusions-Sequenz.

Die Sequenzierung des rot markierten DR4-IEa-Fragments (mit DraI verdaute Library) ergab ein „Fusions-Produkt“ mit einer Größe von 956 bp. Das bedeutet: Das Produkt bestand im 5'-Bereich aus einem Teil der DNA-Sequenz des Transgens (von Exon-5 bis 3'-Ende) und aus einem anderen Teil der in 3'-liegenden DNA-Sequenz des Integrationsortes. Dies wurde durch einen Sequenzvergleich des NCBI-„Blast“-Programmes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ermittelt.


  
 5' αGSP2
   
 GTTTTTGTGCCTGAGCCAGTTCCTGGTTTCAGTATACTTACTTATGTATGAACTCCCCAACAGATTTATTAAGGAAAGAAT
   
 GAGAATTATTATTTGGCTCTTGTAATGGCTTTTATGCTTATCCTTAGCAGAACAAATCTCAAAGTGAGGGCCTGGCCTTGG
   
 GTAACATAATGACGATGACAGAGCAGGGGGGATTGTGGACTGGAATGACCACTGGTAATAACATCCTTGCATTAGGAA
   
 ATGGCCAGGGGACACTGAGGGCCAGCCTGGGTTCTATGGCAGAGTCTCATGTTTCAGATCCTCTACAGTGGCTGATTGTGA
   
 AATTAAGGAAGTGGTTAGCTTGGCTTCAGAAATAGGTCAGTGGAGTCGGGCTGGTGAAGGTCTTCTCAGTCCCTTCTCC
   
 AGCCCGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCTAAGTGAAGGGAGAAGGGATTCTTGTGTGCTTCAATGACTCTGTCTGTAA
   
 TGATCATAGGTGGTATTCTCAAATTAATCCAACCTGTAAAAATACTCTAATTGACAATTAATGAGTTAAACTGAATTTATT
   
 Integrationsort
   
 TCTTATAAATAA / CCCATGAGCAGGTCAGCAGGGTACATTCTTAATTTCTAGTTGCTATATGTGGGTCTAGCGATATTAGA
   
 TGGGGTCATCCCTAGGATAGTAAACCTGAGATGTCAGAATAACCCAGATGTACCAAGTCAGTAGGTAGTATCCTTTCATAGT
   
 CTCTACTTCAATCCTAGTCGTGGCTGCTTCTTTCAGTGAAGAAAGTGTAGCCAAGTAACTTTTCTCTTCAATGTGCATTT
   
 TGGTCACGGTGTTTACCACAGTAACAGAAATCAAAGTAACTCCCTCTCACTACAGGTGCTCATCCACTGTTTAGACTTGC
   
 AAATACTGCCAAGCCGAATGTGTTCTGCCTGTAGTAAAATTCCTGTATAAAGGTGTCTATTGTCTTCTTAAATCAGACTG
   
 ACCACGCGTGCCCTATAGT
   
 3' AP2

**Abb. 18: Fusions-Sequenz zwischen Transgen und endogener Sequenz.** Diese besteht aus einem Teil (3'-Ende) des DR4-IEa-Konstrukts und aus einem anderen Teil der endogenen Sequenz auf Chromosom 16 B4. 5'αGSP2-Gen-spezifischer Primer (grau hinterlegt) am 3' Ende des DR4-IEa-Konstruktes (Exon-5), 3' AP2- Adapterprimer (grau hinterlegt) aus dem Genome-Walking-Kit.

Die Integration des Transgens konnte somit exakt bestimmt werden. Der durch die FISH-Analyse abgeschätzte Bereich (B3-C2) bestätigte sich und konnte exakt im Bereich B4 zugeordnet werden.



**Abb. 19: Lokalisation des DR4-IE – Transgens.**

Exakter Integrationsort: Chromosom 16 B4, Position 39960499; VEGA-Genome Browser – Webseite ([www.vega.sanger.ac](http://www.vega.sanger.ac)). Der rote Pfeil markiert den exakten Integrationsort. Lila Balken - ESTs, brauner Balken - bekanntes Transkript. Schwarze Box um ESTs markieren diejenigen ESTs, die untersucht wurden.

Wie man in Abb. 19 gut erkennen kann, ist innerhalb des 150 kb großen Abschnitts nur ein bekanntes Transkript (Q6R5F6, brauner Balken) annotiert. Dieses liegt etwa 30 kb „downstream“ oder in 3'-Richtung der Integrationsstelle. Eine genauere *in silico*-Analyse zeigte jedoch, dass es sich hierbei um ein hypothetisches Protein handelte, dessen Funktion zudem noch unbekannt war. Außerdem sind einige ESTs in dieser Region (lila Balken) zu sehen. Als ESTs („Expressed Sequences Tag“) werden klonierte und bereits ansequenzierte cDNA-Abschnitte bezeichnet. Diese entpuppen sich nach eingehender Recherche oftmals als „echte“ Gene (Makalowska et al., 2002). Die mit der schwarzen Box umrandeten ESTs wurden deshalb mittels RT-PCR in Bl6-Kontrollmäusen genauer untersucht. Diese PCR ergab: Die ESTs sind alle einzeln in den verschiedensten Geweben exprimiert; sie gehören aber nicht zu einem Gen (Daten nicht gezeigt). Das heißt, die ESTs vor und nach der Integrationsstelle konnten nicht zusammenhängend amplifiziert werden. Auch eine RACE-PCR ergab keine zusätzlichen Sequenzen, die über die schon bekannten hinausgegangen wären (Daten nicht gezeigt). Eine RACE-PCR ermöglicht, ähnlich wie der „Genome Walk“,

unbekannte benachbarte Sequenzen zu ermitteln. Diese sind bei der RACE-PCR allerdings kodierende Bereiche auf cDNA Ebene.

### 3.2.4. Wie viele Konstrukte sind integriert?

Da die DR4-Konstrukte DR4-IE $\alpha$  und DR4-IE $\beta$  koinjeziert wurden, stellte sich die Frage, wie oft die jeweiligen Konstrukte integriert vorlagen und in welcher Reihenfolge dies geschah. Um zunächst zu klären wie oft sie an einer Stelle in das Genom integriert hatten, wurde eine spezielle Multiplex-PCR durchgeführt. Dafür wurden zunächst Abschnitte der jeweiligen Exon-2-Sequenzen in verschiedene Vektoren kloniert; ein Teil der Exon-2-Sequenz des DR4-IE $\alpha$ -Konstruktes in den pcDNA3.1-Vektor und ein Teil der Exon-2-Sequenz des DR4-IE $\beta$ -Konstruktes in den pUC19-Vektor. Unter Verwendung einer speziellen mathematischen Formel wurde dann in folgender Weise ein Kopien-Standard für jedes Konstrukt errechnet:

#### Kalkulation der Kopien-Standards am Beispiel des IE $\alpha$ -Konstruktes im pcDNA3.1-

##### Vektor:

Größe des Vektors (pcDNA3.1):	5428 bp	} Vektor + Insert: 6074 bp
Größe des Inserts (humanes Exon-2):	646 bp	
Größe des zu amplifizierten Produktes:	246 bp	
Haploide Größe des Maus-Genoms:	$3 \times 10^9$ bp	
Träger-DNA, die beimpft (=spiked) wird:	100 ng (0,1 $\mu$ g) [BI6-DNA]	
Faktor bei heterozygoten Integrationen:	x 0,5	
Faktor bei homozygoten Integrationen:	x 1,0	

##### Kalkulation:

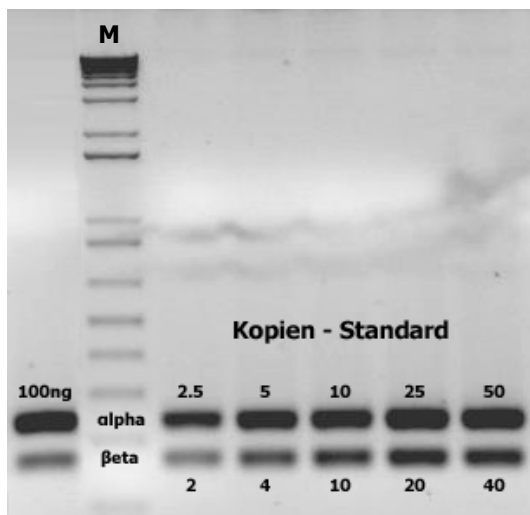
$$\frac{\text{Amplifiziertes PCR Produkt des Transgens}}{\text{Haploides Maus-Genom}} \times \text{Menge der Träger-DNA} \times \text{Faktor von } \mu\text{g in g} \times \text{Faktor der Homozygotie} = \text{Menge an DNA, die einer Kopie entspricht}$$

$$\frac{246 \text{ bp}}{3 \times 10^9 \text{ bp}} \times (0,1 \mu\text{g} \times 1 \times 10^{-6}) \times 1 = \underline{8,2 \times 10^{-15} \text{ g}}$$

Für den Standard einer einzigen Kopie müssten also  $8,2 \times 10^{-15} \text{ g}$  ( $=0,0082 \text{ pg}$ ) der transgenen DNA zu  $0,1 \text{ }\mu\text{g}$  der Träger-DNA gegeben werden. Weil es kaum durchführbar ist, diese geringe Menge zu pipettieren, wurden die Inserts in die Vektoren kloniert. Für die Plasmid-DNA wurde deshalb der Anteil der klonierten Insert-Sequenz berechnet:

Amplifiziertes PCR Produkt des Transgens <b>246 bp</b>	=	<b>0,04</b>	Anteil des amplifizierten PCR Produktes vom Plasmid
pcDNA3.1+Insert <b>6074 bp</b>			
Menge an DNA, die einer Kopie entspricht <b>0,0082 pg</b>	=	<b>0,205 pg</b>	= <b>1 Kopie</b>
Anteil des amplifizierten PCR Produktes vom Plasmid <b>0,04</b>		<b>1,025 pg</b>	= <b>5 Kopien</b>
		<b>2,050 pg</b>	= <b>10 Kopien usw.</b>

Mit der sich daraus ergebenden Mengen der entsprechenden Kopienanzahl wurde anschließend Bl6-DNA, die als negativer Hintergrund und gleichzeitig als Träger-DNA diente, „beimpft“. Das bedeutet: Die Menge an Konstrukt-DNA, die den errechneten Kopien entspricht, sollte als Template zugesetzt werden. Als Vergleichsprobe diente eine DR4-P-DNA, welche die Konstrukte beinhaltet und von der 100 ng eingesetzt wurden. In der anschließenden Multiplex-PCR wurden dann sowohl Primer für das DR4-IE $\alpha$ - als auch das DR4-IE $\beta$ -Konstrukt verwendet, um zu gewährleisten, dass die Menge des eingesetzten Templates bei beiden gleich war.



**Abb. 20: Ermittlung der Kopienanzahl der integrierten Konstrukte mittels Multiplex-PCR.**

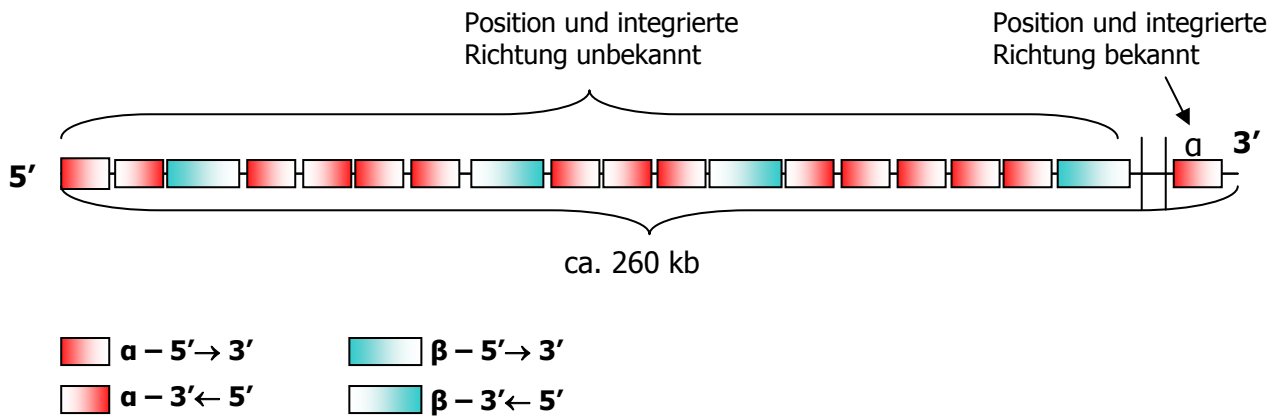
*M-1 kb Marker; Links neben dem Marker: die Testprobe der DR4-P-DNA (100 ng als Template).*

*Rechts neben dem Marker: die Anzahl der Kopien der jeweiligen Konstrukte als Standard (alpha: 2,5 - 50; beta: 2- 40).*

*Die DR4-IE $\alpha$ -spezifischen Produkte waren 248 bp groß, wohingegen die DR4-IE $\beta$ -spezifischen Produkte eine Größe von 170 bp aufwiesen. Die Unterschiede in der Intensität der Banden bei gleicher Kopienzahl (siehe 10 Kopien) sind auf die unterschiedlichen Größen der Fragmente zurückzuführen.*

Vergleicht man in Abb. 20 die Testprobe links neben dem Marker mit den Standards auf der rechten Seite, so kann man bereits mit bloßem Auge erkennen, dass die Kopienzahl des alpha-Konstruktes in der Testprobe im Bereich zwischen 10 und 50 Kopien lag. Die beta-Konstrukte hingegen waren in dem Bereich zwischen zwei und vier Kopien des Standards einzuordnen. Darüber hinaus konnte das Verhältnis zwischen alpha- und beta-Kopien der Testprobe mittels der Gel-Illuminator Software (Gene Tool) auf 5:1 (alpha:beta) berechnet werden. Daraus folgt: Es sind etwa fünf Mal so viele alpha-Konstrukte wie beta-Konstrukte integriert. Nimmt man also an, dass etwa vier beta-Konstrukte integriert waren, so würde das bei einem Verhältnis von 5:1 bedeuten, dass etwa 20 alpha-Konstrukte parallel integriert hatten. Bedenkt man weiterhin, dass jedes alpha-Konstrukt eine Größe von 9,5 kb und die beta-Konstrukte eine Größe von 18 kb besitzen, ergibt sich also ein Bereich der integrierten Konstrukte, der sich auf ungefähr 262 kb beläuft.

Es ist bekannt, dass koinjezierte Konstrukte in verschiedener Anzahl und willkürlicher Reihenfolge integrieren können und über einen langen Zeitraum stabil bleiben. Des Weiteren können so genannte „head-to-tail“-Anordnungen entstehen. Dies bedeutet, dass sie in umgekehrter Richtung also  $5' \rightarrow 3'$  zu  $3' \leftarrow 5'$  stehen (Aigner et al., 1999). Die Reihenfolge, in der die Konstrukte integriert hatten, war auch nach wiederholten Versuchen der Amplifikation der jeweiligen 5'- und 3'-Sequenzen nicht zu bestimmen. Lediglich das 3' Ende des gesamten integrierten Bereiches konnte, wie schon oben beschrieben, mittels „Genome Walk“ bestimmt werden. Dabei handelte es sich um ein alpha-Konstrukt in  $5' \rightarrow 3'$  Richtung.



**Abb. 21: Integrationsbereich des gesamten Transgens in Chromosom 16.** Die Darstellung der Konstrukte reflektiert nicht deren tatsächliche Anordnung. Diese wurde völlig willkürlich ausgewählt. Bekannt sind lediglich die ungefähre Gesamtgröße des integrierten Konstrukt-Komplexes (ca. 260 kb) sowie das in 5' Richtung integrierte letzte Konstrukt.

Die Fragestellung der Kopienanzahl und der Reihenfolge bzw. Leserichtung der integrierten Konstrukte zueinander konnte also nur teilweise geklärt werden.

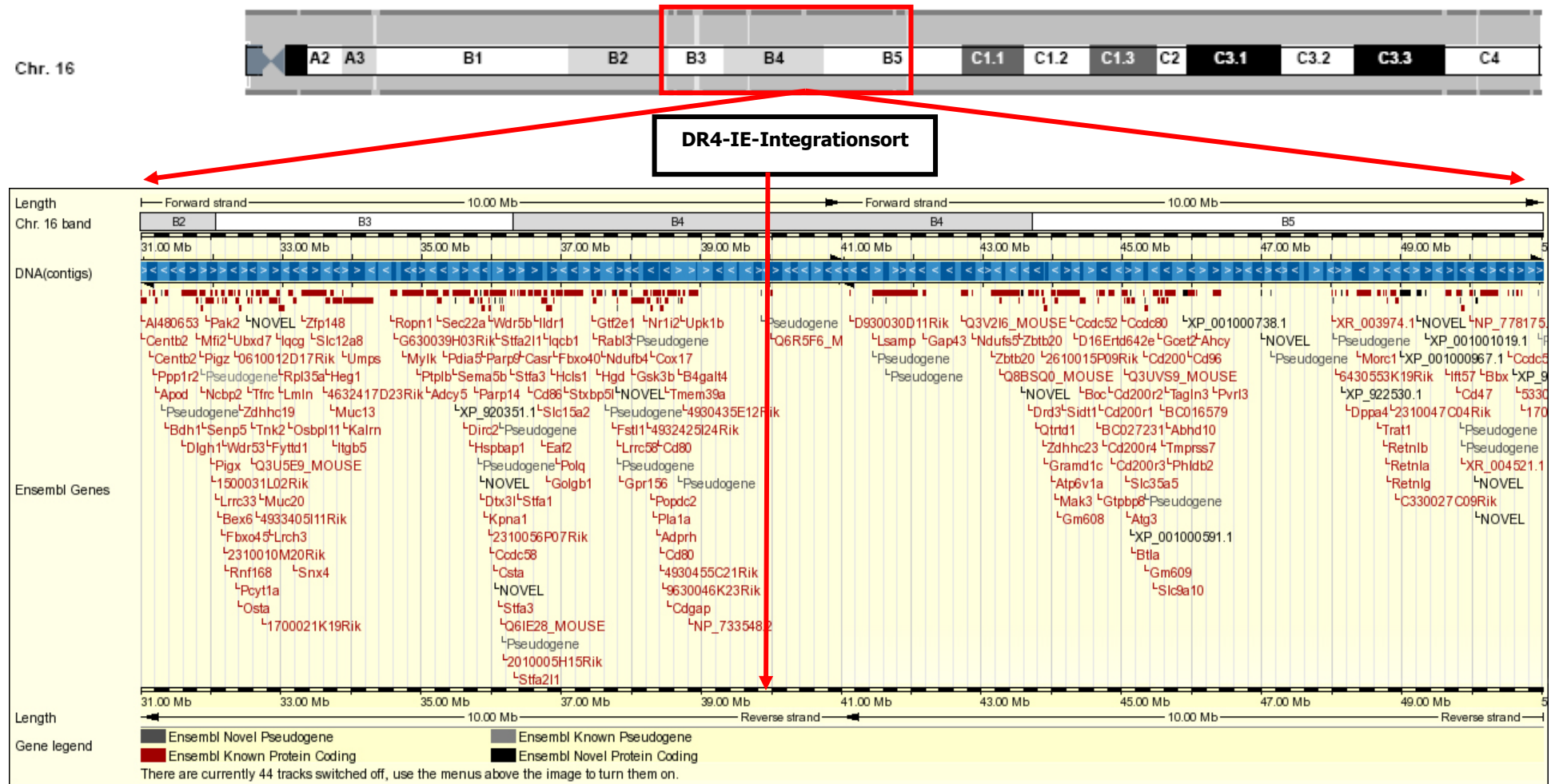
### 3.2.5. Die entferntere Nachbarschaft des Integrationsortes

In der unmittelbaren Umgebung des festgelegten Integrationsortes (150 kb) sind, wie schon in Abb. 19 zu sehen war, keine bzw. keine funktionell bekannten Gene annotiert. Da der Einfluss der Integration durch regulatorische Elemente des Transgens aber über weitere Distanzen reichen könnte (Seyffert, Lehrbuch der Genetik 2003), wurden zunächst im Abstand von 10 MB per *in silico*-Analyse in beide Richtungen ermittelt. Die Annahme, dass durch die Integration ein Onkogen angeschaltet oder ein Suppressorgen ausgeschaltet wurde, trifft also nicht durch die direkte Integration in die kodierenden Bereiche dieser Gene zu. Darüber hinaus besteht aber die Möglichkeit, dass die Promotor oder Enhancer des MHC-Klasse-II-Transgens über eine weitere Entfernung die Funktionen anderer Gene steuern könnten. Enhancer werden als distale regulatorische Elemente bezeichnet, da sie in einer größeren Distanz zu Promotoren lokalisiert sein können. Dabei spielt die Orientierung zum Promoter nur eine unwesentliche Rolle. An diese Enhancer können regulatorische Transkriptionsfaktoren (RTF) binden. Es ist bereits beschrieben worden, dass diese



Transkriptionsfaktoren durch Faltung der lokalen Chromatinstruktur in die räumliche Nähe des Promotors gebracht werden können, um dann direkt oder über so genannte Adaptorproteine Kontakt mit den generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) der Transkriptionsmaschinerie aufzunehmen (Seyffert, Lehrbuch der Genetik 2003).

Wie in Abb. 22 zu sehen ist, gab es in dem Bereich von 10 MB um die Integrationsstelle sehr viele Gene, die durch die Integration des Transgens beeinflusst worden sein könnten. Auf einige dieser Gene, die von solch einem Mechanismus betroffen sein könnten, soll aber erst zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen werden (siehe 3.4.). Zunächst sollte die Zucht einer DR4-F1-Generation Aufschluss über die Art des potentiellen Kandidatengens in Bezug auf ein Onko- oder Suppressorgen geben.



**Abb. 22: Bereich von 10 MB um die Integrationsstelle: ENSEMBL-Webseite: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)**

Ausschnitt aus Chromosom 16 B2-B5: Position 31 MB-51 MB

In diesem Bereich liegen 157 bekannte Protein-kodierende Sequenzen, 16 erst kürzlich bekannt gewordene Protein-kodierende Sequenzen und 14 Pseudogene.

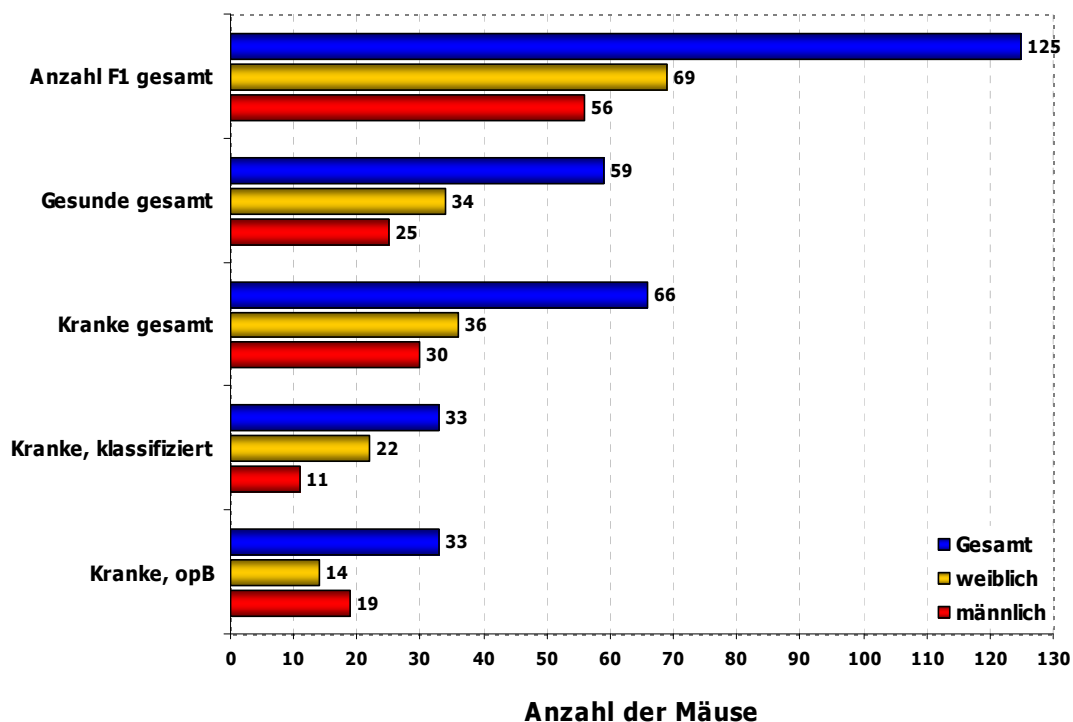
Der rote Pfeil markiert den Integrationsort des DR4-IE-Transgens.

### 3.3. Zucht der DR4-F1 Generation

Die DR4-F1-Generation des DR4-P-Stammes wurde durch Verpaarung der DR4-P-Mäuse mit Bl6-Mäusen erzeugt. Hierfür wurden jeweils männliche und weibliche Tiere aus beiden Stämmen herangezogen, so dass sowohl DR4-P-Männchen als auch Bl6-Männchen mit den jeweiligen Weibchen des anderen Stammes verpaart wurden. Das Charakteristikum dieser DR4-F1-Mäuse ist die Heterozygotie in Bezug auf das Transgen und auf den murinen MHC-Klasse-II-Lokus. Diese Heterozygotie sollte weitere Hinweise auf die möglichen Mechanismen der Tumorentstehung liefern, sowohl in den parentalen DR4-P-Mäusen als auch in der DR4-F1-Generation.

#### 3.3.1 Tumorentstehung in DR4-F1-Mäusen

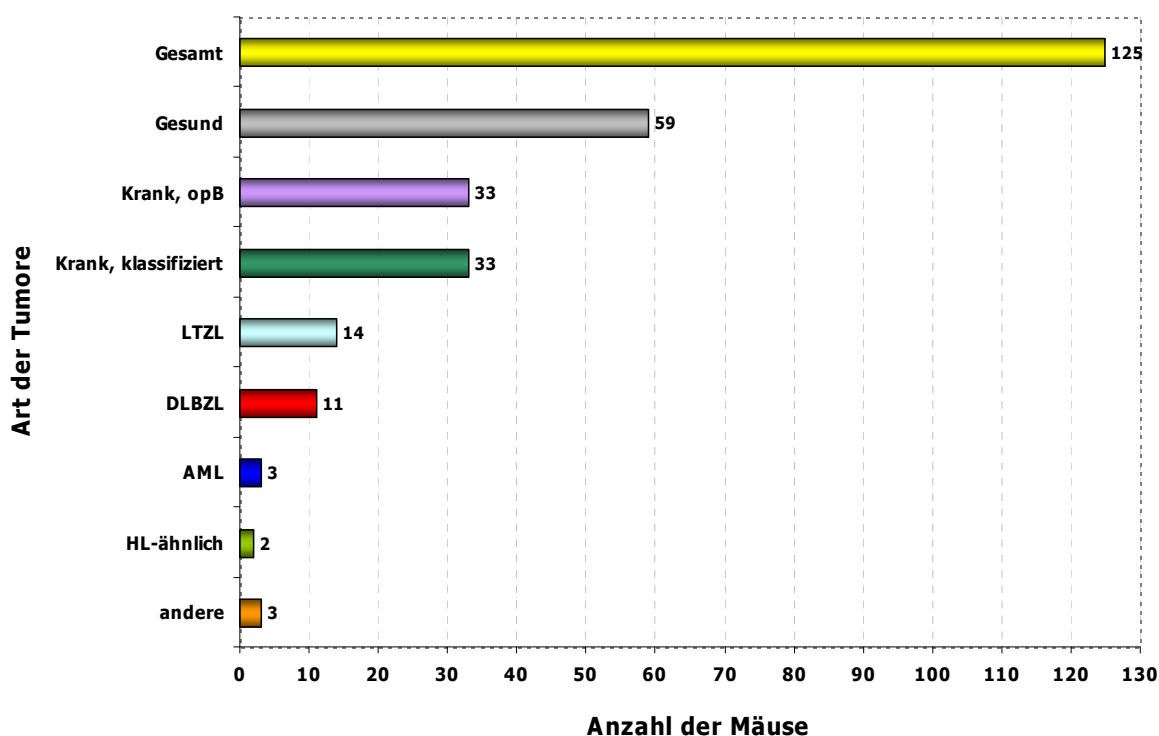
Aus dieser Zucht gingen 237 DR4-F1-Mäuse hervor, von denen 125 unter genauer Aufsicht und Kontrolle heranwuchsen. Wie sich herausstellte, entwickelten auch die DR4-F1-Mäuse Tumoren, die durch die Pathologie unter der Leitung von Dr. Leticia Quintanilla-Fend (PATH-GSF) klassifiziert wurden.



**Abb. 23: Übersicht erkrankter Mäuse der DR4-F1-Zucht:** Kranke, opB: erkrankte Mäuse, bei denen keine pathologischen Befunde angefertigt wurden (ohne pathologischen Befund). Gesamtzahl (blaue Balken); Anteil weiblicher Mäuse (orange Balken); Anteil männlicher Mäuse (rote Balken).

Von 125 DR4-F1-Mäusen in dieser Studie erkrankten 66 Tiere (52,8%), also knapp über die Hälfte. Pathologische Untersuchungen wurden wiederum bei 33 (50%) Mäusen, der Hälfte aller erkrankten Tiere durchgeführt. Der Grund für diese Einschränkung waren Mäuse, die teilweise am Wochenende oder über Nacht starben, so dass es nicht mehr möglich war Organe zu konservieren. Diese Tiere wurden als „erkrankt“ klassifiziert und ebenfalls in der Studie berücksichtigt. 59 Mäuse (47,2 %) blieben bis zum Ende der Studie (20 Monate) unauffällig und wurden als „gesund“ klassifiziert. Betrachtet man die Aufteilung der männlichen und weiblichen DR4-F1-Mäuse pro Gruppe, so ist tendenziell eine leichte Verschiebung zu mehr erkrankten weiblichen Tieren zu erkennen.

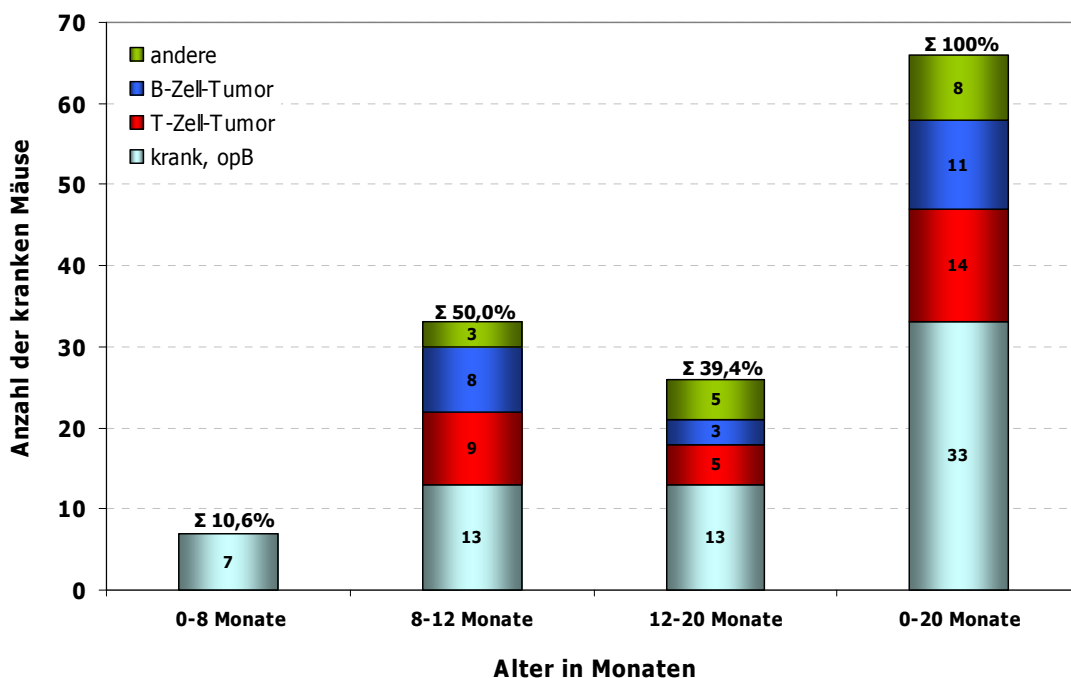
Nach einigen Monaten wurden die ersten auffälligen Tiere seziiert, die Organe konserviert und für pathologische Untersuchungen in das Institut für Pathologie nach Neuherberg geschickt.



**Abb. 24: Phänotypisierte Tumoren der DR4-F1-Generation.** Krank, opB: erkrankte Mäuse, bei denen keine pathologischen Befunde erhoben wurden (ohne pathologischen Befund). LTZL: Lymphoblastoides T-Zell-Lymphom; DLBZL: Diffuses, großzelliges (large) B-Zell-Lymphom; AML: Akute myeloische Leukämie, HL-ähnlich: Hodgkin-Lymphom-ähnlicher Tumor; andere: andere Tumoren als die angegebenen.

Von den phänotypisierten Tumoren der DR4-F1-Mäuse wurden 14 (11,2%) als Lymphoblastoide T-Zell-Lymphome (LTZL) klassifiziert (türkisfarbener Balken). 11 Tumoren (8,8%) wurden als diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBZL) diagnostiziert (roter Balken). Mit einer Frequenz von 2,4% (drei Mäuse) wurde eine AML (Akute myeloische Leukämie) festgestellt (blauer Balken). HL-ähnliche (Hodgkin-Lymphom-ähnliche) Tumoren konnten nur bei zwei Mäusen (1,6%) festgestellt werden (grüner Balken). Andere Tumoren wiesen drei Mäuse auf, das entspricht einer Frequenz von 2,4% (orangefarbener Balken).

Nachdem die DR4-F1-Mäuse auch Tumoren entwickelt hatten, stellte sich die Frage, ob diese Tumoren mit einer Verschiebung bezüglich der Zeit und der Frequenz im Vergleich zu der DR4-P-Generation auftraten. Hierfür wurden zunächst alle erkrankten DR4-F1-Mäuse in einer Zeitkinetik ausgewertet.



**Abb. 25: Alters-abhängige Entwicklung von Tumoren in DR4-F1-Mäusen:** Prozentangaben oberhalb der Säulen = Anteil der Mäuse in %, die sich auf alle erkrankten Mäuse (66 Tiere) bezieht. Krank, opB: ohne pathologischen Befund (türkisfarbene Säulen), T-Zell-Tumoren (rote Säulen), B-Zell-Tumoren (blaue Säulen), andere Tumoren (grüne Säulen): AML, andere: HL-ähnliche und andere Tumoren. Die Säule ganz rechts umfasst alle erkrankten Tiere über den Zeitraum der Studie von 0-20 Monaten.

Im Alter zwischen 0-8 Monaten erkrankten sieben Mäuse (10,6%), von denen aber keine pathologisch untersucht wurden (türkisfarbene Säulen). Zwischen 8-12 Monaten erkrankten

insgesamt 33 Mäuse (50,0%), davon hatten neun Mäuse (13,6%) T-Zell-Tumoren (rote Säulen), acht Mäuse (12,1%) B-Zell-Tumoren (blaue Säulen) und drei Tiere (4,5%) andere Tumoren (grüne Säulen). Im Alter zwischen 12 und 20 Monaten bekamen 26 Tiere (39,4%) Tumoren, die sich folgendermaßen aufteilten: 13 Kranke, opB (19,7%), fünf T-Zell-Tumoren (7,6%), drei B-Zell-Tumoren (4,5%) und fünf andere Tumoren (7,6%). Bei der DR4-F1-Generation lag der „Peak“ der Tumorentwicklung also zwischen 8-12 Monaten, da hier 50%, also die Hälfte aller Tumoren entstanden.

### 3.3.2. Vergleich der Tumorfrequenz in Abhängigkeit vom Alter zwischen DR4-P- und DR4-F1-Mäusen

Die Daten der Tumorentwicklung bei DR4-P-Mäusen und die Resultate der DR4-F1-Mäuse wurden in einer Tabelle zusammengefasst, um zunächst die Frage zu klären, ob es eine Verschiebung der Frequenz gegenüber der DR4-P-Generation gab.

**Tab. 2: Vergleich der Tumorfrequenz von DR4-P- und DR4-F1-Mäusen**

<b>DR4-P Mäuse</b>	<b>Anzahl der Tiere</b>	<b>Anteil in % von allen</b>	<b>Anteil in % mit pathologischem Befund (Anzahl)</b>	<b>Differenz in % d. Mäuse mit pathologischem Befund (Anzahl)</b>
Anzahl der Mäuse/Studie	131	100	69,4 (91)	+43 (58)
Kein Tumor	40	30,5	-	-
Erkrankte gesamt	91	69,5	100	+50
LTZL	33	25,2	36,3	-6,2
DLBZL	35	26,7	38,5	+5,1
AML	4	3,1	4,4	-4,7
HL-ähnliche	9	6,9	9,9	+3,8
andere	10	7,6	11,0	+1,9
<b>DR4-F1 Mäuse</b>	<b>Anzahl der Tiere</b>	<b>Anteil in % von allen</b>	<b>Anteil in % mit pathologischem Befund (Anzahl)</b>	<b>Differenz in % d. Mäuse mit pathologischem Befund (Anzahl)</b>
Anzahl der Mäuse/Studie	125	100	26,4 (33)	-43 (-58)
Kein Tumor	59	47,2	-	-
Erkrankte gesamt	66	52,8	50	-50
LTZL	14	11,2	42,4	+6,2
DLBZL	11	8,8	33,3	-5,1
AML	3	2,4	9,1	+4,7
HL-ähnliche	2	1,6	6,1	-3,8
andere	3	2,4	9,1	-1,9

Betrachtet man zunächst die gelb markierten Werte (Tab. 2) in der dritten Spalte, so kann man erkennen, dass die DR4-P-Generation mit 69,5 % gegenüber 52,8 % der DR4-F1-Generation eine insgesamt 16,7% höhere Tumorfrequenz aufwies. Auffallend war außerdem, dass die Tumorfrequenz für einzelne Tumorgruppen (LTZL, DLBZL, AML, HL-ähnliche, andere) in den beiden untersuchten Mausstämmen zum Teil unterschiedlich ausfiel. In Anbetracht der Tatsache, dass in der DR4-F1-Generation aber nur 33 Tiere pathologisch untersucht wurden, bei den parental DR4-P-Mäusen hingegen 91 Tiere, sollte diese Einschränkung mit in die Berechnung einfließen. Berechnete man also die Anzahl der verschiedenen Tumoren nur auf die von der Pathologie untersuchten Mäuse (türkisfarben markiert), so waren die Unterschiede längst nicht mehr so groß.

Um zu überprüfen, ob es in der zeitlichen Entstehung der Tumoren Unterschiede zwischen den beiden Stämmen gab, wurden die Tumoren in Abhängigkeit ihrer zeitlichen Entstehung ebenfalls in einer Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 3: Tumorfrequenz in Abhängigkeit vom Alter - Vergleich zwischen DR4-P- und DR4-F1-Mäusen**

<b>DR4-P Mäuse (Von 91)</b>	<b>0-8 Monate Anzahl [%]</b>	<b>8-12 Monate Anzahl [%]</b>	<b>12-20 Monate Anzahl [%]</b>	<b>0-20 Monate Anzahl [%]</b>
LTZL	1 [1,1]	18 [19,8]	14 [15,4]	<b>33 [36,3]</b>
DLBZL	0 [0]	12 [13,2]	23 [25,3]	<b>35 [38,5]</b>
andere	0 [0]	4 [4,4]	19 [20,9]	<b>23 [25,3]</b>
<b>Gesamt</b>	<b>1 [1,1]</b>	<b>34 [37,4]</b>	<b>56 [61,6]</b>	<b>91 [100]</b>
<b>DR4-F1 Mäuse (Von 33)</b>	<b>0-8 Monate Anzahl [%]</b>	<b>8-12 Monate Anzahl [%]</b>	<b>12-20 Monate Anzahl [%]</b>	<b>0-20 Monate Anzahl [%]</b>
LTZL	0 [0]	9 [27,3]	5 [15,2]	<b>14 [42,4]</b>
DLBZL	0 [0]	8 [24,2]	3 [9,1]	<b>11 [33,3]</b>
andere	0 [0]	3 [9,1]	5 [15,2]	<b>8 [24,2]</b>
<b>Gesamt</b>	<b>0 [0]</b>	<b>20 [60,6]</b>	<b>13 [39,4]</b>	<b>33 [100]</b>

Eine allgemeine Betrachtung der einzelnen Tumorfrequenzen in Abhängigkeit vom Alter macht auch bei dieser Auswertung wenig Sinn, da einige Mäuse der DR4-F1-Generation bereits vor einer möglichen Erhebung des Befundes gestorben waren. In welcher Frequenz die verschiedenen Tumoren in dieser Gruppe (Kranke, opB) auftraten, wäre daher rein

spekulativ. Um eine Aussage treffen zu können, wurden deshalb nur die Gesamtwerte der jeweiligen Zeitabschnitte als vergleichbar erachtet (Tab.3, orangefarben markiert). In dem parental DR4-P-Stamm entstanden die meisten Tumoren zwischen 12-20 Monaten (61,6%), gefolgt von 37,4% an Tumoren, die zwischen 8-12 Monaten entstanden. Im Gegensatz hierzu entwickelten sich in der DR4-F1-Generation die häufigsten Tumoren zu einem früheren Zeitpunkt, nämlich in einem Alter zwischen 8-12 Monaten (60,6%), gefolgt von 39,4% zwischen 12-20 Monaten. In der DR4-F1-Generation zeigte sich also eine deutliche Verschiebung in Richtung einer früheren Entstehung der Tumoren.

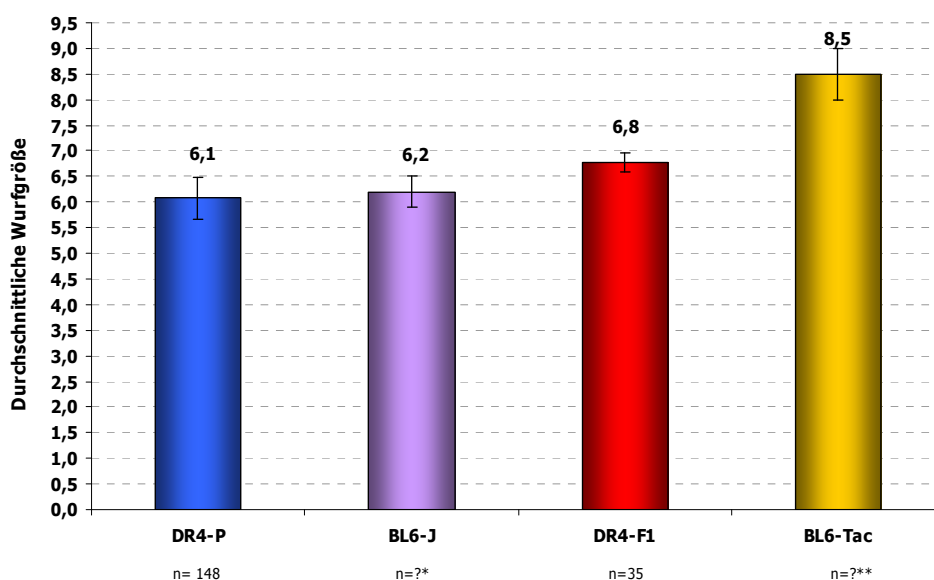
Die homozygoten DR4-P-Mäuse entwickelten mit einer höheren Frequenz Tumoren als die Mäuse der DR4-F1-Generation. Allerdings entstanden die Tumoren zu einem späteren Zeitpunkt. Anscheinend reicht also die Integration des Transgens in ein Chromosom aus, um die Entstehung von Tumoren zu begünstigen. Gleichzeitig ist in der DR4-F1-Generation in nur einem Allel der murine MHC-Klasse-II-Lokus ausgeschaltet. Beide Mausstämme besitzen zwei unterschiedlich „funktionierende“ MHC-Klasse-II-Allele. Die Annahme, dass das DR4-Allel nicht optimal in seiner Funktion ausgebildet ist, könnte deshalb für eine größere „Immunsuffizienz“ sprechen. DR4-P-Mäuse besitzen zwei dieser Allele, die Mäuse der DR4-F1-Generation aber nur eines, gleichzeitig aber einen normalen MHC-Klasse-II-Haplotyp. Dieser müsste in Bezug auf eine erfolgreiche Immunität voll ausreichend sein. Da die DR4-F1-Mäuse aber Tumoren entwickelten scheint diese Immunsuffizienz dennoch die Entstehung der Tumoren zu erlauben. Zusammenfassend bedeutet dies: Die Immunsuffizienz ist kein nötiger Faktor für die Entstehung von Tumoren. Zudem scheint ein Allel des Transgens auszureichen, um die Tumorentstehung zu begünstigen, was für einen dominanten oder Onkogeneffekt spricht.



### 3.3.3. Generelle Unterschiede zwischen DR4-P- und DR4-F1-Mäusen

Nachdem die Unterschiede der Tumorfrequenz in Abhängigkeit vom Alter der beiden Mausstämmen untersucht wurden, sollten darüber hinaus grundlegende Unterschiede zwischen DR4-P-, DR4-F1- und BL6-Mäusen analysiert werden. Ein Grund hierfür war die Beobachtung, dass die DR4-P-Generation weniger Mäuse in der Nachzucht produzierte als andere Stämme. Zudem schienen die DR4-P-Mäuse öfter Totgeburten hervorzubringen und die Nachkommen waren bei der Geburt und auch im Erwachsenen-Alter oft kleiner als bei anderen Stämmen. So wurden zunächst die Wurfgrößen der beiden DR4-Generationen im Vergleich zu BL6-Kontrollmäusen untersucht.

Da die DR4-P-Generation auf dem BL6-Hintergrund der Jackson-Zucht (C57BL6/J, USA) basierte, die DR4-F1-Mäuse aber durch Rückkreuzung mit der BL6-Zucht (C57BL6/Tac, Dänemark) von Taconic entstanden waren, wurden diese Kontrollen einzeln aufgeführt. Allerdings sollte beachtet werden, dass die BL6-Kontrollen nur vom Züchter bezogen wurden und nicht von uns selbst gezüchtet wurden. Die Umwelteinflüsse in den verschiedenen Stallungen tragen sicherlich teilweise zu den unterschiedlichen Geburtsraten bei.



**Abb. 26: Durchschnittliche Wurfgrößen der Mausstämmen DR4-P, BL6-J, DR4-F1 und BL6-Tac.** Blaue Säulen: DR4-P – Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus 148 Würfen; lila Säulen: BL6-J – Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus  $n=?^*$  (\*[www.jax.org](http://www.jax.org)), rote Säulen: DR4-F1 – Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus 35 Würfen; orangefarbene Säulen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus  $n=?^{**}$  (\*\* persönliche Mitteilung von Taconic).

Wie sich zeigte, waren die Unterschiede in der durchschnittlichen Wurfgröße zwischen den drei Maustämmen (DR4-P, DR4-F1 und Bl6-J) weniger unterschiedlich als erwartet. Dennoch produzierten die parentalen DR4-P-Mäuse mit 6,1 Nachkommen (blaue Säulen) im Durchschnitt 10,3% weniger Nachkommen als die DR4-F1-Generation (rote Säulen) mit 6,8 Nachkommen. Dies ist wahrscheinlich auf die Verpaarung mit den Bl6-Tac-Mäusen zurückzuführen, die im Durchschnitt fast 2 ( $8,5 \pm 0,5$ ) Mäuse mehr pro Wurf produzierten (orangefarbene Säule) als alle anderen Stämme.

Eine statistische Analyse der totgeborenen Mäuse konnte nicht erstellt werden, da diese oftmals vor der möglichen Datenerhebung der Wurfzahl von den Elterntieren gefressen wurden.

#### **3.3.3.1. Untersuchungen des Geburtsgewichtes bei Neugeborenen**

Die Analyse des Geburtsgewichts bei Neugeborenen zeigte keine Unterschiede. Sowohl die DR4-P als auch die DR4-F1-Nachkommen hatten ein durchschnittliches Geburtsgewicht zwischen 0,9 g und 1,1 g. Nach Angaben der Züchter (Jackson und Taconic) der Bl6-Mäuse konnte dieser Wert auch für die Bl6-Mäuse bestätigt werden. Daten hierzu wurden nicht gezeigt.

### **3.4. Chromosom 16 – Der Ursprung der Tumorentwicklung?**

In den vorangegangenen Kapiteln konnten bereits einige Mechanismen (retrovirale Insertion, endogen, aktivierter Provirus, MHV-Infektion, Störung der Hämatopoiese, Immuninsuffizienz) ausgeschlossen werden, welche die Tumorentstehung in DR4-P-Mäusen begünstigen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Ursprung der Tumorentwicklung mit der Integration des Transgens in enger Verbindung steht. Deshalb stellte sich zwangsläufig die Frage: Gibt es im Bereich der Integration in Chromosom 16 ein Onkogen, das zumindest teilweise für die Entstehung der hämatopoietischen Tumoren verantwortlich ist? Zur Klärung dieser Frage haben wir Kontakt mit der Gruppe von Prof. Matthias Wabl (Institut für Mikrobiologie und Immunologie) von der Universität in Kalifornien, San Francisco (UCSF) aufgenommen. Prof. Wabl untersucht mit seiner Gruppe unter anderem eine durch retrovirale Insertion vermittelte Mutagenese in Mäusen (Wang et al., 2006) und konnte durch dieses Verfahren mehrere Onkogene experimentell bestätigen. In dem Bereich von etwa 10 MB vor und nach der Integration konnten daher sieben Onkogene bestimmt werden, die uns Dr. Wabl als vertrauliche Information zur Verfügung stellte. Da die Daten noch nicht publiziert wurden, werden diese Onkogene mit einer Ausnahme nicht namentlich erwähnt.

Nach einigen Vorversuchen konnte mittels qRT-PCR die Expression aller sieben Kandidaten in Tumor- und Normalgeweben nachgewiesen werden, wobei sich das Onkogen *Trat1* (Trim), ein T-Zell-Rezeptor assoziierter Transmembran-Adapter 1, als potentieller Kandidat herausstellte. *Trat1* ist auf Chromosom 16 auf dem Antisense – Strang von Position 48,65 - 48,69 MB annotiert und somit etwa 8,7 MB von der Integration des DR4-Transgens entfernt.

#### **3.4.1. Das Kandidaten-Onkogen *Trat1* (Trim)**

*Trat1* wird als Transmembran-Adapter-Molekül bezeichnet, das stark im Thymus und peripheren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert ist. Zudem wird *Trat1* die Funktion einer integralen Komponente des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TZR/CD3) und eine mögliche Beteiligung in der Wiederaufbereitung des T-Zell-Rezeptors („TCR cycling“) zugeschrieben. *Trat1*-Knockout-

Mäuse zeigten ein reduziertes Körpergewicht und eine proportionale Reduzierung der Zellzahl in lymphoiden Organen. Darüber hinaus waren die T- und B-Zell-Funktionen nicht beeinträchtigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *Trat1* nicht für die Positiv- bzw. Negativ-Selektion benötigt wird. Da diese *Trat1*<sup>-/-</sup>-Mäuse keinen Phänotyp aufwiesen, wurde vermutet, dass *Trat1* seine Funktion mit anderen Adapter-Proteinen teilen könnte, die wie *Trat1* in der Regulierung von Immun-Antworten beteiligt sind (Kolsch et al., 2006).

### 3.4.2. Untersuchungen der *Trat1*- Genexpression

Im Folgenden sollen die Versuche gezeigt werden, die zu der Annahme führten, dass *Trat1* ein potentieller Kandidat für die Tumorentstehung in DR4-P-Mäusen sein könnte. Im ersten Versuch sollten die Unterschiede der *Trat1*-Expression zwischen den drei Mausstämmen Bl6, DR4-P und DR4-F1 mittels qRT-PCR untersucht werden. Als Proben wurden Milzzellen gesunder, drei Monate alter Mäuse von je einem weiblichen und einem männlichen Tier verwendet. Aus der isolierten RNA wurde cDNA synthetisiert. Im Anschluss an die letzte Elongationsphase der qRT-PCR wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produktes durchgeführt. Dies ist ein Standardverfahren und wird deshalb bei den weiteren Versuchen nicht mehr erwähnt.

**Tab. 4: Vergleichende *Trat1*-Expression in der Milz bei den Mausstämmen Bl6, DR4-P, und DR4-F1**

Bl6_m	Bl6_w	DR4-P_m	DR4_Pw	DR4-F1_m	DR4-F1_w
1	1	+224x	+48,5x	+4,5x	+17,2x

*Angegeben wurden die Werte aus je einer 3 Monate alten Maus. Die unterschiedliche Expression wurde mit Hilfe des Haushaltsgens 18S rRNA normalisiert und mit den jeweils geschlechtsspezifischen Kontrollen aus der Bl6-Maus verglichen, wobei die Werte der Bl6-Kontrollen auf 1 gesetzt wurden. Die Unterschiede wurden als x-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.*

Die *Trat1*-Expression der DR4-P- und DR4-F1-Mäuse waren allesamt im Vergleich zu den jeweiligen geschlechtsspezifischen Bl6-Kontrollen erhöht. Eine besonders starke

Überexpression von *Trat1* konnte in den DR4-P-Mäusen festgestellt werden. Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Mäuse der DR4-F1-Generation auch eine erhöhte Genexpression aufwiesen, diese aber hinter der starken *Trat1*-Expression der DR4-P-Mäuse zurückblieb.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob es Unterschiede der *Trat1*-Expression in verschiedenen erkrankten und gesunden Geweben von DR4-P- und Bl6-Mäusen gab. Hierfür wurde RNA aus Knochenmark, Gehirn und Milz von jungen (3 Monate) DR4-P-Mäusen isoliert. Zudem wurde von erkrankten, nicht-klassifizierten Mäusen aus Leber und Lymphknoten ebenfalls RNA isoliert. Als Kontrollen dienten die gleichen Organe aus der Bl6-Maus. Anschließend erfolgte eine cDNA-Synthese.

**Tab. 5: *Trat1*-Expression in verschiedenen erkrankten und gesunden Geweben**

Bl6-Kontrollen	Knochenmark	Gehirn	Milz	Leber	Lymphknoten
DR4-P-Proben	+2,5x	+91,1x	+104,7x	+27939x (Tumor)	+25,5x (Tumor)

*Angegeben wurden die Werte aus je einer Maus. Die unterschiedliche Expression wurde mit Hilfe des Haushaltsgens 18S rRNA normalisiert und mit den Bl6-Kontrollen verglichen, wobei die Werte der Bl6-Kontrollen auf 1 gesetzt wurden. Die Unterschiede wurden als x-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.*

Im Vergleich der „gesunden“ Organe wie Gehirn und Milz konnte eine Überexpression von *Trat1* in DR4-P-Mäusen festgestellt werden. Auch für den Lymphknotentumor war diese Tendenz zu erkennen. Eine massive Überexpression (27939-fach) war vor allem in der tumorösen Leber der DR4-P-Maus detektierbar.

Laut Literaturangaben wird *Trat1* nur von T-Zellen, aber nicht von B-Zellen exprimiert (Kirchgessner et al., 2001). Um die Frage zu klären, ob dies in der DR4-P-Generation der Fall ist, wurden mittels qRT-PCR CD4<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-fraktionierte Populationen der Milz aus männlichen und weiblichen Tieren der DR4-P-Mäuse untersucht. Diese wurden mittels magnetischer Sortierung angereichert. Als Kontrollen dienten hierbei ebenfalls CD4<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Populationen aus je drei Bl6-Mäusen. Aus der RNA dieser Fraktionen, die aus einem Pool von je drei Mäusen bestand, wurde zunächst cDNA synthetisiert.

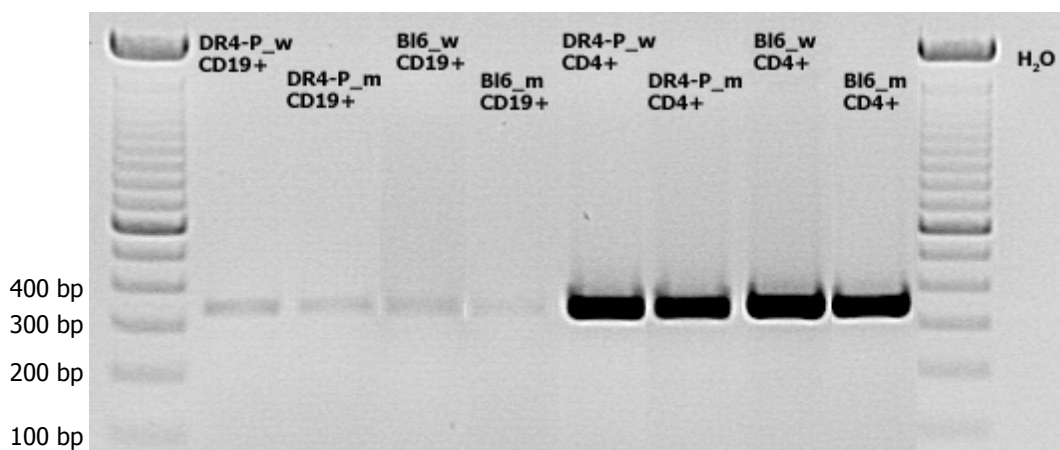
**Tab. 6: *Trat1*-Expression in  $CD4^+$ - und  $CD19^+$ -Zellen**

Bl6	$CD4^+$ _m	$CD4^+$ _w	$CD19^+$ _m	$CD19^+$ _w
DR4-P	+1,8x	-5,1x	+2452x	+98x

Angegeben wurden die Einzelwerte aus einem Pool von je drei gesunden Mäusen. Die unterschiedliche Expression wurde mit Hilfe des Haushaltsgens *18S rRNA* normalisiert und mit den jeweils geschlechtsspezifischen Kontrollen aus der Bl6-Maus verglichen, wobei die Werte der Bl6-Kontrollen auf 1 gesetzt wurden. Die Unterschiede wurden als x-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.

Diese Analyse ergab eine starke Überexpression von *Trat1* in den  $CD19^+$ -Fraktionen der DR4-P-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen. Die  $CD19^+$ -Fraktionen beider Mausstämme hatten eine geringe Menge an Transkripten von *Trat1* amplifiziert (siehe Abb. 27). Ob diese jedoch als Protein an der Oberfläche exprimiert werden, sollte in einem späteren Versuch geklärt werden. In der  $CD4^+$ -Fraktionen beider Mausstämme waren keine großen Unterschiede in der *Trat1*-Expression aufgetreten, was vermutlich daran lag, dass es sich um angereicherte Populationen handelte.

Zur Verdeutlichung wurden die amplifizierten Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen:



**Abb. 27: *Trat1*-Expression in  $CD4^+$ - und  $CD19^+$ -Zellen.**  $H_2O$ -Negativkontrolle (keine cDNA im Ansatz enthalten). Die *Trat1*-spezifischen Primer ergaben Produkte der Größe von 330 bp.

Die aufgetragenen Produkte nach der Gelelektrophorese geben das Ergebnis der Expressionsanalyse nicht immer 1:1 wieder. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die aufgetragenen Amplifikate die Endprodukte der PCR darstellen (30 Zyklen), wobei die

Plateauphase schon einige Zyklen früher erreicht war. So ist zum Beispiel der große Unterschied der Transkriptmengen der CD19<sup>+</sup>-Fraktion zwischen DR4-P<sub>m</sub>- und Bl6<sub>m</sub>-Mäusen im Gel nicht erkennbar. Die CD4<sup>+</sup>-Fraktionen der DR4-P- und Bl6-Mäuse ergaben ähnliche vergleichbare Werte. Dieses Ergebnis ist deutlich auf dem Gel zu erkennen. Zusätzlich sollte die *Trat1*-Expression in einigen der klassifizierten Tumoren der DR4-P-Generation untersucht werden: Aus der Gruppe der LTZL (No. 10, No. 16, No. 52, No. 97), der DLBZL (No. 40, No. 74, No. 96, No. 124) und der HL (No. 87, No. 110, No. 118) wurden dafür Tumormischproben aus der Milz herausgesucht. Diese Tumormischproben enthielten nur anteilig expandierte Tumorphyspopulationen, so dass bei der Auswertung beachtet werden sollte, dass auch immer „Kontaminationen“ mit normalen, gesunden Zellen vorlagen. Aus den vorhandenen RNAs wurden cDNAs synthetisiert. Als Kontrollen dienten sowohl Gesamt-Milzzellen als auch die fraktionierten CD4<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Populationen aus gesunden DR4-P- und Bl6-Mäusen. Die Ergebnisse dieser Genexpressionsanalyse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tab. 7: *Trat1*-Expression in den verschiedenen Tumoren der DR4-P-Mäuse**

LTZL No.	DLBZL No.	HL No.	x-fache Expression gegenüber Gesamt-Milz		x-fache Expression gegenüber CD4 <sup>+</sup>		x-fache Expression gegenüber CD19 <sup>+</sup>	
			DR4-P	Bl6	DR4-P	Bl6	DR4-P	Bl6
<b>10</b>			+6,5x	+643x	+2,7x	+1,6x	+31,8x	+4513x
<b>16</b>			+7,9x	+792x	+3,4x	+2,0x	+39,1x	+5556x
<b>52</b>			+2,5x	+250x	+1,1x	-1,6x	+12,4x	+1758x
<b>97</b>			+7,2x	+714x	+3,0x	+1,8x	+36,8x	+5007x
	<b>40</b>		-3,3x	+30,1x	-1,4x	-13,3x	+1,5x	+210,8x
	<b>74</b>		-1,9x	+52,3x	-4,6x	-7,6x	+2,6x	+367x
	<b>96</b>		-38,1x	+2,6x	-91,1x	-152,2x	-7,7x	+18,4
	<b>124</b>		-5,7x	+17,3x	-13,5x	-23,1x	-1,2x	+119,4x
		<b>87</b>	-4,8x	+21x	-11,4x	-19x	+1,0x	+147x
		<b>110</b>	+6,9x	+685x	+2,9x	+1,7x	+33,8x	+4803x
		<b>118</b>	+21,9x	+2179x	+9,1x	+5,5x	+107,6x	+15286x

Die unterschiedliche Expression wurde mit Hilfe Haushaltgens 18S rRNA normalisiert und mit den Kontrollen aus den DR4-P- und Bl6-Mäusen verglichen, wobei die Werte der Kontrollen auf 1 gesetzt wurden. Die Unterschiede wurden als x-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.

Die Genexpressionsanalyse von *Trat1* in den verschiedenen Tumormischproben im Vergleich zu der Bl6-Kontrolle aus der Gesamt-Milz ergab fast durchweg eine starke, bis zu 2180-fache Überexpression von *Trat1* (gelb hinterlegt). Einzige Ausnahme war hierbei die Tumorprobe No. 96 (DLBZL; +2,6-fach). Auffällig erschienen vor allem die LTZL- und zwei der HL-Proben (No. 110, No. 118). Da *Trat1* nur von T-Zellen exprimiert wird, erscheint dieses Ergebnis nachvollziehbar. Die starke Überexpression von *Trat1* in den HL-Proben kann durch die Anzahl der T-Zellen in diesen Mischproben erklärt werden. So konnten in vorangegangenen FACS-Analysen der klassifizierten Tumorproben der HL-Mäuse folgende Frequenzen an T-Zellen festgestellt werden: No. 87: 13%; No. 110: 30% und No. 118: 85%. Die Überexpression von *Trat1* kann also eindeutig auf die z. T. hohen Anteile der vorhandenen und vielleicht aktivierten T-Zellen zurückgeführt werden. Im Vergleich zu der DR4-P-Gesamt-Milz-Probe konnten in den Tumorproben auch Unterschiede in der *Trat1*-Expression festgestellt werden. Diese waren aber lange nicht so groß (-38 bis +22-fach) wie im Vergleich zu der Bl6-Kontrolle. So konnte bei den LTZLs verglichen zur DR4-P-Gesamt-Milz-Kontrolle eine insgesamt leicht erhöhte Transkriptmenge (+2,5 bis 7,9-fach) und bei den DLBZLs eine leicht reduzierte Transkriptmenge (-1,9 bis -38,1-fach) festgestellt werden. Die HL-Tumorproben zeigten je nach Frequenz der enthaltenen T-Zellen eine leicht erhöhte (No. 110, No. 118) oder reduzierte (No. 87) Menge an *Trat1*-Transkripten. Alle anderen Vergleiche der Tumoren, mit den jeweils als sinnvoll erachteten Kontrollen, wurden türkisfarben hinterlegt. Die Unterschiede der LTZLs zwischen den CD4<sup>+</sup>-Fraktionen beider Mausstämmen waren sehr gering (-1,6 bis +3,4-fach). Bei den DLBZL konnte nur im Vergleich mit der CD19<sup>+</sup>-Population aus Bl6-Mäusen eine starke Überexpression (+18,4 bis 367-fach) detektiert werden. Da bei den HL-Proben begleitende Tumoren lymphoiden Ursprungs diagnostiziert wurden, sollten diese sowohl mit den CD4<sup>+</sup>- als auch mit den CD19<sup>+</sup>- Fraktionen verglichen werden. Auch hier zeigte der Vergleich mit den CD4<sup>+</sup>-Fraktionen relativ geringe Unterschiede (-19 bis +9,1-fach) in der Genexpression von *Trat1*, die sowohl als erhöhte und reduzierte Transkriptmengen feststellbar waren. Wurden die CD19<sup>+</sup>-Fraktionen der HL-Proben mit



denen der BL6-Mäuse verglichen, ergab sich die stärkste Überexpression (No. 118; 15286-fach), wobei zu beachten ist, dass diese Tumorprobe zu 85% aus T-Zellen bestand und ein Vergleich mit CD19<sup>+</sup>-B-Zellen für diesen Fall nicht sehr aussagekräftig erschien.

In den beiden letzten Versuchen sollte die Oberflächenexpression des Trat1 zunächst mittels FACS-Analyse und anschließend im Western Blot getestet werden. Der einzig kommerziell verfügbare Antikörper auf dem Markt für Trat1 (bzw. TRIM) war nur von der Firma Santa Cruz erhältlich. Leider konnten auch nach wiederholten Versuchen keine Ergebnisse produziert werden. Sowohl in der FACS-Analyse als auch im Western-Blot war es nicht möglich spezifische Reaktionen dieses Antikörpers nachzuweisen. So konnte nicht bestimmt werden, ob die wenigen Trat1-Transkripte der CD19<sup>+</sup>-Fraktionen tatsächlich als Proteine an der Oberfläche exprimiert wurden oder ob dies „kontaminierenden“ T-Zellen in den angereicherten Fraktionen zuzuordnen war.

Dennoch wird Trat1 als möglicher Kandidat in der Tumorentwicklung der DR4-P-Mäuse angesehen. Weitere Versuche müssen folgen, um den genauen Mechanismus aufzuklären, der, vielleicht unter der Beteiligung von Trat1, zu einer Begünstigung der Entstehung hämatopoietischer Tumoren führen könnte.

### **3.5. Liegt in DR4-P-transgenen Mäusen aufgrund der Immundefizienz und der Transgen-Integration eine Störung in der Hämatopoese vor?**

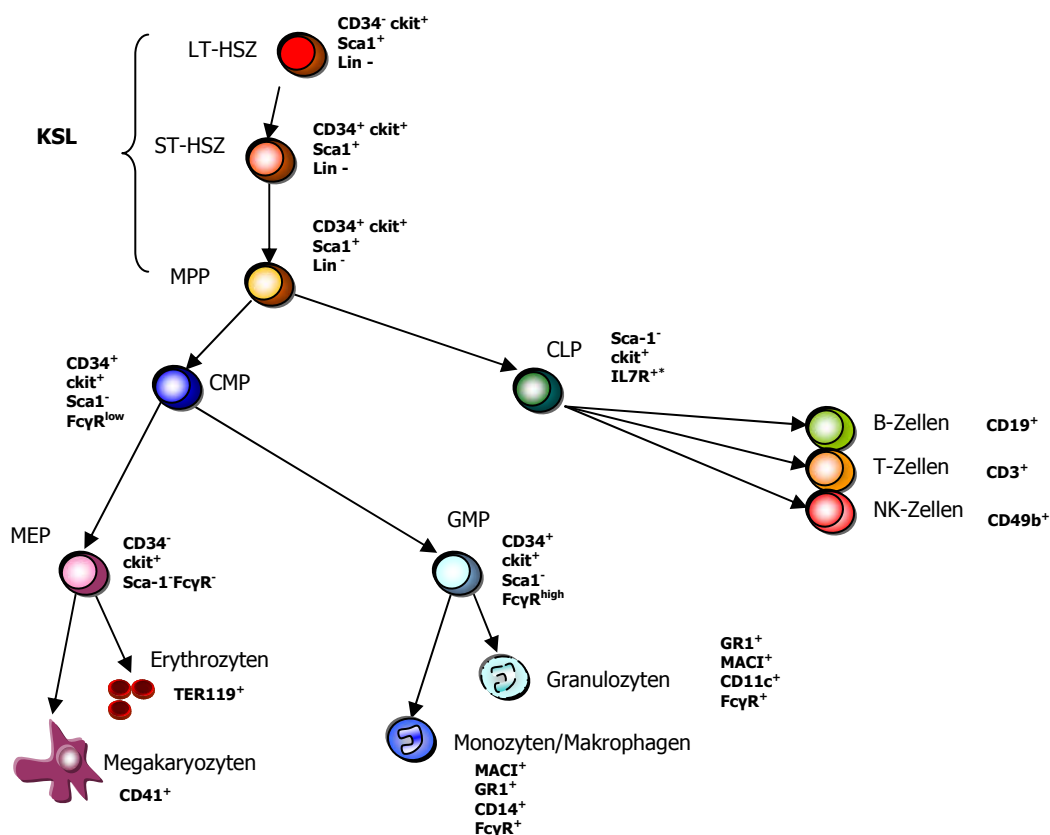
Als Hämatopoese wird die Bildung und Entwicklung von Blutzellen bezeichnet, die aus Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark bestehen. Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich ein Leben lang selbst zu erneuern und damit den Pool an Stammzellen konstant aufrechtzuerhalten sowie die Fähigkeit, sich in jede hämatopoietische Zelllinie zu entwickeln. Die Stammzellen durchlaufen in ihrer Entwicklung in die unterschiedlichen Zelltypen einen Differenzierungsweg über so genannte Vorläuferzellen. Diese können noch in multiple Linien differenzieren, haben aber bereits die Fähigkeit verloren, sich selbst zu erneuern. Stammzellen tragen also dazu bei, dass ein Organismus in der Lage ist, seine hämatopoietischen Gewebe ständig zu erneuern. Blut ist durch diesen immerwährenden Prozess ein hochregeneratives Organ. Im humanen Blutsystem werden lebenslang im Durchschnitt etwa  $3\text{-}5 \times 10^6$  Zellen pro Sekunde gebildet (Reya et al., 2001). Differenzierte Zellen sterben ab und werden durch neue ersetzt. Die Entwicklung der Stammzellen in verschiedene Vorläuferzellen bis zu differenzierten Zellen wird unter anderem über verschiedene Wachstumsfaktoren gesteuert.

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob in den DR4-P-Mäusen aufgrund der MHC-Klasse-II-Defizienz und der Transgen-Integration eine generelle Störung der Hämatopoese vorliegt, die über Autoimmunität bzw. einer eingeschränkten Immunantwort gegenüber Pathogenen zur Tumorentstehung führen könnte. Daher wurde zunächst eine systematische Untersuchung der Verteilung der hämatopoietischen Linien und deren Vorläuferzellen aus dem Knochenmark durchgeführt. Folgende Fragen standen hierbei im Vordergrund: Gibt es Unterschiede im Differenzierungspotential bzw. der Klonogenität der Stamm- und Vorläuferzellen? Sind Verschiebungen in der Anzahl der gebildeten hämatopoietischen Linien feststellbar?

### 3.5.1 Untersuchung der Hämatopoiese des Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie

Zunächst wurde mittels Zell-Phäotypisierung mit Durchflusszytometrie-Experimenten (FACS= „Fluorescence Activated Cell Sorter“) die Verteilung der hämatopoietischen Zelllinien und deren Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark untersucht. Den Mäusen (Bl6- und DR4-P-Versuch No. 1; Bl6- und DR4-F1-Versuch No. 2) wurden die Zellen des Knochenmarks aus einem der Oberschenkelknochen entnommen und anschließend mit Antikörpern gegen Zelltypen-spezifische Antigene gefärbt. In den letzten Jahren konnten durch systematische Suche spezifische Oberflächenmarker für unterschiedliche Stamm- und Vorläuferpopulationen beschrieben werden. Mit deren Hilfe ist nun die Isolierung dieser Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie möglich geworden (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000; Reya et al., 2001). Wie in Abb. 28 zu sehen ist, wurde die Benennung der Stammzellen unter Angabe der spezifischen Marker in dieser Arbeit folgendermaßen zugewiesen:

Die LT-HSZ ( $cKit^+$ ,  $Sca1^+$ ,  $Lin^-$ ) sind die hämatopoietischen Stammzellen. Sie besitzen die Fähigkeit zur lebenslangen Selbsterneuerung (*Long Term* = lebenslang) und können sich in jede hämatopoietische Zellart entwickeln. Aus den LT-HSZ entwickeln sich ST-HSZ (*Short Term* = eingeschränkte Lebensdauer) und MPP (multipotente Vorläuferzellen) mit stark eingeschränkter Selbsterneuerung. Sie besitzen aber ein multiples Entwicklungspotential und sind doppelt positiv für ckit und Sca-1. Zudem exprimieren sie keine Marker ausdifferenzierter Zellen (Lineage negativ). Auf Grund der gemeinsamen Oberflächenmarker werden LT-HSZ, ST-HSZ und MPP auch als KSL-Zellen bezeichnet. „Lin“ bezieht sich in diesem Versuchsaufbau auf eine Zusammenstellung von folgenden Antikörpern: MAC1 + GR1 (Monozyten/Makrophagen/Granulozyten), TER119 (Erythrozyten), CD19 (B-Zellen), CD3 (T-Zellen).



**Abb. 28: Vereinfachtes Schema der Hämatopoiese in Mäusen** (nach Reya et al., 2001).

Langzeitwiederherstellungsfähige Stammzellen, **LT-HSZ** – Long Term Reconstituting HSC  
 Phänotyp: **CD34<sup>-</sup>, ckit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>**

Kurzzeitwiederherstellungsfähige Stammzellen, **ST-HSZ** – Short Term Reconstituting HSC  
 Phänotyp: **CD34<sup>+</sup>, ckit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>**

Multipotente Vorläufer Zellen, **MPP** – Multi-Potent Progenitors  
 Phänotyp: **CD34<sup>+</sup>, ckit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>**

Gemeinsame lymphoide Vorläuferzellen, **CLP** – Common Lymphoid Progenitors  
 Phänotyp: **CD34<sup>+</sup>, ckit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>-</sup>, IL7R<sup>+</sup>\*** CLP wurden nicht analysiert

Gemeinsame myeloide Vorläuferzellen, **CMP** – Common Myeloid Progenitors  
 Phänotyp: **CD34<sup>+</sup>, ckit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>-</sup>, FcγR<sup>low</sup>**

Myeloide und erythroide Vorläuferzellen, **MEP** – Myeloid, Erythroid Progenitors  
 Phänotyp: **CD34<sup>-</sup>, ckit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>-</sup>, FcγR<sup>-</sup>**

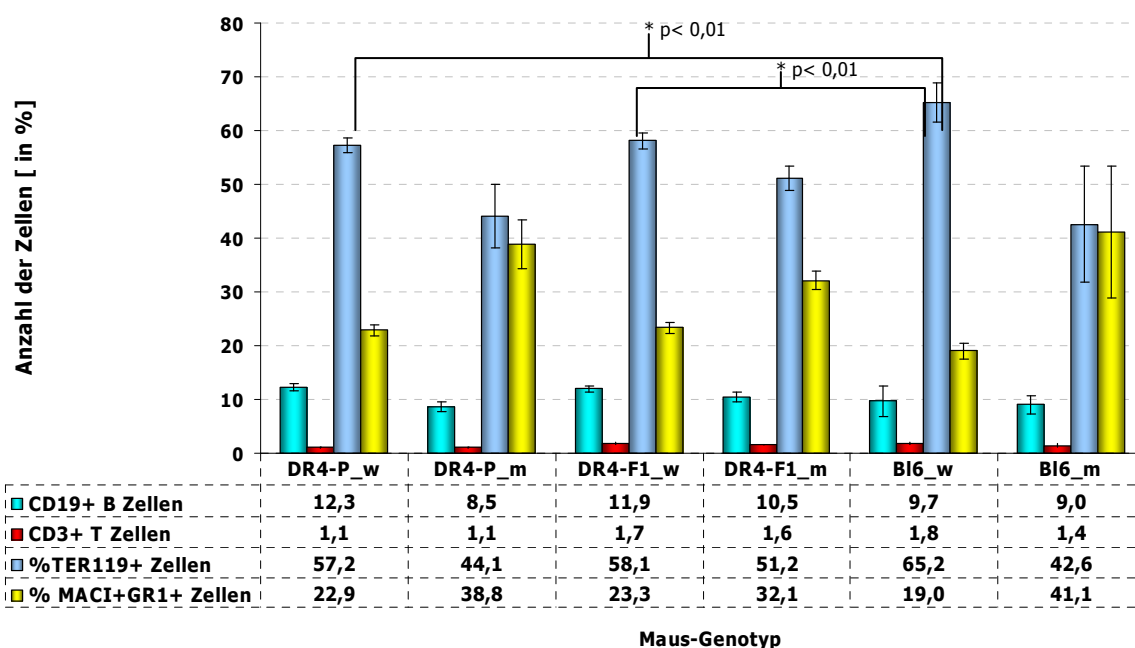
Granuloide und monozytäre Vorläuferzellen, **GMP** – Granuloid, Monocytoid Progenitors  
 Phänotyp: **CD34<sup>+</sup>, ckit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>-</sup>, FcγR<sup>high</sup>**

**KSL-Zellen:**  
 ckit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>

Die ST-HSZ und MPP sind Vorläufer der CMP (gemeinsame myeloide Vorläuferzellen) und CLP (gemeinsame lymphoide Vorläuferzellen). Aus den CMP entwickeln sich alle Zellen der myeloiden Linie, wie zum Beispiel Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten, Monozyten

und Makrophagen. Wohingegen sich alle Lymphozyten, wie B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen aus den CLP, den Vorläufern der lymphoiden Linie entwickeln.

Im ersten Versuch wurden DR4-P-Mäuse und Bl6-Kontrollmäuse untersucht. Im zweiten Experiment sollte die DR4-F1-Generation analysiert werden, um zu überprüfen, ob die Heterozygotität dieser Mäuse in Bezug auf das Transgen eine Auswirkung auf die Hämatopoese hat. Für die Kontrolle der Reproduzierbarkeit beider Experimente wurden bei Versuch No. 2 zusätzlich Bl6-Mäuse aus der gleichen Züchtung verwendet. Dies führte zu einer unterschiedlichen Anzahl an Tieren, die in den verschiedenen Gruppen analysiert wurden.

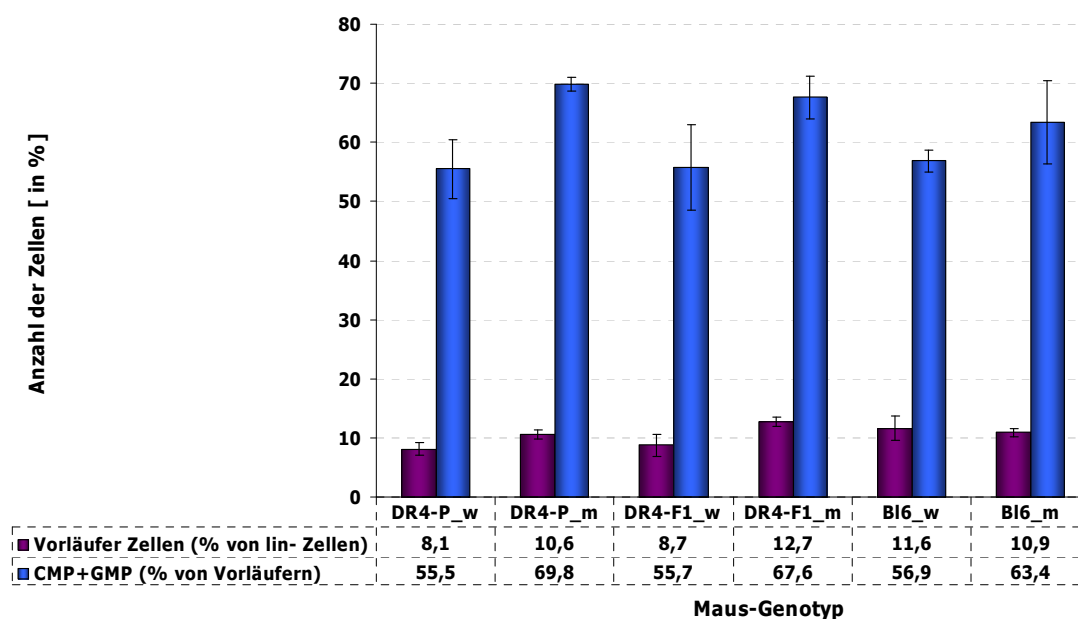


**Abb. 29: Verteilung der Knochenmarkszellen von DR4-P-, DR4-F1- und Bl6-Mäusen**

Es wurden je drei Weibchen und Männchen im Alter von drei Monaten pro DR4-P-Gruppe und sechs Tiere der Bl6-Kontrollgruppen mittels FACS-Analyse untersucht. Angezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. **Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:** \* TER119<sup>+</sup>-Erythrozyten: Bl6w gegenüber DR4-Pw; Bl6w gegenüber DR4-F1w.

Bei den Unterschieden zwischen den weiblichen und männlichen Gruppen [(DR4-Pw, DR4-F1w, Bl6w) und (DR4-Pm, DR4-F1m, Bl6m)] traten signifikante Unterschiede nur in der TER119-positiven Zellpopulation (hellblaue Säulen; \*) auf. So besaßen die weiblichen Tiere der Bl6-Kontrollgruppe signifikant [65,2%] mehr Erythrozyten als die DR4-Pw-Gruppe

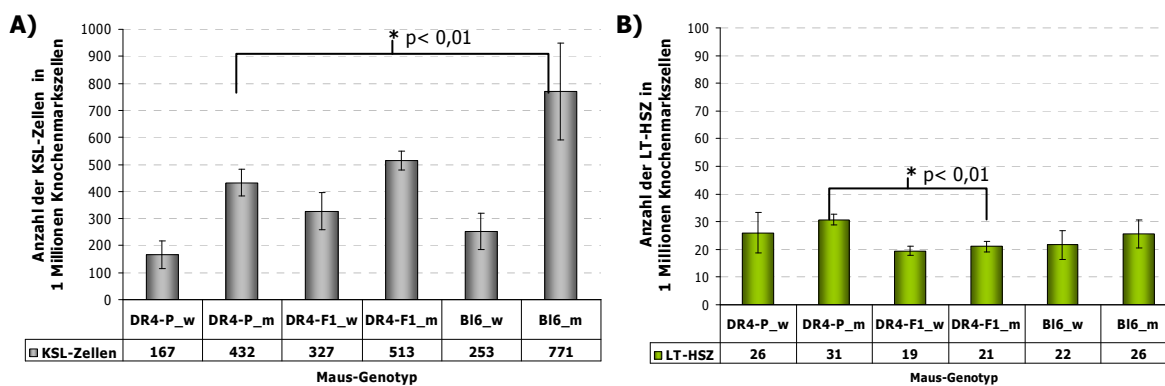
[57,2%] und die DR4-F1w-Gruppe [58,1%]. Die anderen Verschiebungen waren meist nur innerhalb einer Gruppe feststellbar, also geschlechtsspezifisch zwischen Männchen und Weibchen eines Mausstammes. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede waren für einen Vergleich zwischen den Mausstämmen wenig aussagekräftig. Deshalb wurden nur die signifikanten Unterschiede als wichtig erachtet und aufgeführt, die im Vergleich zwischen den DR4-P-, DR4-F1- und Bl6-Stämmen in konsistenterweise auftraten.



**Abb. 30: Frequenz der Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark von DR4-P-, DR4-F1- und Bl6-Mäusen.** Es wurden je drei Weibchen und Männchen im Alter von drei Monaten pro DR4-P-Gruppe und sechs Tiere der Bl6-Kontrollgruppen mittels FACS-Analyse untersucht. Angezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Die Analyse der Lin-negativen Vorläuferzellen (lilafarbene Säulen) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Mausstämmen. Auch in der Fraktion der CMP und GMP (blaue Säulen) sind keine signifikanten Verschiebungen im Vergleich zwischen DR4-P-, DR4-F1- und Bl6-Mäusen aufgetreten.

Für die genauere Untersuchung der Stamm- und Vorläuferzellen der verschiedenen Maus-Gruppen wurden zusätzlich die absoluten Anzahlen dieser Zellen pro  $1 \times 10^6$  Zellen graphisch dargestellt:



**Abb. 31: Frequenz der Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark– Vergleich zwischen DR4-P-, DR4-F1- und Bl6-Mäusen.** Es wurden je drei Weibchen und Männchen im Alter von drei Monaten pro DR4-P-Gruppe und sechs Tiere der Bl6-Kontrollgruppen mittels FACS-Analyse untersucht A) Anzahl der KSL-Zellen und B) der LT-HSZ-Zellen pro  $1 \times 10^6$  Knochenmarkszellen. Angezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. **Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, A) \* Bl6m gegenüber DR4-Pm, B) \* DR4-Pm gegenüber DR4-F1m.**

Zu den KSL-Zellen ( $\text{Lin}^-$  HSZ, graue Säulen) wurden in diesem Experiment die LT-HSZ, die ST-HSZ sowie die MPP gezählt. Nur die Bl6-Kontrollmännchen wiesen mit 771 Stammzellen signifikant mehr  $\text{Lin}^-$  HSZ [44,0%] auf als die DR4-P-Männchen mit 432 Stammzellen. Generell besaßen die Männchen der Bl6 und DR4-P-Gruppen signifikant mehr  $\text{Lin}^-$  Stamm- und Vorläuferzellen als die zugehörigen Weibchen. Auf die geschlechtsspezifischen Verschiebungen soll aber auch hier nicht näher eingegangen werden, da sie für die Fragestellung der Unterschiede zwischen den Mausstämmen aufgrund der ähnlichen Tumorinzidenz zwischen Männchen und Weibchen nicht von Bedeutung waren.

In der Population der LT-HSZ (grüne Säulen, Abb. 31B), also einem kleinen Anteil der gesamten  $\text{Lin}^-$  Stammzellen, konnten bei den DR4-P-Männchen 31 LT-HSZ detektiert werden. Damit wiesen sie signifikante 31,8% mehr auf, als die Männchen aus der DR4-F1-Generation, bei denen nur 21 LT-HSZ gezählt wurden. Darüber hinaus ergab die Analyse keine weiteren signifikanten Verschiebungen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es hauptsächlich geschlechtsspezifische Verschiebungen in der Anzahl der Stammzellen gab; männliche Tiere besaßen mehr  $\text{Lin}^-$  Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark als weibliche. Darüber hinaus waren deutliche Veränderungen in der absoluten Anzahl zwischen den Gruppen detektierbar. Betrachtete

man Männchen und Weibchen zusammen, so besaßen die DR4-P-Mäuse mit 57 die meisten LT-HSZ, gefolgt von Bl6-Mäusen und DR4-F1-Mäusen (Bl6: 48; DR4-F1: 40). Dies bedeutet: DR4-P- und DR4-F1-Mäuse besaßen zwar weniger Lin<sup>+</sup> HSZ als Bl6-Mäuse, dafür aber prozentual mehr der wichtigen LT-HSZ, die hauptsächlich für die regenerative Wirkung des hämatopoietischen Systems verantwortlich sind.

### **3.5.2. Untersuchung der Differenzierungskapazität von Stamm- und Vorläuferzellen**

Nach der phänotypischen Untersuchung des Knochenmarks mittels FACS-Analyse wurden zusätzlich „Colony-Forming Unit (CFU)-Assays“ (Kolonie-Assays) durchgeführt, um die Anzahl und Verteilung von Vorläuferzellen mit klonogenem Differenzierungspotential funktionell zu bestimmen. Mit diesen Experimenten sollte geklärt werden, ob es bei DR4-P- und DR4-F1-Mäusen Verschiebungen in der Anzahl und im Differenzierungsverhalten der Vorläuferzellen gegenüber den Bl6-Kontrollgruppen gibt. Hierfür wurde eine definierte Anzahl von Knochenmarkszellen für 8-11 Tage in Methyzzellulose-haltigem Medium kultiviert, das mit bestimmten Wachstumsfaktoren angereichert war. Die Methyzzellulose ist semi-solid und diente dazu, die Zellen auf der Platte räumlich zu fixieren, damit klonogene Kolonien unterschieden werden konnten. Die Wachstumsfaktoren gewährleisteten die Differenzierung von verschiedenen Vorläufern in ausdifferenzierte hämatopoietische Zelltypen. Das Medium für den semi-soliden Kolonieformierungsansatz für die myeloischen Vorläuferzellen enthielt folgende Zytokine: rm-SCF, rm-IL-3, rh-IL-6 und rh-Erythropoietin. Für den Prä-B-Zell-Ansatz wurde dem Medium ausschließlich rh-IL-7 zugefügt. Bei dem Kolonie-Assay der myeloiden Linie können sich morphologisch unterschiedliche Kolonien bilden und der Zeitraum der Inkubation beträgt ca. 8-11 Tage. Im Gegensatz hierzu entstehen bei dem Prä-B-Zell-Kolonie-Assay nur die Prä-B-Zell-Kolonien und das Auszählen der Kolonien war schon nach sieben Tagen möglich. Die entstandenen Kolonien wurden unter dem Mikroskop ausgewertet. Die beiden Kolonie-Assays wurden zeitgleich und parallel zum FACS-Versuch



angesetzt. Das bedeutet, auch hier wurden Knochenmarkszellen aus je drei männlichen und weiblichen Mäusen pro DR4-P- und DR4-F1-Gruppe, sowie sechs Tiere pro B16-Kontrollgruppe untersucht.

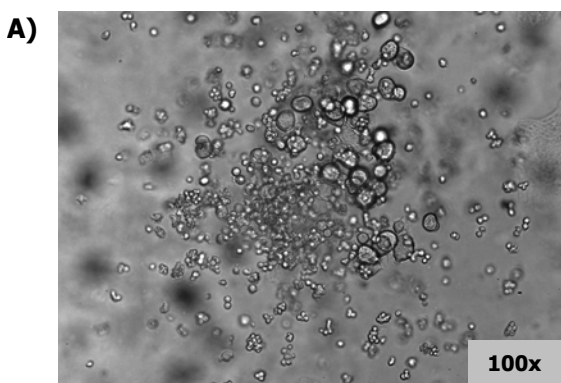
### 3.5.2.1. Kolonie-Assay der myeloischen Linie

Bei diesem Assay konnten sich die folgenden Kolonien ausbilden:

**GEMm** – Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten/Makrophagen

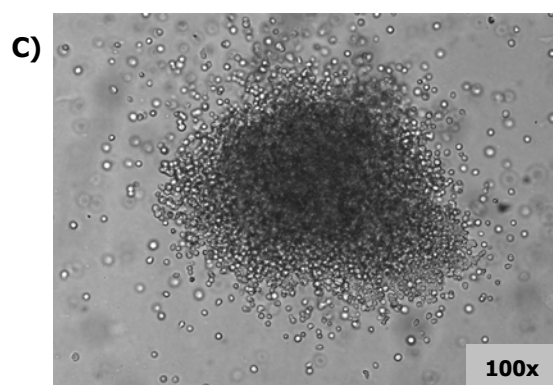
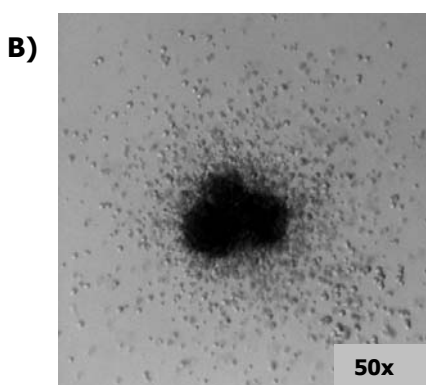
Diese Kolonien entstanden aus Vorläuferzellen mit multipler Differenzierungskapazität. Das bedeutet, dass sich die GEMm aus allen myeloischen Zelltypen zusammensetzten.

**ME** – Kolonien bestanden aus Megakaryozyten und Erythrozyten.



**Abb. 32: A) ME-Kolonien:** Megakaryozyten und Erythrozyten. Megakaryozyten sind riesige ( $\varnothing$  100  $\mu$ m) Vorläuferzellen der Thrombozyten (Blutplättchen), Erythrozyten sind winzige Zellen, die Trauben-ähnliche Gebilde formen.

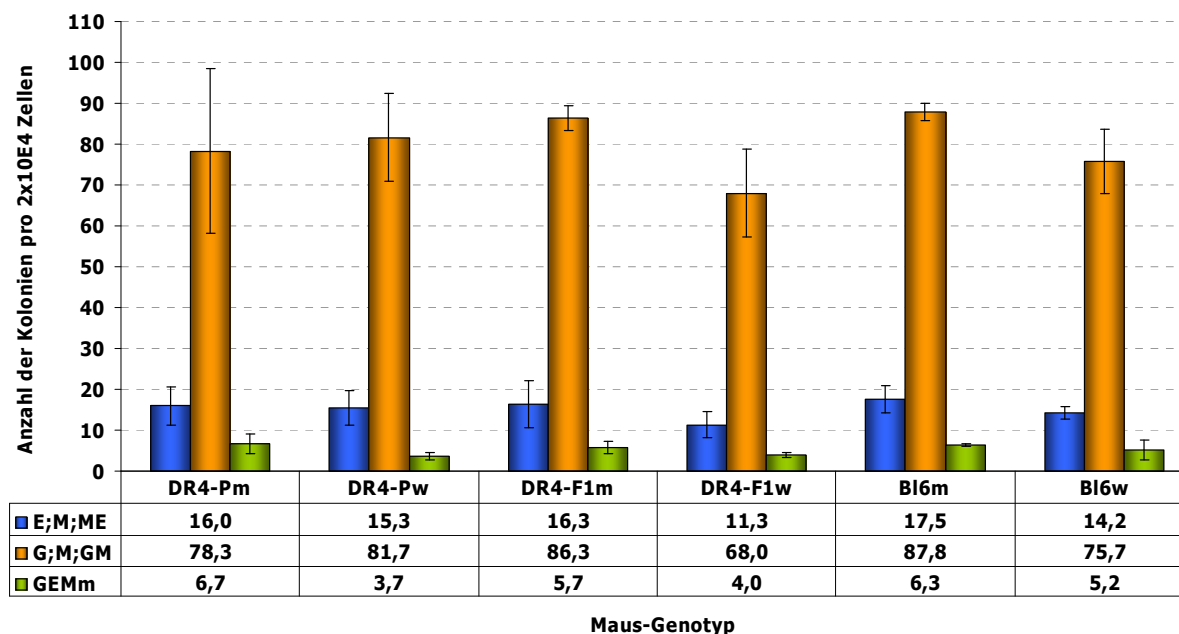
**GM** – Kolonien bestanden aus Granulozyten und Monozyten/Makrophagen.



**Abb. 32: B) und C) GM-Kolonien:** Granulozyten und Monozyten/Makrophagen. Granulozyten sind kleinere, einheitlich runde Zellen ( $\varnothing$  5-7  $\mu$ m), die Cluster bilden. Monozyten/Makrophagen sind größer ( $\varnothing$  20  $\mu$ m) und bilden keine Cluster sondern bleiben einzeln.

Darüber hinaus gab es Kolonien die nur aus einem Zelltyp bestanden, also **M** - Megakaryozyten, **E** - Erythrozyten, **M/m** – Monozyten/Makrophagen und **G** - Granulozyten.

Die Ergebnisse der Auszählung der myeloischen Kolonien wurden in der folgenden Graphik dargestellt:

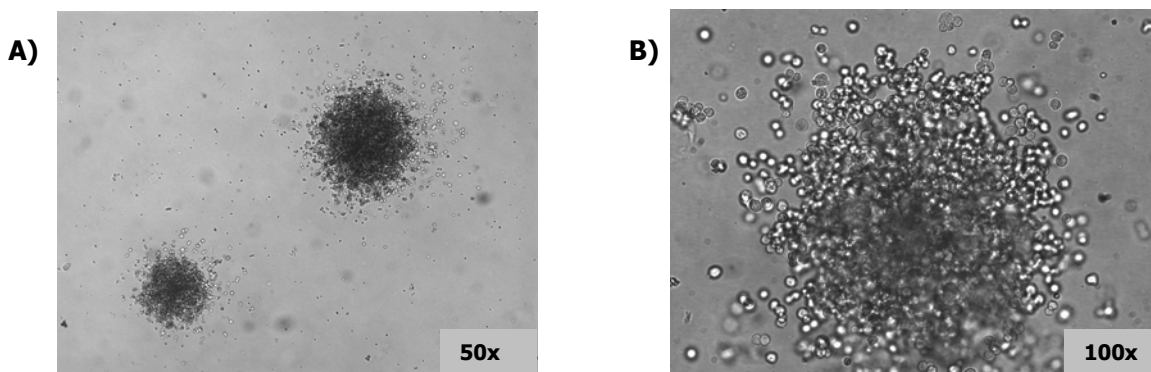


**Abb. 33: Frequenz der Kolonien der myeloischen Linie - im Vergleich: DR4-P-, DR4-F1- und B16-Mäuse.** Blaue Säulen: E;M;ME (Erythrozyten-, Megakaryozyten-, Megakaryozyten- und Erythrozyten-Kolonien; orangefarbene Säulen: G;M;GM (Granulozyten-, Makrophagen-, Granulozyten- und Makrophagen-Kolonien; grüne Säulen: GEMm (Granulozyten-, Erythrozyten-, Megakaryozyten-, Monozyten- und Makrophagen-Kolonien. Angegeben wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 2 ausgezählten Platten pro Maus. Bei den B16-Kontrollen wurde der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus je 4-Platten pro Maus angegeben.

In der Auswertung wurden jeweils die folgenden Kolonietypen zusammengefasst. E&M&ME (blaue Säulen), G&M&GM (orangefarbene Säulen) und GEMm (grüne Säulen). Die Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten Mäuse Vorläuferzellen besaßen, welche die Fähigkeit haben, in alle myeloischen Zelltypen zu differenzieren (GEMm, grüne Säulen). Ansonsten gab es zwischen den DR4-P-, DR4-F1- und den B16-Kontrollmäusen keine bedeutende Veränderung bezüglich der Differenzierungskapazität der Stamm- und Vorläuferzellen.

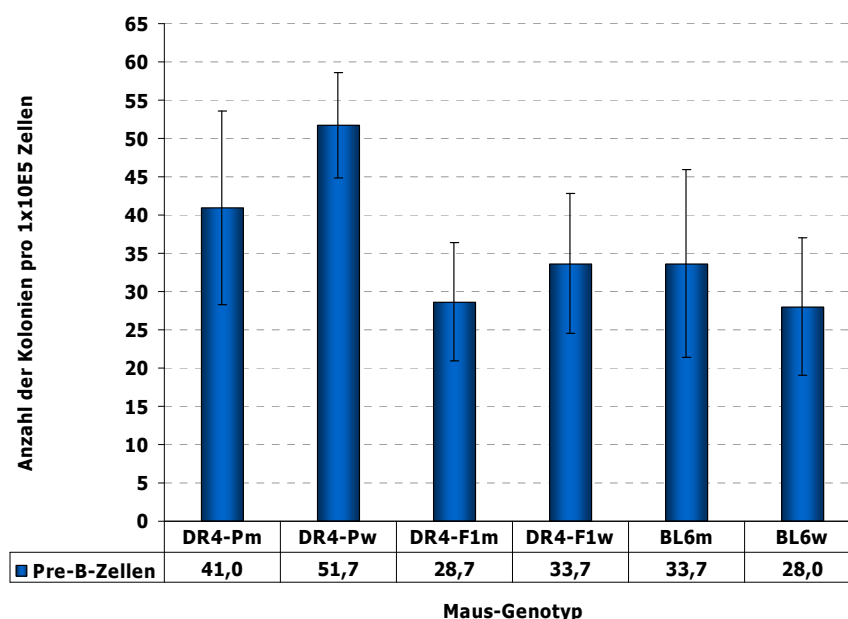
### 3.5.2.2. Kolonie-Assay der Prä-B-Zellen

Bei diesem Assay entwickelten sich aus den hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen Kolonien der Prä-B-Zellen, also der frühen Vorläufer der B-Lymphozyten.



**Abb. 34: A) und B) Prä-B-Zell-Kolonien:** Prä-B-Zellen sind kleinere Zellen ( $\varnothing 7 \mu\text{m}$ ), die Cluster bilden.

Die Auszählung der Prä-B-Zell-Kolonien wurde in der folgenden Graphik dargestellt:



**Abb. 35: Frequenz der Prä-B-Zellen - im Vergleich: DR4-P, DR4-F1 und BL6-Mäuse** Angegeben wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 2 ausgezählten Platten pro Maus. Bei den BL6-Kontrollen wurde der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus je 4-Platten pro Maus angegeben.

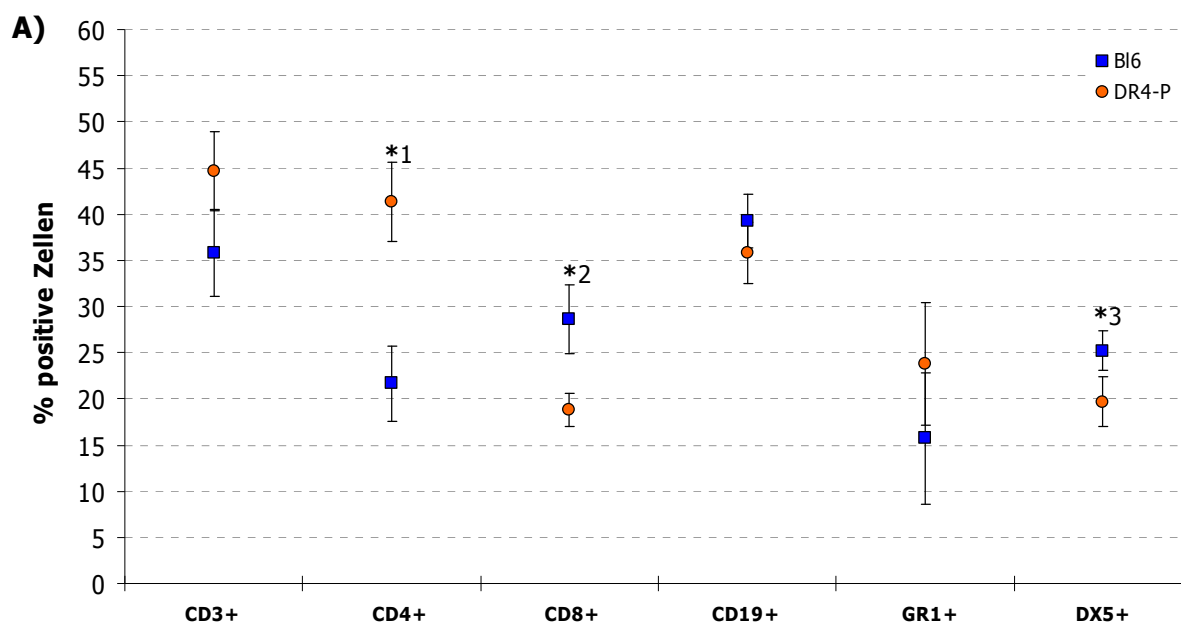
Wie in Abb. 35 gut zu erkennen ist, wiesen die Gruppen der DR4-F1- und BL6-Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Lediglich in der DR4-P-Gruppe schien tendenziell eine höhere Kapazität für die Ausreifung von Prä-B-Zellen zu bestehen, da in

dieser Gruppe insgesamt die meisten Kolonien ausgezählt wurden. Darüber hinaus waren in diesem Assay keine signifikanten Verschiebungen erkennbar.

Generell ergab auch der Vergleich von Koloniengröße und der Morphologie der Kolonien keine Auffälligkeiten, sowohl bei dem Kolonie-Assay der myeloischen Linie als auch bei dem Prä-B-Zell-Kolonie-Assay. Nach der Betrachtung aller Ergebnisse kann also davon ausgegangen werden, dass keine grundlegende Störung der Hämatopoiese in diesem frühen Stadium vorlag.

### **3.5.3 Untersuchung von peripheren Zellen im Schwanzblut**

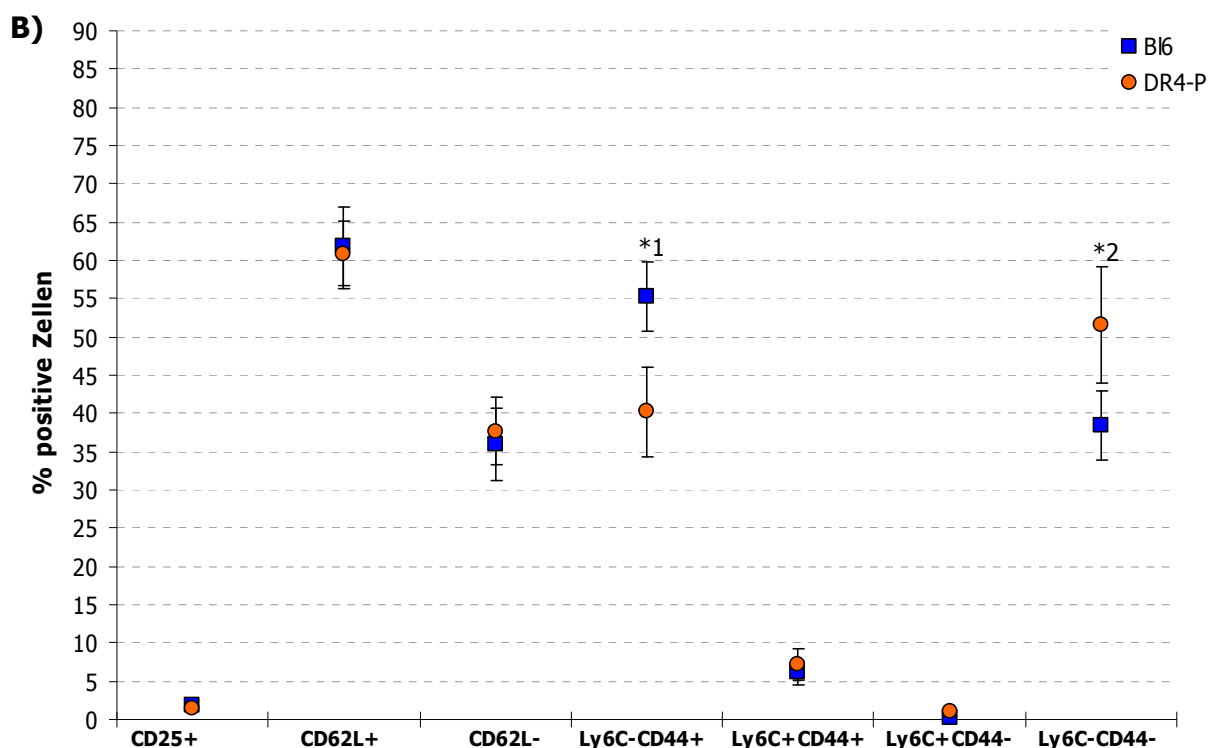
Die Vorläufer, die sich aus den hämatopoetischen Stammzellen entwickelt haben, führt der weitere Weg zu den Orten, an denen sie ausdifferenzieren können. Diese Orte sind unterschiedlich für die verschiedenen Vorläufer. So reifen beispielsweise die B-Zellen im Knochenmark aus, wohingegen die T-Zellen im Thymus ausreifen. Die Vorläufer werden mit Hilfe von Wachstumsstoffen, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, wie Integrine und Selektine, also einem multifaktoriellen System, zu Ihrem Bestimmungsort geleitet. Hier befinden sich meist differenzierte und hochspezialisierte Zellen, wobei sich die weiteren Analysen hauptsächlich auf die Lymphozytenpopulationen konzentrieren sollten. Die Untersuchungen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hatten, wie oben beschrieben, keine signifikanten Unterschiede der myeloischen Vorläufer und der Prä-B-Zellen in der Hämatopoiese aufgedeckt. Daher sollte nun geprüft werden, ob es dafür in den weiter ausdifferenzierten Lymphozyten in der Peripherie Unterschiede gibt. Hierfür wurden je 10 Mäusen des parentalen DR4-P- und Bl6-Mausstammes im Alter zwischen zweieinhalb und sieben Monaten Schwanzblut entnommen. Das Durchschnittsalter der DR4-P-Mäuse betrug 3,4 Monate, das der Bl6-Mäuse 3,9 Monate. Mittels Durchflusszytometrie wurden die verschiedenen Zellpopulationen auf die Expression von definierten Oberflächenantigenen hin analysiert. Die Gesamtzellzahl im Blut betrug bei den DR4-Mäusen im Durchschnitt etwa  $15,4 \times 10^6$  Zellen/300 $\mu$ L und bei den Bl6-Mäusen etwa  $14,1 \times 10^6$  Zellen/300 $\mu$ L.



**Abb. 36: A) Untersuchung der peripheren Blutleukozyten mittels FACS-Analyse - im Vergleich DR4-P- gegenüber BL6-Mäusen.** Angegeben wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von je 10 Mäusen. Signifikante Unterschiede: \*1  $\{p < 0,01\}$  - CD4<sup>+</sup>; \*2  $\{p < 0,01\}$  - CD8<sup>+</sup>; \*3  $\{p < 0,01\}$  - DX5<sup>+</sup>.

Die Analyse ergab signifikante Unterschiede bezüglich der Lymphozytenpopulation der CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und der NK<sup>+</sup>-Zellen. DR4-P-Mäuse hatten fast doppelt so viele CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (41,4% $\pm$ 4,3) in der Peripherie wie die BL6-Kontrollmäuse (21,6% $\pm$ 4,1). Dagegen besaßen sie 34,2% weniger CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (18,8% $\pm$ 1,7) gegenüber den Kontrollen (28,6% $\pm$ 3,7). Die DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen waren bei BL6-Mäusen um 21,9% erhöht. Die Werte lagen bei den DR4-P-Mäusen bei 19,7% $\pm$ 2,6 und bei den Kontrollmäusen bei 25,2% $\pm$ 2,2. Die anderen analysierten Zellentypen (CD3<sup>+</sup>-Gesamt-T-Zellen; CD19<sup>+</sup>-B-Zellen, GR1<sup>+</sup>-Granulozyten) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Betrachtet man die CD4<sup>+</sup>-Population etwas genauer, so war es mit den verwendeten Antikörpern nicht möglich, den Unterschied zwischen den beiden Mäusstämmen in einer der CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen festzumachen. In den getesteten Subpopulationen der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Abb. 36B) konnte dieser Unterschied keiner einzelnen Fraktion allein zugeordnet werden, da sich die erhöhte Frequenz der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wahrscheinlich über die gesamte Population verteilt. Die Antikörper wurden ausgewählt, um aktivierte (CD25<sup>+</sup>), naive (Ly6C<sup>-</sup>, CD44<sup>-</sup>; o. CD62L<sup>+</sup>), aktivierte und

Gedächtnis- ( $CD62L^{Low}$ ), sowie aktivierte oder Gedächtnis- T-Zellen ( $Ly6C^+$ ,  $CD44^+$ ) zu unterscheiden.



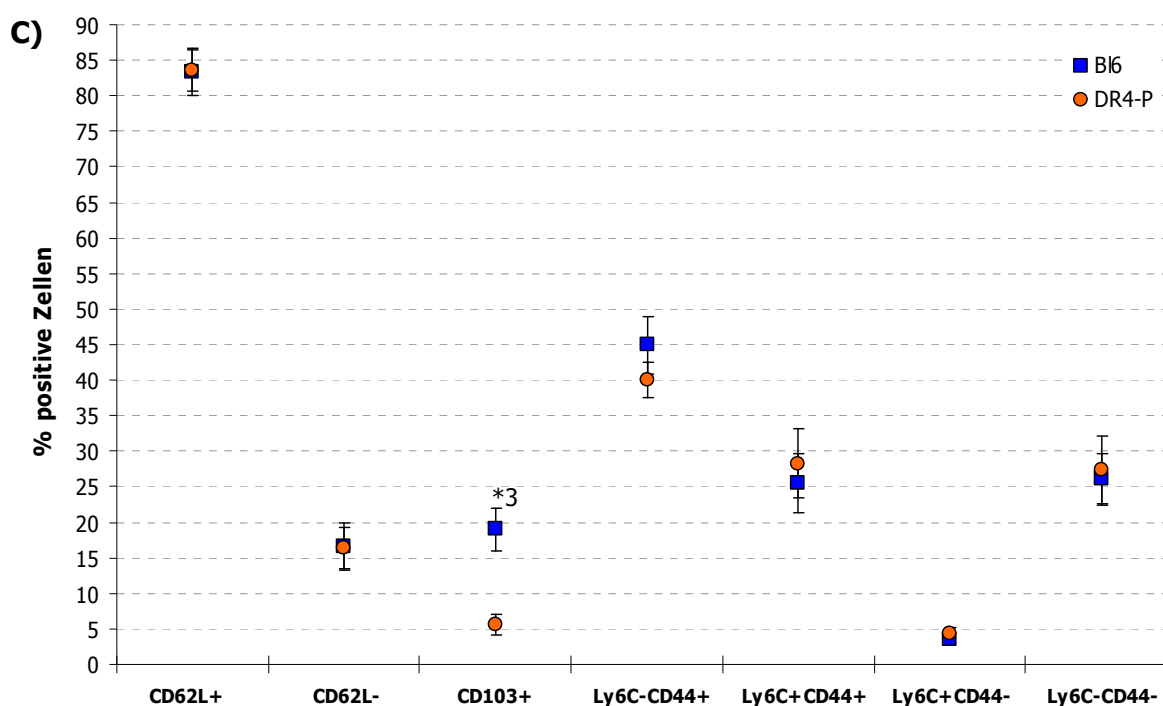
**Abb. 36: B) Vergleich zwischen BL6- und DR4-P- $CD4^+$ -T-Zellen im peripheren Schwanzblut**  
 Alle dargestellten Antigene beziehen sich auf  $CD4^+$ -T-Zellen. Angegeben wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von je 10 Mäusen. Signifikante Unterschiede: \*1  $\{p < 0,01\}$  -  $Ly6C^- CD44^+$ ; \*2  $\{p < 0,01\}$  -  $Ly6C^- CD44^-$ .

Die DR4-P-Mäuse wiesen in der Fraktion der naiven T-Zellen ( $Ly6C^-$ ,  $CD44^-$ ; \*2) signifikante 23,1% mehr Zellen auf als die Kontrollmäuse. Die Frage, in welcher anderen  $CD4^+$ -Fraktion eine weitere signifikante Erhöhung der DR4-P-Mäuse vorlag, musste offen bleiben. Eventuell liegt der Unterschied in einer anderen, nicht durch die verwendeten Marker detektierbaren Population. Eine weitere interessante Frage wäre, ob die erhöhte Anzahl der  $CD4^+$ -Zellen den  $Th_1$  (T-Helfer) Zellen oder den  $Th_2$  Zellen zuzuordnen ist.

Im Gegensatz hierzu konnte eine Population der aktivierten oder Gedächtnis-Zellen ( $Ly6C^+$ ,  $CD44^+$ ; \*1) bei den DR4-P-Mäusen in erniedrigter Anzahl (25,6%) gegenüber den BL6-Mäusen detektiert werden. Das bedeutet insgesamt blieb die Population der  $Ly6C^-$ -T-Zellen gleich. Scheinbar besitzen die DR4-P-Mäuse mehr naive T-Zellen und gleichzeitig weniger Gedächtniszellen als die BL6-Kontrollmäuse. Alle anderen Unterschiede in der  $CD4^+$ -

Fraktion zwischen BL6- und DR4-P-Mäusen waren nur gering und deshalb nicht von Bedeutung.

Betrachtete man die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Abb. 36C, so ist zu erkennen, dass die CD103<sup>+</sup>-Zellfraktion bei den BL6-Mäusen (19,6%±3,0) signifikant fast dreimal größer war, als die der DR4-P-Mäuse (5,6%±1,5). CD103 ist ein Adhäsionsmolekül, das zu der Familie der Integrine gehört. Integrine sind wichtige Faktoren bei der Migration von Zellen, das CD103 im speziellen bei der Wanderung in epitheliales Gewebe.



**Abb. 36: C) Vergleich zwischen BL6- und DR4-P-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im peripheren Schwanzblut**  
 Alle dargestellten Antigene beziehen sich auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Angegeben wurden die Mittelwerte ± Standardabweichung von je 10 Mäusen. Signifikante Unterschiede: \*3 { $p < 0,01$ } – CD103<sup>+</sup>.

Der Ligand von CD103 ist E-Cadherin, das nur von epithelialen Zellen exprimiert wird (Cepek et al., 1994). In der Literatur werden Werte von 0,5-5,0% doppelt positiver CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut angegeben (PROW-Web-Seite). Diesbezüglich lagen die DR4-P-Mäuse etwa in diesem Normalbereich. Die erhöhte CD103-Fraktion bei den BL6-Mäusen war deshalb dreimal höher als normal und könnte stammspezifische Ursachen haben, auf die hier aber nicht weiter eingegangen werden soll. Die FACS-Analyse des peripheren Blutes zeigte sowohl signifikante Verschiebungen in den CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als auch in der DX5<sup>+</sup>-NK-

Zellpopulation. Am interessantesten war hierbei die doppelte Anzahl der MHC-Klasse-II-restringierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in DR4-P-Mäusen.

### 3.5.4. Untersuchung der lymphoiden Organe (Lymphknoten, Milz und Thymus) und des peripheren Blutes

In einer weiteren phänotypischen Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die lymphoiden Organe wie Lymphknoten, Milz und Thymus analysiert. Hierfür wurde eine Reihe weiterer Antikörper gegen Oberflächenantigene verwendet, um detaillierte Unterschiede in den verschiedenen Zellpopulationen zu definieren. Auch peripheres Blut wurde nochmals in die Analyse mit einbezogen, da andere Marker verwendet wurden als in der Mausklarinik (siehe 3.5.3). Hierfür wurden jeweils vier weibliche und vier männliche Tiere im Alter von 3,5 Monaten des DR4-P-Stammes und der Bl6-Kontrollgruppe per FACS-Analyse getestet. Die Organe wurden präpariert und mit den jeweilig gleichen Geschlechtern eines Stammes gepoolt. Die Einzelzellsuspensionen wurden anschließend mit Antikörpern gefärbt. Die ausgewählten Antikörperkombinationen sollten es ermöglichen die verschiedenen lymphoiden Zellpopulationen, wie T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen zu charakterisieren. Des Weiteren wurden Marker mitgeführt, die auch Zellpopulationen der myeloïden Linie, wie Dendritische Zellen (DZ), Monozyten, Makrophagen und Granulozyten unterscheidbar machen sollten. Die verschiedenen Antigene wurden den unterschiedlichen Zelltypen folgenderweise zugeordnet:

#### Lymphoide Zellen



B-Zellen: CD19<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> IgD<sup>+/-</sup> IgM<sup>+</sup> IA<sup>+</sup> FcγR<sup>+</sup>  
Kein CD3



T-Zellen: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+/-</sup> CD8<sup>+/-</sup> CD25<sup>+/-</sup> CD62L<sup>+/-</sup> γδTCR<sup>+/-</sup>  
Kein CD19/B220



NK-Zellen: CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> FcγR<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup>  
Kein CD3, IA, Gr1, CD19/B220

#### Myeloïde Zellen



Granulozyten: CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>+</sup>  
Kein CD11c, IA, FcγR



Monozyten: CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> GR1<sup>+</sup> IA<sup>+</sup> FcγR<sup>+</sup>



Makrophagen: CD11c<sup>+</sup> IA<sup>+</sup> FcγR<sup>+</sup>  
Kein CD11b, Gr1

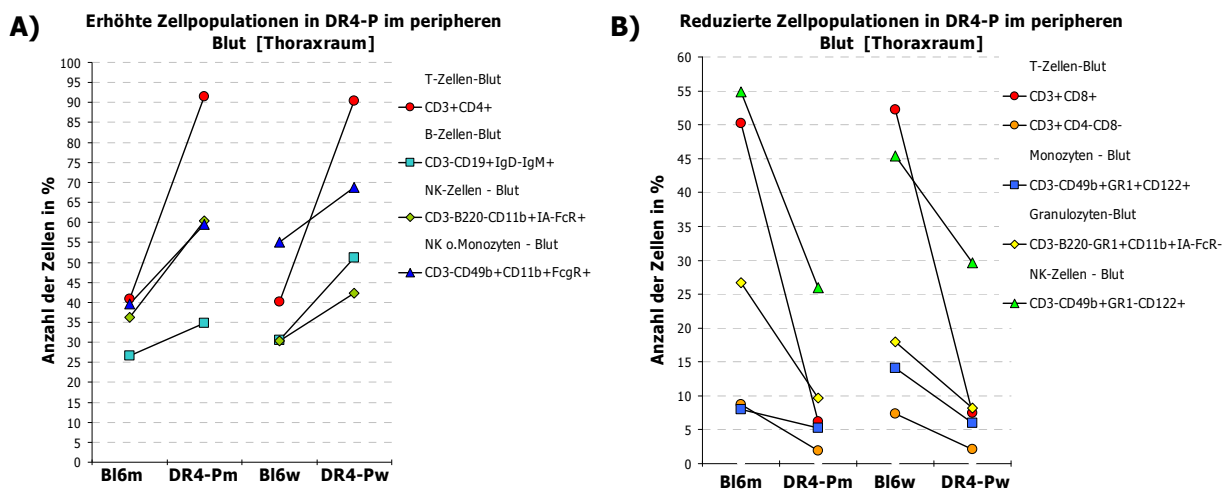


Dendritische Zellen (DZ): CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> IA<sup>+</sup>  
Kein FcγR, Gr1

**Abb. 37: Verwendung Linien-spezifischer Antikörper**



Hierfür wurden alle Zellpopulationen in DR4-P-Mäusen analysiert, die im Vergleich zu der Bl6-Kontrollgruppe in erhöhter bzw. reduzierter Anzahl in den verschiedenen Organen auftraten. In den Graphen sind nur die Zellpopulationen aufgeführt, die in beiden Geschlechtern eine bedeutende Erhöhung oder Reduzierung der verschiedenen Populationen gegenüber Bl6-Mäusen zeigten. Die Kriterien einer Erhöhung bzw. Reduzierung einer Zellpopulation betraf beide Geschlechter und war folgende: Ein Unterschied von mind. 20% gegenüber den Kontrollen und eine Mindestgröße von zwei Populationen von über 5%. Für die Analyse der MHC-Klasse-II-Expression wurden zwei verschiedene Antikörper herangezogen. Da die DR4-P-Mäuse keine IA-Expression aufweisen wurde hier ein Antikörper gewählt, der das humane DR4-Epitop erkennt. Für die Analyse der Bl6-Mäuse konnte dagegen ein gängiger IA-Antikörper eingesetzt werden. In den folgenden Tabellen [8-12] wurden die prozentualen Unterschiede der Zellpopulationen im Vergleich zu Bl6-Mäusen aufgeführt. Die Gesamtzellzahl im Blut betrug bei den DR4-P-Mäusen im Durchschnitt etwa  $24,7 \times 10^6$  Zellen/500  $\mu$ L und bei den Bl6-Mäusen etwa  $22,5 \times 10^6$  Zellen/500  $\mu$ L.



**Abb. 38: Unterschiede in der Frequenz verschiedener Zellpopulationen zwischen DR4-P- und Bl6-Mäusen im peripheren Blut: A) Erhöhte Zellpopulationen im Blut von DR4-P-Mäusen: links Bl6m (Männchen) gegenüber DR4-Pm (Männchen), rechts Bl6w (Weibchen) gegenüber DR4-Pw (Weibchen). B) Reduzierte Zellpopulationen im Blut von DR4-P-Mäusen: links Bl6m (Männchen) gegenüber DR4-Pm (Männchen), rechts Bl6w (Weibchen) gegenüber DR4-Pw (Weibchen).**

Im Blut der DR4-P-Mäuse war eine massive Erhöhung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, unreifen B-Zellen (IgD<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup>) und einer CD11b<sup>+</sup> IA<sup>-</sup> FcγR<sup>+</sup>-NK-Zellpopulation zu beobachten. Zudem trat eine Erhöhung einer weiteren Zellpopulation auf, die nicht eindeutig definiert werden konnte. Die Marker (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> FcγR<sup>+</sup>) reichten nicht aus um zwischen Monozyten oder NK-Zellen zu unterscheiden.

**Tab. 8: Prozentuale Unterschiede von Zellpopulationen im Blut**

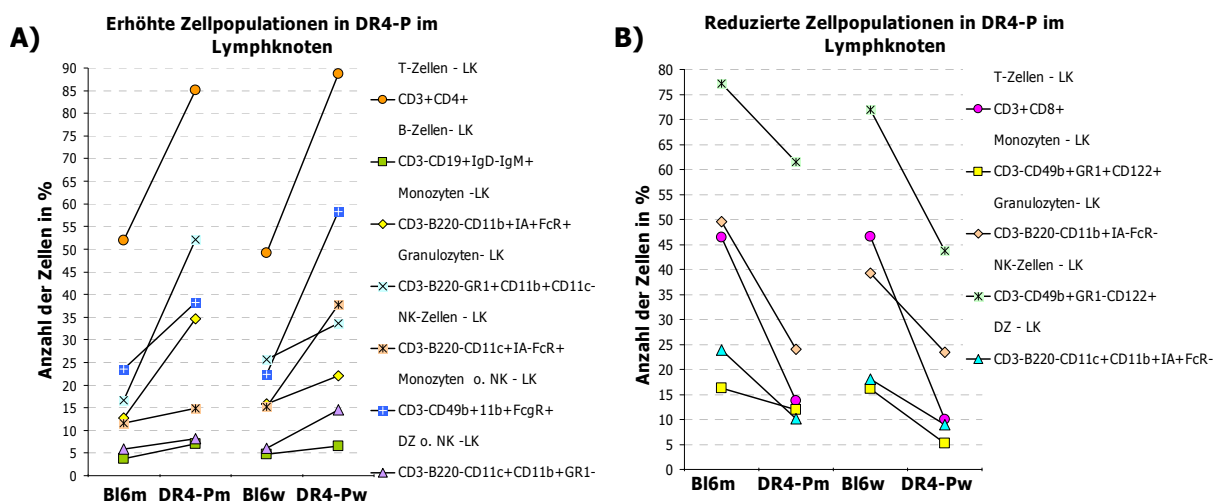
Zelltypus	DR4-P erhöht in % von []	Zelltypus	DR4-P reduziert in % von []
<b>T-Zellen - Blut</b>	<b>[CD3<sup>+</sup> B220<sup>-</sup>]</b>	<b>T-Zellen - Blut</b>	<b>[CD3<sup>+</sup> B220<sup>-</sup>]</b>
CD4 <sup>+</sup>	M: 55,3 [91,5] W: 55,5 [90,4]	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	M: -78,8 [1,8] W: -71,7 [2,1]
<b>B-Zellen - Blut</b>	<b>[CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>]</b>	CD8 <sup>+</sup>	M: -87,7 [6,2] W: -85,7 [7,5]
IgD <sup>-</sup> IgM <sup>+</sup>	M: 23,5 [34,9] W: 40,2 [51,2]	<b>Monozyten - Blut</b>	<b>[CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup>]</b>
<b>NK-Zellen - Blut</b>	<b>[CD3<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>]</b>	GR1 <sup>+</sup> CD122 <sup>+</sup>	M: -33,9 [5,26] W: -57,5 [6]
IA <sup>-</sup> FcγR <sup>+</sup>	M: 39,9 [60,4] W: 28,2 [42,2]	<b>Granulozyten - Blut</b>	<b>[CD3<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>]</b>
<b>NK o. Monozyten - Blut</b>	<b>[CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup>]</b>	GR1 <sup>+</sup> IA <sup>-</sup> FcγR <sup>-</sup>	M: -63,9 [9,6] W: -54,6 [8,2]
CD11b <sup>+</sup> FcγR <sup>+</sup>	M: 33,5 [59,5] W: 20,0 [68,8]	<b>NK-Zellen - Blut</b>	<b>[CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup>]</b>
		GR1 <sup>-</sup> CD122 <sup>+</sup>	M: -52,6 [26] W: -37,8 [29,6]

Die in den eckigen Klammern [] angegebenen Antigene beschreiben die Populationen auf die sich das „Gating“ der jeweiligen Zelltypen bezog. M – männliche Mäuse, W-weibliche Mäuse.

Folgende Zellpopulationen waren im Blut von DR4-P-Mäusen stark reduziert:

CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>-T-Zellen (DN=doppelt negative), Monozyten (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> GR1<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup>), Granulozyten (CD3<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>+</sup> IA<sup>-</sup> FcγR<sup>-</sup>) und eine NK-Zellpopulation (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> GR1<sup>-</sup> CD122<sup>+</sup>). Hierbei fiel auf, dass es eine NK-Population gab, die erhöht war (CD11b<sup>+</sup> IA<sup>-</sup> FcγR<sup>+</sup>), wohingegen eine andere stark reduziert (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> GR1<sup>-</sup> CD122<sup>+</sup>) auftrat. Der Grund hierfür könnte im Aktivierungszustand der Zellen zu finden sein, der mit den verwendeten Markern aber nicht aufzudecken war. Dies galt auch für alle anderen Subpopulationen, die sowohl erhöht als auch reduziert gegenüber den Kontrollen detektiert wurden. Insgesamt konnte durch diese phänotypische Analyse der peripheren Leukozyten im Blut die Ergebnisse der Mausklarin bestätigt werden.

Die Gesamtzellzahl der peripheren Lymphknoten betrug bei den DR4-P-Mäusen im Durchschnitt etwa  $39,8 \times 10^6$  Zellen und bei den Bl6-Mäusen etwa  $34,2 \times 10^6$  Zellen.



**Abb. 39: Unterschiede in der Frequenz verschiedener Zellpopulationen zwischen DR4-P- und Bl6-Mäusen im Lymphknoten: A) Erhöhte Zellpopulationen im Lymphknoten von DR4-P-Mäusen: links Bl6m (Männchen) gegenüber DR4-Pm (Männchen), rechts Bl6w (Weibchen) gegenüber DR4-Pw (Weibchen). B) Reduzierte Zellpopulationen im Lymphknoten von DR4-P-Mäusen: links Bl6m (Männchen) gegenüber DR4-Pm (Männchen), rechts Bl6w (Weibchen) gegenüber DR4-Pw (Weibchen).**

Die Analyse der DR4-P-Zellen aus den peripheren Lymphknoten (LK) ergab ebenfalls massive Erhöhungen der Zellpopulationen, die schon im Blut nachgewiesen werden konnten ( $CD4^+$ ,  $IgD^- IgM^+$ ,  $CD11b^+ IA^- Fc\gamma R^+$ ). Zusätzlich waren im LK noch folgende Populationen vertreten, die eine erhöhte Anzahl gegenüber den Bl6-Kontrollmäusen aufwiesen: Monozyten ( $CD3^- B220^- CD11c^+ IA^+ Fc\gamma R^+$ ), Granulozyten ( $CD3^- B220^- GR1^+ CD11b^+ CD11c^-$ ) und zwei weitere Populationen. Diese konnten nicht genau definiert werden, da sie Marker von zwei möglichen Populationen exprimierten.  $CD3^- CD49b^+ CD11b^+ Fc\gamma R^+$ -Zellen könnten entweder zu den Monozyten oder NK-Zellen gehören und  $CD3^- B220^- CD11c^+ CD11b^+ GR1^-$ -Zellen zu DZs oder NK-Zellen.

Auch bei den Zellpopulationen die in stark reduzierter Anzahl auftraten, ergab die Analyse der Lymphknoten dieselben Zellpopulationen wie im Blut ( $CD8^+$ ,  $CD49b^+ GR1^+ CD122^+$ ,

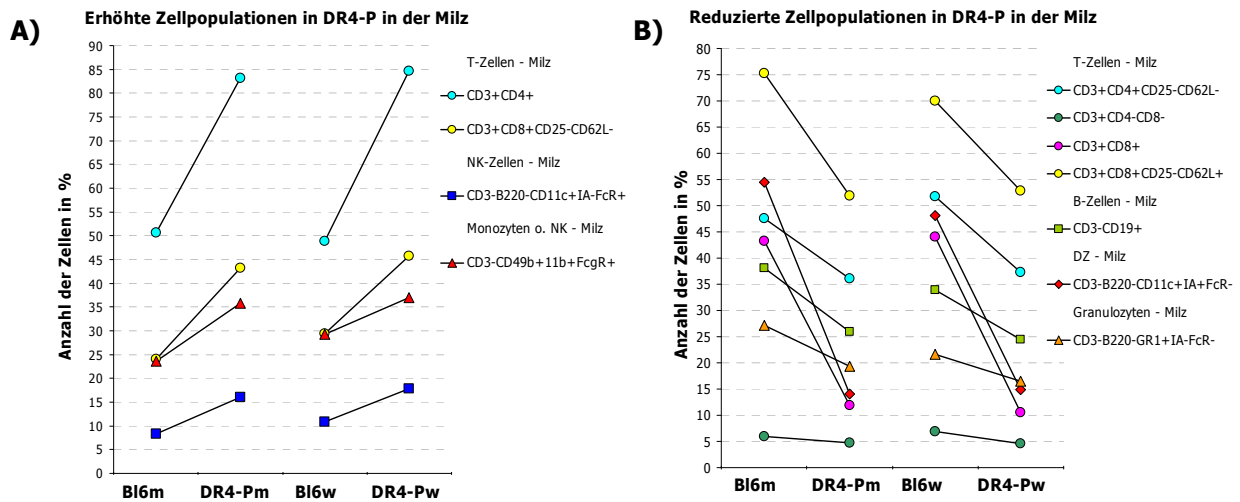
CD11b<sup>+</sup> IA<sup>-</sup> FcγR<sup>-</sup>, CD49b<sup>+</sup> GR1<sup>-</sup> CD122<sup>+</sup>). Allerdings trat im Lymphknoten zusätzlich eine DZ-Population (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> IA<sup>+</sup> FcγR<sup>+</sup>) in reduziert Anzahl auf.

**Tab. 9: Prozentuale Unterschiede von Zellpopulationen im Lymphknoten**

Zelltypus		DR4-P erhöht in % von []		Zelltypus		DR4-P- reduziert in % von []	
<b>T-Zellen - LK</b>		<b>[CD3- B220-]</b>		<b>T-Zellen - LK</b>		<b>[CD3- B220-]</b>	
CD4+		M:	39,0 [85,1]	CD3+ CD8+		M:	-70,5 [13,7]
		W:	44,5 [88,7]			W:	-78,6 [10,0]
<b>B-Zellen - LK</b>		<b>[CD3- CD19+]</b>		<b>Monozyten - LK</b>		<b>[CD3- CD49b+]</b>	
IgD- IgM+		M:	46,3 [7,0]	GR1+ CD122+		M:	-27,0 [11,9]
		W:	27,1 [6,6]			W:	-67,4 [5,3]
<b>Monozyten - LK</b>		<b>[CD3- B220- CD11b+]</b>		<b>Granulozyten - LK</b>		<b>[CD3- B220- CD11b+]</b>	
IA+ FcγR+		M:	63,4 [34,7]	IA- FcγR-		M:	-51,4 [24,1]
		W:	28,2 [22,0]			W:	-40,3 [23,4]
<b>Granulozyten - LK</b>		<b>[CD3- B220- GR1+]</b>		<b>NK-Zellen - LK</b>		<b>[CD3- CD49b+]</b>	
CD11b+ CD11c-		M:	68,1 [52,1]	GR1- CD122+		M:	-20,2 [61,5]
		W:	23,5 [33,6]			W:	-39,2 [43,8]
<b>NK-Zellen - LK</b>		<b>[CD3- B220- CD11c+]</b>		<b>DZ - LK</b>		<b>[CD3- B220- CD11c+]</b>	
CD11b+ IA- FcγR+		M:	28,2 [23,4]	CD11b+ IA+ FcγR-		M:	-57,4 [10,2]
		W:	44,7 [43,7]			W:	-50,1 [9,0]
<b>Monozyten o. NK - LK</b>		<b>[CD3- CD49b+]</b>					
CD11b+ FcγR+		M:	38,5 [38,2]				
		W:	61,6 [58,3]				
<b>DZ o. NK - LK</b>		<b>[CD3- B220- CD11c+]</b>					
CD11b+ GR1-		M:	29,5 [8,2]				
		W:	58,2 [14,5]				

Die in den eckigen Klammern [] angegebenen Antigene beschreiben die Populationen auf die sich das „Gating“ der jeweiligen Zelltypen bezog. M – männliche Mäuse, W-weibliche Mäuse.

Die Gesamtzellzahl der Milz betrug bei den DR4-P-Mäusen im Durchschnitt etwa  $214 \times 10^6$  Zellen und bei den Bl6-Mäusen etwa  $198 \times 10^6$  Zellen.



**Abb. 40: Unterschiede in der Frequenz verschiedener Zellpopulationen zwischen DR4-P- und Bl6-Mäusen in der Milz: A) Erhöhte Zellpopulationen in der Milz von DR4-P-Mäusen: links Bl6m (Männchen) gegenüber DR4-Pm (Männchen), rechts Bl6w (Weibchen) gegenüber DR4-Pw (Weibchen). B) Reduzierte Zellpopulationen in der Milz von DR4-P-Mäusen: links Bl6m (Männchen) gegenüber DR4-Pm (Männchen), rechts Bl6w (Weibchen) gegenüber DR4-Pw (Weibchen).**

Die Analyse der DR4-P-Milzzellen ergab ebenfalls eine massive Erhöhung der  $CD4^+$ -T-Zellen sowie einer  $CD8^+$ -T-Zell-Subpopulation, die man als ruhende, naive Zellen ( $CD25^- CD62L^-$ ) bezeichnet. Auch eine NK-Population ( $CD11c^+ IA^- Fc\gamma R^+$ ), die schon in Blut und LK erhöht war, konnte in erhöhter Anzahl in der Milz detektiert werden. Darüber hinaus gab es hier auch eine Population die nicht eindeutig definierbar war, da sie sowohl Marker für Monozyten als auch NK-Zellen auf der Oberfläche trug ( $CD49b^+ CD11b^+ Fc\gamma R^+$ ).

Unter den Populationen der DR4-P-Mäuse, deren Anzahl in der Milz stark reduziert auftrat, waren T-Zellen, B-Zellen, DZs und Granulozyten zu finden. Wobei die T-Zellen in verschiedenen Subtypen detektiert wurden:  $CD4^+ CD25^- CD62L^-$  - ruhende, naive  $CD4^+$ -T-Zellen,  $CD4^- CD8^-$  (DN) - frühe, unreife T-Zellen,  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen (CTL) und  $CD8^+ CD25^- CD62L^+$  ruhende Gedächtnis oder Effektor-T-Zellen. Zudem war die Anzahl der

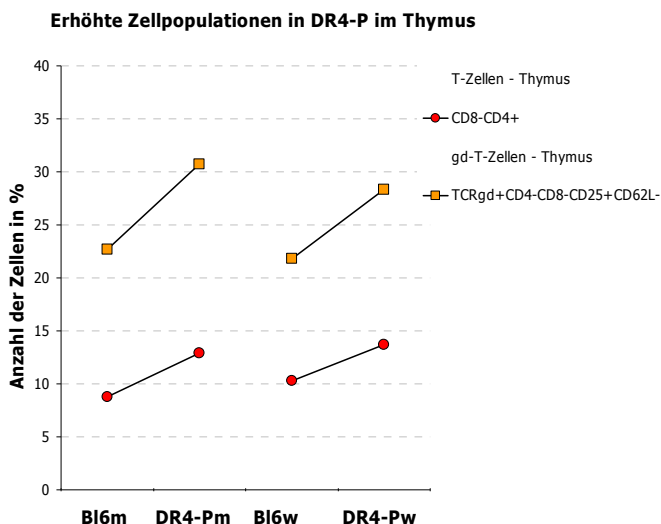
gesamten B-Zellpopulation (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>) stark reduziert. Darüber hinaus traten auch DZs (CD11c<sup>+</sup> IA<sup>+</sup> Fc $\gamma$ R<sup>-</sup>) und Granulozyten (GR1<sup>+</sup> IA<sup>-</sup> Fc $\gamma$ R<sup>-</sup>) in reduziert Anzahl auf.

**Tab. 10: Prozentuale Unterschiede von Zellpopulationen in der Milz**

Zelltypus	DR4-P erhöht in % von []	Zelltypus	DR4-P reduziert in % von []
<b>T-Zellen - Milz</b> [CD3+ B220-]		<b>T-Zellen - Milz</b> [CD3+ B220-]	
CD4+	M: 39,0 [83,2] W: 42,4 [84,7]	CD4+ CD25- CD62L-	M: -24,2 [36,1] W: -28,0 [37,3]
CD8+ CD25- CD62L-	M: 44,2 [43,2] W: 35,7 [45,7]	CD4- CD8-	M: -20,7 [4,76] W: -32,4 [4,65]
<b>NK-Zellen - Milz</b> [CD3- B220- CD11c+]		CD8+	
IA- Fc $\gamma$ R+	M: 47,9 [16] W: 38,8 [17,8]	CD8+ CD25- CD62L+	M: -72,5 [11,9] W: -76,2 [10,5]
<b>Monozyten o. NK - Milz</b> [CD3- CD49b+]		<b>B-Zellen - Milz</b> [CD3- CD19+]	
CD11b+ Fc $\gamma$ R+	M: 34,1 [35,8] W: 20,8 [37]	CD3- CD19+	M: -31,8 [26] W: -27,7 [24,5]
		<b>Granulozyten - Milz</b> [CD3- B220- GR1+]	
		IA- Fc $\gamma$ R-	M: -29,0 [19,3] W: -23,6 [16,5]
		<b>DZ - Milz</b> [CD3- B220- CD11c+]	
		IA+ Fc $\gamma$ R-	M: -74,1 [14,1] W: -69,0 [14,9]

Die in den eckigen Klammern [] angegebenen Antigene beschreiben die Populationen auf die sich das „Gating“ der jeweiligen Zelltypen bezog. M – männliche Mäuse, W-weibliche Mäuse.

Da im Thymus hauptsächlich Thymozyten vertreten sind, wurden für dieses Organ nur Antikörper verwendet, die Aufschluss über Thymozyten geben konnten. Auf die Analyse von myeloiden Zellen wurde hier deshalb verzichtet. Die Gesamtzellzahl des Thymus betrug bei den DR4-P-Mäusen im Durchschnitt etwa  $157 \times 10^6$  Zellen und bei den Bl6-Mäusen etwa  $164 \times 10^6$  Zellen.



**Abb. 41: Unterschiede in der Frequenz verschiedener Thymozyten zwischen DR4-P- und Bl6-Mäusen im Thymus. Erhöhte Zellpopulationen im Thymus von DR4-P-Mäusen: links Bl6m (Männchen) gegenüber DR4-Pm (Männchen), rechts Bl6w (Weibchen) gegenüber DR4-Pw (Weibchen).**

Die Analyse der Thymozyten ergab, dass bei den DR4-P-Mäusen nur zwei Populationen im Vergleich zu Bl6-Mäusen erhöht waren. So traten eine erhöhte CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> - T-Zellpopulation und bei den  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> - Zellfraktion in erhöhter Anzahl auf, die höchstwahrscheinlich reifen aktivierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen zuzuordnen ist.

**Tab. 11: Prozentuale Unterschiede von Zellpopulationen im Thymus**

Zelltypus	DR4-P erhöht in % von []
<b>T-Zellen - Thymus</b>	<b>[CD8-CD4+]</b>
CD8-CD4+	M: 31,7 [12,8] W: 24,8 [13,7]
<b><math>\gamma\delta</math>-T-Zellen - Thymus</b>	<b>[TCR<math>\gamma\delta</math>+CD4-CD8-]</b>
CD25+CD62L-	M: 26,1 [30,7] W: 23,0 [28,3]

Die in den eckigen Klammern [] angegebenen Antigene beschreiben die Populationen auf die sich das „Gating“ der jeweiligen Zelltypen bezog. M – männliche Mäuse, W-weibliche Mäuse.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der FACS-Analyse folgendes festgestellt werden: Eine massive Erhöhung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation tritt sowohl im Blut als auch in den peripheren Lymphknoten, der Milz und dem Thymus von DR4-P-Mäusen auf. Eine erhöhte Anzahl der NK-Zellen, der CD11b<sup>+</sup>- oder CD11c<sup>+</sup> IA<sup>-</sup> FcγR<sup>+</sup>- Fraktion konnte außer im Thymus auch in allen anderen untersuchten Organen detektiert werden. Die Erhöhung unreifer B-Zellen (IgD<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup>) war nur im Blut und in den Lymphknoten nachweisbar. Auch die deutliche Reduzierung an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie die reduzierte Anzahl an Granulozyten in Blut, LK und Milz der DR4-P-Mäuse zeigte sich konsistent. Darüber hinaus waren reduzierte Fraktionen von NK-Zellen (CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> GR1<sup>-</sup> CD122<sup>+</sup>) und Monozyten (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> GR1<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup>) in Blut und Lymphknoten der DR4-P-Mäuse aufgetreten. Die Milz scheint sich von den anderen lymphoiden Organen insofern zu unterscheiden, als dass nur dort eine reduzierte Frequenz von B-Zellen (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>) gefunden wurde.

Zur besseren Übersicht wurden in der folgenden Tabelle die wichtigsten Ergebnisse der Zellpopulationen zusammengefasst, die eindeutig definiert werden konnten.

**Tab. 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen in Blut, Lymphknoten und Milz**

Zellpopulation	Blut	Lymphknoten	Milz
CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	erhöht	erhöht	erhöht
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	reduziert	reduziert	reduziert
B-Zellen	unreife erhöht	unreife erhöht	reduziert
NK-Zellen	erhöht/reduziert	erhöht	erhöht
Dendritische Zellen	unverändert	reduziert	reduziert
Granulozyten	reduziert	erhöht/reduziert	reduziert
Monozyten	reduziert	erhöht/reduziert	unverändert

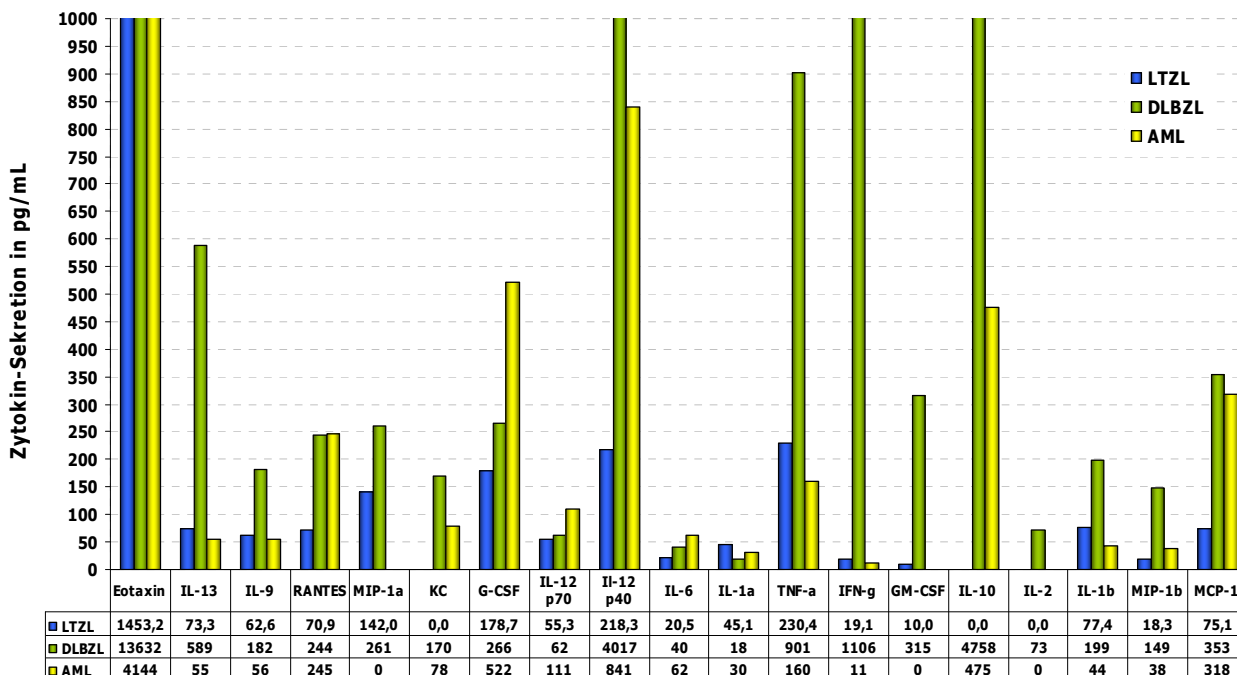


### **3.6. Nähere Untersuchungen der verschiedenen Tumoren**

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die phänotypischen und genotypischen Eigenschaften der verschiedenen Mausstämme untersucht wurde, soll in den nun folgenden Kapiteln näher auf die verschiedenen Tumoren der DR4-P-Generation eingegangen werden.

#### **3.6.1 Analyse der sezernierten Zytokine**

Zytokine sind wichtige Signalproteine, die an einer großen Anzahl von physiologischen Prozessen beteiligt sind, wie der Induktion von Immunität, Inflammation und der Hämatopoiese. Daher werden sie auch mit einem großen Spektrum von Krankheiten assoziiert, zu denen auch die Entwicklung von Tumoren zählt (Balkwill et al., 2004). Es folgten deshalb Untersuchungen der sezernierten Zytokine in den Seren der Mäuse, die Tumoren entwickelt hatten und diese durch die Pathologie klassifiziert waren. Zytokine können sowohl von den Tumoren selbst sezerniert werden, meist aber von „gesunden“ umliegenden Zellen oder von Tumor-infiltrierenden Zellen, die durch den Tumor aktiviert wurden (Wang et al., 2004). Die in das Serum sezernierten Zytokine konnten mittels der so genannten BioPlex-Methode quantitativ ermittelt werden. Mit dem BioPlex23-System war es möglich 23 verschiedene Zytokine in einer Serumprobe zu analysieren. Auf diese Weise sollten Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Tumoren aufgedeckt werden, die Aufschluss über die Art der Erkrankung geben könnten.



**Abb. 42: Zytokinsekretion in Seren von Tumor-tragenden Mäusen:** Angegeben wurden die Durchschnittswerte von zwei bis drei Mäusen pro Tumorart. Die Skalierung wurde bewusst nur bis 1000 pg/mL gewählt, damit die Unterschiede bei geringeren Werten noch sichtbar waren.

In dem Diagramm wurden nur Seren von Mäusen aufgeführt, die durch pathologische Befunde der Tumoren klassifiziert waren. Dies ist auch der Grund, warum nur LTZL, DLBZL und AML-Fälle aufgeführt wurden. Jede Gruppe besteht aus zwei bis drei Mäusen. Als Kontrolle dienten gesunde Mäuse, die allerdings Zytokine in so geringen Mengen ausschütteten, dass sie nicht detektierbar waren. Deshalb wurde auf die Darstellung der Kontrollen in der Graphik verzichtet. Zudem wurden die Zytokine IL-3 und IL-4 nicht in der Graphik dargestellt, da sie bei keiner der Mäuse detektierbar waren. IL-17 und IL-5 wurden ebenfalls nicht angezeigt, da die Menge der gemessenen Zytokine unter 20 pg/mL lag. Wie man in Abb. 42 erkennen kann, ließ sich kein eindeutiges Zytokin-Muster in den Seren von Mäusen mit den verschiedenen Tumoren entdecken. Die Zytokine, die in allen Seren gefunden wurden, waren hauptsächlich inflammatorische Zytokine, die einen Hinweis auf eine Entzündung geben (IL-12, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  usw.). Dennoch gab es Differenzen zwischen den vorhandenen Zytokinen und den quantitativ bestimmten Mengen, die bis zu 100-fach auseinander lagen. So schienen nur Mäuse mit T- und B-Zell-Tumoren MIP-1a und GM-CSF

auszuschütten. MIP-1 $\alpha$  wird von Makrophagen produziert und führt zu lokalen, entzündlichen Immunantworten. GM-CSF wird von T-Zellen und Makrophagen nach deren Aktivierung ausgeschüttet.

IL-2 konnte nur in Mäusen detektiert werden, die B-Zell-Tumoren aufwiesen (DLBZL). IL-2 wird von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach deren Aktivierung, von B-Zellen und auch leukämischen Zellen sezerniert. Zudem gab es auch Zytokine, die nur von Mäusen mit AML und DLBZL ausgeschüttet wurden, wie KC und IL-10. KC ist ein Zytokin, das von Keratinozyten, Monozyten und Makrophagen produziert wird. Dagegen wird IL-10 auch von Keratinozyten, aber hauptsächlich von Th<sub>2</sub>-Zellen sezerniert.

Alle anderen aufgeführten Zytokine wurden in den Seren von allen untersuchten Mäusen detektiert. Hierbei war das Eotaxin sehr auffällig, da hiervon in allen Serumproben die höchsten Mengen gemessen werden konnten. Das Ausmaß der Eotaxin-Ausschüttung zeigte sich zwischen den Tumorarten aber sehr unterschiedlich. Es ist bekannt, dass murine B-Zell-Lymphomzellen in Anwesenheit von Eotaxin und auch RANTES (Familie der CC-Chemokine) zur Wanderung getrieben werden können. RANTES spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsherden, wird hauptsächlich von T-Zellen produziert und durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  induziert (alle Informationen aus [www.copewithcytokines.de](http://www.copewithcytokines.de)). Darüber hinaus schienen B-Zell-Tumoren dazu zu führen, dass generell größere Mengen an Zytokinen produziert und sezerniert wurden als bei Leukämien (AML) oder T-Zell-Tumoren. In der folgenden Tabelle wurden die x-fachen Unterschiede der sezernierten Zytokine in den Seren der einzelnen Tumorgruppen im Vergleich zu B-Zell-Tumoren zusammengefasst.

**Tab. 13: Unterschiedliche Mengen der Zytokinausschüttung verschiedener Seren Tumor-tragender Mäuse im Vergleich zu B-Zell-Tumoren:**

	LTZL	AML
<b>Eotaxin</b>	-9,4x	-3,3x
<b>IL-13</b>	-8x	-10,7x
<b>IL-9</b>	-3,0x	-3,3x
<b>RANTES</b>	-3,4x	0
<b>IL12-p40</b>	-18,4x	-4,8x
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-3,9x	-5,6x
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-57,9x	-100,5x
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	-2,6x	-4,5x
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	-8,1x	-3,9x
<b>MCP-1</b>	-4,7x	-1,1x
<b>G-CSF</b>	-1,5x	+2,0x
<b>IL12-p70</b>	-1,1x	+1,8x
<b>IL-6</b>	-2,0x	+1,6x

*Aufgeführt wurden alle Zytokine, die in den Seren aller drei Tumorarten sezerniert wurden. Gelb markiert sind Zytokine die bei AML-Fällen erhöht waren.*

Die Untersuchung der Seren verschiedener Tumor-tragender Mäuse ergab Unterschiede in den verschiedenen Zytokinen und deren ausgeschütteten Mengen. Allerdings war es nicht möglich den bestimmten Tumoren ein eindeutiges Zytokin-Muster zuzuordnen. Hierfür waren die unterschiedlichen Mengen der sezernierten Zytokine zu uneinheitlich. Aufgrund der Heterogenität der analysierten Zytokine konnten also keine prognostischen Entwicklungen der verschiedenen Tumoren vorhergesagt werden.

### **3.6.2. Untersuchung verschiedener Transkriptionsfaktoren und anderer Gene in klassifizierten Tumoren der DR4-P-Generation**

Transkriptionsfaktoren (TF) spielen eine wichtige Rolle bei der Transkription von Genen, indem sie die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen unterstützen. Die RNA-Polymerasen binden an den Promoter und benötigen für die geregelte und exakt positionierte Initiation der Transkription die Hilfe der Transkriptionsfaktoren. Es gibt drei verschiedene RNA-Polymerasen, wobei die RNA-Polymerase II für die Transkription der proteinkodierenden

Gene zuständig ist und von den so genannten TFII-Transkriptionsfaktoren unterstützt wird. Diese unterscheiden sich wiederum in generelle (GTF) und regulatorische (RTF) Transkriptionsfaktoren. Hauptsächlich dieser regulatorischen TFII-Transkriptionsfaktoren sollten in den klassifizierten Tumoren der DR4-P-Generation untersucht werden, da diesen die Aktivität der differentiellen Genexpression zugeschrieben wird (Seyffert, Lehrbuch der Genetik, 2003). Die untersuchten Transkriptionsfaktoren sind hauptsächlich in der Hämatopoiese und MHC-Klasse-II- Expression beteiligt. Darüber hinaus wurden auch einige andere Gene untersucht, die eine Rolle in der Differenzierung von Zellen spielen. Zudem sollte dieses Experiment Aufschluss über die Genexpression vermeintlicher Kandidaten geben, die in den verschiedenen Tumorguppen einheitlich auftreten könnten. Hierfür wurde zunächst die RNA aus Tumormischproben der Milz folgender Mäuse isoliert: No. 10 LTZL, No. 41 LTZL, No. 40 DLBZL, No. 96 DLBZL, No. 110 HL-ähnlich, No. 118 HL-ähnlich und No. 78 AML. Anschließend wurde aus der RNA cDNA synthetisiert. Die verwendeten Primer wurden entweder aus der JAX-Datenbank ([www.jax.org](http://www.jax.org)) übernommen oder mit Hilfe der Software (primer3\_www.cgi v 0.2; Rozen et al., 2000) bestimmt. Mittels einer quantitativen „real time“ qRT-PCR wurden die einzelnen regulatorischen TFs spezifisch amplifiziert. Die unterschiedliche Expression wurde mit Hilfe des Haushaltsgens 18S rRNA normalisiert, mit den Kontrollen aus einer gesunden DR4-P-Maus verglichen und als x-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.

**Tab. 14: X-fache Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in DR4-P-Tumorgruppen im Vergleich zu einer gesunden DR4-P-Kontrollmaus**

TRANSKRIPTIONS-FAKTOR	10 LTZL	41 LTZL	40 DLBZL	96 DLBZL	110 HL	118 HL	78 AML
H2-Ea_SP1	-	++	-	-	++	+++	-
H2-Ea_Egr1	-	+	0	0	++	+++	-
H2-Eb_Oct1	0	0	0	0	+	+	-
H2-Eb_c-Fos	-	+	+	0	+	0	+
Jak3	0	+	0	0	++	+	0
EVI1	0	+	++	+++++	++	+	+++++
PU.1	0	--	+	+	0	-	++
Runx1	+	0	0	0	+	0	+
FOG	+	0	+	0	0	0	0
NFκB (p50)	0	0	0	0	+	0	0
CBFB	+	+	+	+	++	++	+
E2A	+	+	++	+	+	+	0
Pax5	-	-	++	+	+	0	-
STAT6	+	+	+	+	++	+	+
Bcl6	+	0	0	+	+	0	+
GATA3	++	++	0	--	+++	+++	0
Tbet	0	++	-	0	+++	++	--
c-myc	--	+	++	+	+	++	+

<i>H2-Ea_SP1</i>	<i>bindet an die Promoterregion des H2-Ea</i>
<i>H2-Ea_Egr1</i>	<i>bindet an die Promoterregion des H2-Ea</i>
<i>H2-Eb_OCT1</i>	<i>bindet an die Promoterregion des H2-Eb</i>
<i>H2-Eb_cFos</i>	<i>bindet an die Promoterregion des H2-Eb</i>
<i>Jak3</i>	<i>Lymphoide Zellen</i>
<i>EVI1</i>	<i>Rearrangement in allen hämatopoietischen Zellen</i>
<i>PU.1</i>	<i>Myeloide und B-Zellen</i>
<i>Runx1</i>	<i>Alle hämatopoietischen Zellen</i>
<i>FOG</i>	<i>Erythroide und Megakaryozyten</i>
<i>NFκB</i>	<i>Regulator der Zellproliferation und des Überlebens von Zellen</i>
<i>CBFB</i>	<i>Alle hämatopoietischen Zellen</i>
<i>E2A</i>	<i>B- und T-Zellen</i>
<i>Pax-5</i>	<i>Frühe und späte B-Zellen</i>
<i>Stat6</i>	<i>Signal Transducer und Aktivator der Transkription</i>
<i>Bcl6</i>	<i>Transkriptioneller Repressor, häufig in B-Zell-Lymphomen transloziert</i>
<i>GATA3</i>	<i>Th2 Differenzierung</i>
<i>Tbet</i>	<i>Th1 Differenzierung</i>
<i>c-myc</i>	<i>Regulator der Genexpression</i>

**Legende: x-fachen Expression**

-----	(<1000-fach)
----	(< 500 -fach)
---	(< 50 -fach)
--	(< 10 -fach)
-	(< 2.5 -fach)
0	(+/- 2.5 -fach)
+	(>2.5 -fach)
++	(> 10 -fach)
+++	(> 50 -fach)
++++	(> 500 -fach)
+++++	(> 1000 -fach)

Die Analyse der Transkriptionsfaktoren in den verschiedenen Tumorproben ergab eine relativ einheitliche Expression der TF in den verschiedenen Tumorgruppen (LTZL, DLBZL, HL-ähnlich). Zudem gab es zwei Transkriptionsfaktoren (CBFB und Stat6), die in allen

Tumormischproben leicht erhöhte Transkriptmengen aufwiesen. Der Transkriptionsfaktor E2A konnte nur in den lymphoiden Tumorproben (LTZL, DLBZL, HL-ähnlich) mit einer leicht erhöhten Transkriptmenge festgestellt werden. Überexprimierte bzw. herunterregulierte Gene wurden als solche eingestuft, wenn sie mindestens eine 10-fache Erhöhung oder Reduzierung der Transkriptmengen aufwiesen. Am auffälligsten war hierbei der Transkriptionsfaktor EVI1, der in den Tumorproben No. 96 DLBZL und No. 78 AML als am stärksten überexprimiert detektiert werden konnte. In der Gruppe der HL-ähnlichen Tumoren waren sowohl die beiden Transkriptionsfaktoren SP1 und Egr1 überexprimiert, die beide unter anderem an den Promoterbereich der murinen Klasse-II-Lokus (H2-Ea) binden, als auch die Transkriptionsfaktoren Tbet und GATA3, die eine Rolle in der Th<sub>1</sub> bzw. Th<sub>2</sub> Differenzierung spielen (Glimcher et al. 2000; Zhang et al., 1997). Die Überexpression von GATA3 und Tbet ist ein Hinweis darauf, dass in den Tumormischproben der HL-ähnlichen Fälle T-Zellen beider Subtypen expandiert sein könnten. Darüber hinaus konnte keiner der Transkriptionsfaktoren als Kandidat für einzelne Tumorguppen bestimmt werden.

Zusätzlich wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren und andere Gene in nicht-klassifizierten Tumorproben aus vergrößerten peripheren Lymphknoten erkrankter DR4-P-Mäuse untersucht. Auch hier wurde die unterschiedliche Expression mittels 18S rRNA normalisiert und mit den Kontrollen aus einer Bl6-Maus verglichen. Die x-fache Expression wurde mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.

**Tab. 15: Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und anderer Gene in vergrößerten DR4-P-Lymphknoten im Vergleich zur Bl6-Kontrolle**

DR4-P-Mäuse	CIITA	Spi-B	Pax-5	Oct2	EBF	ID3	Ku70	CD19	Stat-6	Syk
551 LK	-	--	0	+	-	-	0	0	-	+
616 LK	--	nd	---	---	---	--	--	--	--	-
212 LK	-	--	0	+	0	-	0	+	-	0
207 LK	-	0	+	+	+	0	+	+++	0	++
732 LK	-	-	--	-	--	0	0	-	-	-
656 LK	-	---	-	0	--	--	0	0	-	+
606 LK	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+
595 LK	-	-	--	0	---	---	+	--	0	+
621 LK	--	---	--	-	---	++	+++	-	+	0

DR4-P-Mäuse	Blimp1	Bcl6	c-myc	AID	Bcl2-A1	XBP1	DNA-PK	CEBPa	Ku86
551 LK	0	+	+	++	0	0	+	0	0
616 LK	++	-	-	-	-	0	--	0	--
212 LK	+	+	+	+++	0	0	0	+	0
207 LK	++	0	++	-	++	+	++	0	+
732 LK	0	0	+	0	0	0	0	0	+
656 LK	+	-	+	0	0	0	0	0	0
606 LK	++	+	+	++	+	+	++	0	+
595 LK	0	0	+	-	0	+	+	+	-
621 LK	+	0	++	--	+	++	+	-	++

*CIITA* Klasse-II-Transaktivator

*Spi-B* Makrophagen-Differenzierung und hämatopoietische Zellen

*Pax-5* Frühe und späte B-Zellen

*Oct2* B-Zellen; essentiell für CD36-Expression

*EBF* B-Zellen/ „Early“ B-Zellfaktor

*ID3* Alle hämatopoietischen Zellen

*Ku70* „Late“ B-Zellentwicklung/ IgH "Class Switch Recombination"

*CD19* Pan B-Zellmarker

*Stat6* Signal Transducer und Aktivator der Transkription

*Syk* Tyrosin Kinase; B-Zellentwicklung

*Blimp1* B-Zell-Reifung

*Bcl6* Transkriptioneller Repressor, häufig in B-Zell-Lymphomen transloziert

*c-myc* Regulator der Genexpression

*AID* "Class Switch Recombination" in B-Zellen

*Bcl2-A1* Regulator der Apoptose

*Xbp1* Plasmazellen-Differenzierung

*DNA-PK* Religation von Doppelstrangbrüchen; Tumorsuppressor

*CeBPa* Myeloide Differenzierung

*Ku86* Rekrutiert DNA-PKs

#### Legende: x-fache Expression

----- (< 1000-fach)

---- (< 500 -fach)

--- (< 50 -fach)

-- (< 10 -fach)

- (< 2.5 -fach)

0 (+- 2.5 -fach)

+ (>2.5 -fach)

++ (> 10 -fach)

+++ (> 50 -fach)

++++ (> 500 -fach)

+++++ (> 1000 -fach)

Nd (nicht detektierbar = keine Expression)

Nach der Analyse der Transkriptionsfaktoren und anderer Gene in den vergrößerten peripheren Lymphknoten konnten hauptsächlich inhomogene Verteilungen der Expression der verschiedenen Gene festgestellt werden. Die wenigen Ausnahmen, bei denen alle LK ein ähnliches Expressionsmuster aufwiesen, waren *CIITA* (fast alle Proben mit leicht reduzierten Transkriptmengen) und *c-myc* (fast alle Proben mit leicht erhöhte Transkriptmengen). Dem Transkriptionsfaktor *CIITA* wird eine Schlüsselrolle in der Unterdrückung Th<sub>2</sub>-exprimierter Zytokine während der Entwicklung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Richtung der Th1-Linie zugeschrieben (Patel et al., 2004). Darüber hinaus wurde bei keinem der untersuchten Transkriptionsfaktoren eine starke Überexpression bzw. Herunterregulierung (ab 500-fach) festgestellt.



Da die Ergebnisse der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren und Gene in den nicht-klassifizierten Proben aus vergrößerten Lymphknoten recht unterschiedlich ausfiel, war es nicht möglich, eindeutige Kandidaten herauszufiltern, die in diesen Tumoren in stark überexprimierter oder herunterregulierter Weise auftraten.

### **3.6.3. Sind die entstandenen Tumoren monoklonal oder oligoklonal?**

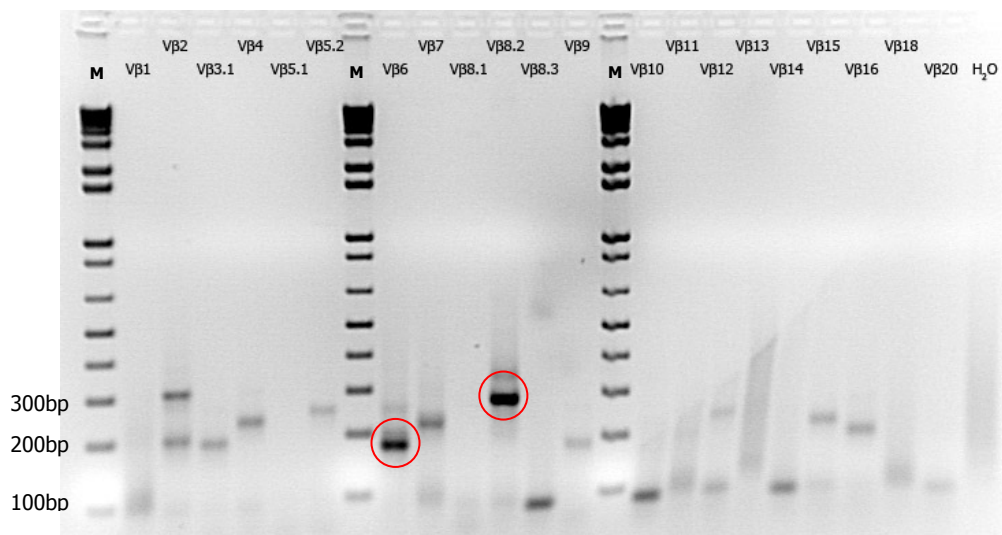
Tumoren können sowohl monoklonalen oder oligoklonalen Ursprungs sein. In oligoklonalen Tumoren gibt es mehrere Zellen, welche die Grenze zwischen Normalität und Malignität überschritten haben, um zu den Vorfahren mehrerer, genetisch verschiedener Subpopulationen zu werden. Die Tumormasse oligoklonaler Tumoren besteht also aus mehreren, genetisch unterschiedlichen Zellen. Monoklonale Tumoren sind im Prinzip aus einer Zelle entstanden. Diese Zelle ist in ihrem Wachstum unkontrolliert und zudem in der Lage alle Mechanismen zu umgehen, die zu ihrer eigenen Zerstörung führen würden. Obwohl diese Tumoren aus einer einzelnen Zelle entstanden, können sich diese im Laufe der Expansion des Tumors doch genetisch voneinander unterscheiden. Da T- und B-Zellen einen charakteristischen T-Zell- bzw. B-Zell-Rezeptor exprimieren, kann dieses Charakteristikum verwendet werden, um die Klonalität der Tumoren zu bestimmen. Falls nicht anders angegeben, wurden die Untersuchungen an Tumoren durchgeführt, die durch die Pathologie als LTZL oder DLBZL klassifiziert wurden.

#### **3.6.3.1. Klonalität der T-Zell Tumoren**

Mittels PCR sollten zunächst die klassifizierten T-Zell-Tumoren der DR4-P-Generation aus der Milz auf ihre Klonalität untersucht werden, um die Frage zu klären, ob die Mehrheit der Tumoren nur aus einer oder aus mehreren Zellen entstanden war. Dazu wurde eine T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Analyse der V $\beta$ -Ketten durchgeführt. Ist ein Tumor oligoklonal können nach spezifischer Amplifizierung und anschließender Sequenzierung mehrere funktionelle V $\beta$ -Ketten bestimmt werden. Ist ein Tumor dagegen monoklonal sollten nur spezifische

Amplifikate von einer V $\beta$ -Kette detektierbar sein. T-Zellen können unter Umständen auf einer Zelle zwei T-Zell-Rezeptoren (TZR) mit zwei funktionellen V $\alpha$ -Ketten, aber nur einer V $\beta$ -Kette ausbilden (Elliott et al., 1998). Dieses Phänomen kann bei bis zu 25-30% der T-Zellen auftreten (Corthay et al., 2001). Dies ist auf die allelische Exklusion der V $\beta$ -Ketten zurückzuführen. Sobald ein produktives Rearrangement in einem Allel erfolgt ist, wird das Rearrangement des zweiten Allels im Normalfall inhibiert. Dennoch wurden beim Menschen in weniger als 1% der peripheren Blutzellen T-Zellen mit zwei funktionellen V $\beta$ -Ketten beschrieben (Padovan et al., 1995). Wenn mehrere Zellen die gleichen V-Gene benutzen, weist jede einzelne von ihnen eine einzigartige Sequenz der CDR3-Region auf. Nach PCR und anschließender Sequenzierung kann dann diese entstandene inhomogene Sequenz nicht ausgelesen werden. Ist es jedoch möglich die Amplifikate zu sequenzieren, da sie aus einer homogenen Sequenz bestehen, so ist das ein Hinweis darauf, dass nur eine Zelle diese Rearrangements produziert hat. Werden also mehrere Ketten unterschiedlicher V $\beta$ -Familien spezifisch amplifiziert, die eine homogene Sequenz aufweisen, kann mit einer Sequenzüberprüfung theoretisch geklärt werden, ob diese funktionell sind. Bei dieser Überprüfung wird nach speziellen Motiven auf Proteinebene gesucht. Es kann allerdings sein, dass die V $\beta$ -Sequenz funktionell „aussieht“, da alle Motive vorhanden und keine „Stop-Codons“ enthalten sind, aber dennoch von der Zelle nicht als Oberflächenrezeptor verwendet wird. In diesem Fall kann nur eine FACS-Analyse Aufschluss darüber geben, ob diese an der Oberfläche exprimiert werden und somit funktionell sind. Bei Mäusen, die auf dem B16-Hintergrund basieren, gibt es 21 mögliche V $\beta$ -Familien/Unterfamilien. Die 5'- Primer wurden so ausgewählt, dass sie in dem Bereich der entsprechenden V-Gen-Familien/Unterfamilien spezifisch binden, wohingegen der 3'-Primer an seine Erkennungssequenz im 5'-Bereich der konstanten Region der  $\beta$ -Kette bindet (C-Region). Somit können nur rearrangierte TZR amplifiziert werden, da die Keimbahnsequenzen zu groß sind, um bei der Amplifikation Produkte zu generieren. Um die TZR-Analyse durchzuführen wurde zunächst die RNA von T-Zell-Tumoren aus der Milz gewonnen, in cDNA umgeschrieben und die TZR-Regionen

spezifisch amplifiziert. Die Größe der Amplifikate lag zwischen 188 und 265 bp. Die Tumorproben bestanden immer aus dem gesamten Gewebe, das bedeutet, es waren auch immer anteilig „kontaminierende“ normale Zellen enthalten.



**Abb. 43: TZR-Repertoire-Analyse der V $\beta$ -Ketten am Beispiel des T-Zell-Tumors No. 10:** V $\beta$ -Ketten 1-20, H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle (keine cDNA im Ansatz enthalten). M: 1kb Marker. Die rot umrandeten Kreise markieren PCR-Produkte, die im Gegensatz zu den anderen Amplifikaten sehr intensiv erscheinen und aller Wahrscheinlichkeit nach dominante V $\beta$ -Ketten darstellen.

Wie in Abb. 43 gut zu sehen ist, ergab die Analyse des T-Zell-Tumors No. 10 ein eingeschränktes TZR-Repertoire. Das bedeutet, dass viele aber nicht alle V $\beta$ -Ketten amplifiziert wurden. Auffällig sind außerdem die Amplifikate der V $\beta$ 6- und der V $\beta$ 8.2-Ketten (rote Kreise), da diese im Gegensatz zu allen anderen sehr intensiv hervortraten. Das sind vermutlich die Amplifikate der Tumorzellen. Alle Amplifikate zwischen 188 und 265 bp wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass tatsächlich nur die Amplifikate der V $\beta$ 6- und der V $\beta$ 8.2-Ketten aus einer lesbaren, homogenen Sequenz bestanden. Alle anderen Fragmente waren sehr inhomogen, woraus keine lesbaren Sequenzen resultierten. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um gesunde infiltrierende T-Zellen, die zwar Amplifikate generieren konnten, deren Inhomogenität aber ein Hinweis für Zellen eines nicht klonalen Ursprungs war. Mittels *in silico*-Analyse wurden die homogenen DNA-Sequenzen in Protein-Sequenzen übersetzt ([www.expasy.ch/tools/dna.html](http://www.expasy.ch/tools/dna.html)) und mit denen der IMGT-Datenbank (<http://imgt.cines.fr/>) verglichen. In dieser Datenbank sind alle

bekannten V-(„variable“), D- („diversity“) und J-(„joining“) Regionen der möglichen TZRs enthalten (Lefranc et al., 2001). Dies soll am Beispiel der V $\beta$ 6- und V $\beta$ 8.2-Ketten verdeutlicht werden:

### T-Zell-Tumor10: V $\beta$ 6/ D 1-1\*01 /J $\beta$ 1-1\*01 5'-3'

CT GTC ACT GTG ACA TCT GCC CAG AAG AAC GAG ATG GCC GTT TTT CTC TGT GCC AGC AGT ATG AGG CAC  
 V T V T S A Q K N E M A V F L C A S S M R H

ACA GAA GTC TTC TTT GGT AAA GGA ACC AGA CTC ACA GTT GTA GAG GAT CGT  
 T E V F F G K G T R L T V V E D R

**Legende:**, grau hinterlegt: V-Region mit einem Teil der CDR3 (A S S) – Region als blaue Box markiert, blau markierter Buchstabe C: konserviertes Cystein, 1 Aminosäure vor der CDR3-Box, türkis hinterlegt: D-Region (AGG), während der Umlagerung eingefügte N-Nukleotide: (N<sub>1</sub>= G, N<sub>2</sub>= C), gelb hinterlegt: J-Region, pink markiert: konserviertes Phe (F) - Gly (G) - X - Gly - Motiv, blaue Box: CDR3-Region: Länge 10 Aminosäuren; N<sub>1</sub>-VD-Umlagerung, N<sub>2</sub>-DJ-Umlagerung.

### T-Zell-Tumor10: V $\beta$ 8.2 / D - /J $\beta$ 1-6\*01 5'-3'

CAT TAT TCA TAT GGT GCT GGC AGC ACT GAG AAA GGA GAT ATC CCT GAT GGA TAC AAG GCC TCC AGA CCA  
 H Y S Y G A G S T E K G D I P D G Y K A S R P

AGC CAA GAG AAC TTC TCC CTC ATT CTG GAG TTG GCT ACC CCC TCT CAG ACA TCA GTG TAC TTC TGT GCC  
 S Q E N F S L I L E L A T P S Q T S V Y F C A

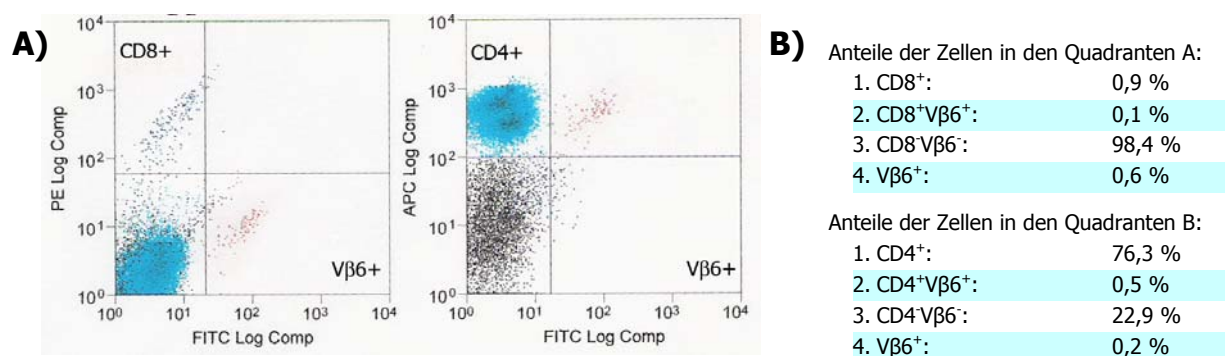
AGC GGT GAT GCG TCG GGA CAA AAT AAT TCG CCC CTC TAC TTT GCG GCA GGC ACC CGG CTC ACT GTG ACA  
 S G D A S G Q N N S P L Y F A A G T R L T V T

GAG GAT CGT  
 E D R

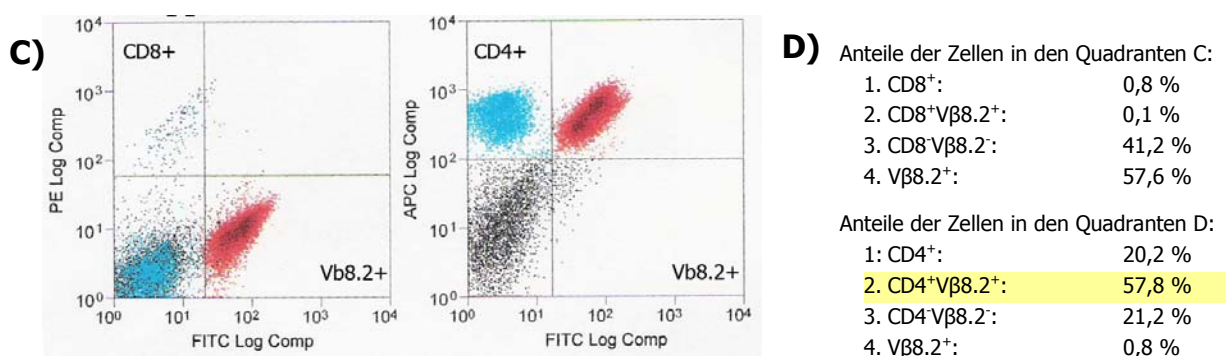
**Legende:**, grau hinterlegt: V-Region mit einem Teil der CDR3 (A S G D) – Region als blaue Box markiert, blau markierter Buchstabe C: konserviertes Cystein, 1 Aminosäure vor der CDR3-Box, türkis hinterlegt: D-Region (GGACA), eingefügte N-Nukleotide: (N<sub>1</sub>= CGTC, N<sub>2</sub>= AA) während der Umlagerung eingefügt, gelb hinterlegt: J-Region, pink markiert: konserviertes Phe (F) - Ala (A) - X - Gly (G) - Motiv, blaue Box: CDR3-Region: Länge 14 Aminosäuren; N<sub>1</sub>-VD-Umlagerung, N<sub>2</sub>-DJ-Umlagerung.

Beide Sequenzen (V $\beta$ 6 und V $\beta$ 8.2) wiesen alle charakteristischen Motive von TZR-V $\beta$ -Ketten auf. So besaßen beide am 3'-Ende der V-Region ein konserviertes Cystein (blaue Markierung), das zusammen mit dem konservierten Phe-Ala-X-Gly bzw. Phe-Gly-X-Gly-Motiv (pinkfarbene Markierung), in einem Abstand von 10-14 Aminosäuren die CDR3-Region (blaue Box) umfasst. Die so genannte N-Nukleotide (N<sub>1</sub> und N<sub>2</sub>) werden zufällig während des Rearrangements des TZR eingefügt. Anhand der N<sub>1</sub>DN<sub>2</sub>-Sequenzen kann der Verwandtschaftsgrad zwischen Zellen bestimmt werden. Je ähnlicher die N<sub>1</sub>DN<sub>2</sub>-Sequenzen zweier Umlagerungen sind, desto wahrscheinlicher ist, dass die Zellen miteinander verwandt

sind. Aus den Sequenzanalysen gingen beide V $\beta$ -Ketten als potentiell funktionell hervor. Dieser Tumor würde daher also entweder aus zwei monoklonalen T-Zell-Populationen (=biklonal, zwei T-Zellklone mit je einer V $\beta$ 6- oder V $\beta$ 8.2-Kette) bestehen oder aus einer monoklonalen Population, die zwei V $\beta$ -Ketten ausgebildet hatte. Die Zellen des T-Zell-Tumors (No. 10) aus der Milz wurden deshalb zusätzlich einer V $\beta$ -Ketten-spezifischen FACS-Analyse unterzogen, um zu klären, welcher der Fälle zutreffend sein könnte. Hierfür wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt, die spezifisch an die V $\beta$ 6- und V $\beta$ 8.2-Epitope binden sollten. Zusätzlich wurden die Zellen mit CD4- und CD8-Antikörpern gefärbt, um zu prüfen, ob es sich bei den Tumorzellen um CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen handelt. In den folgenden Dot Blots wurde das Ergebnis der FACS-Analyse zusammengefasst:



**Abb. 44: A) und B) Expressionsanalyse der V $\beta$ 6-Kette:** A) PE markiert Anti-CD8, APC markiert Anti-CD4, FITC markiert Anti-V $\beta$ 6. Die rote Population markiert die V $\beta$ 6-positiven Zellen. Die türkisfarbene Population markiert die CD4-positiven Zellen. B) Die Analyse der Zellen bezieht sich auf alle lebendigen Einzelzellen.



**Abb. 44: C) und D) Expressionsanalyse der V $\beta$ 8.2-Kette:** C) PE markiert Anti-CD8, APC markiert Anti-CD4, FITC markiert Anti-V $\beta$ 8.2. Die rote Population markiert die V $\beta$ 8.2-positiven Zellen. Die türkisfarbene Population markiert die CD4-positiven Zellen. D) Die gelb-hinterlegte Population markiert die Frequenz der CD4/V $\beta$ 8.2 doppelt positiven Zellen. Die Analyse der Zellen bezieht sich auf alle lebendigen Einzelzellen.

Wie in den Dot Blots 44A gut zu erkennen ist, wurde die V $\beta$ 6-Kette sowohl von CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in etwa 0,6% der Zellen exprimiert (türkisfarben hinterlegt). Die 0,1% der doppelt positiven V $\beta$ 6<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden vernachlässigt, da der Hauptanteil (0,5%) der V $\beta$ 6<sup>+</sup>-Zellen (rote Population, Dot Blot A) in der CD4-positiven Fraktion (türkisfarbene Population, Dot Blot A) zu finden war. Die 0,5% der doppelt positiven V $\beta$ 6<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (rote Population, Dot Blot A) könnte einerseits eine sehr kleine monoklonale Population darstellen, die in einem sehr frühen Stadium der Tumor-Zellproliferation detektiert wurde und daher noch keine Zeit hatte zu einer größeren Zellzahl zu expandieren. Die V $\beta$ 8.2-Kette hingegen (Dot Blot C, rot markierte Population) konnte auf 57,8% der lebendigen Einzelzellen detektiert (gelb hinterlegt Abb. 44D) werden. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass diese V $\beta$ 8.2-positiven Zellen eine monoklonale T-Zell-Population darstellte. Zudem ist deutlich zu erkennen, dass die V $\beta$ 6- und die V $\beta$ 8.2-Kette nur von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert wurde. Dadurch wurde vermutet, dass der Tumor aus einer vorherrschenden monoklonalen CD4<sup>+</sup>-Population bestand, die zwei TZR mit je einer V $\beta$ -Kette ausgebildet hatte. Dass die Transkriptmengen der beiden V $\beta$ -Ketten relativ ähnlich waren (Abb. 43), aber scheinbar nur ein TZR an der Oberfläche der meisten Tumorzellen präsentiert wurde, sprach daher für nur einen funktionellen TZR auf diesen T-Zellen. Alternativ könnten diese Ergebnisse auch auf zwei monoklonalen Populationen mit unterschiedlichen Anzahlen (0,5% vs. 57,8%) an Tumorzellen deuten, die ca. 75% (58,3 von 77,8%) der gesamten CD4<sup>+</sup>-Population ausmachten. In solchen Fällen wurden die Tumoren als monoklonal/biklonal festgelegt, da die Ergebnisse keine genauere Definition zuließen. Die niedrige Frequenz der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen war charakteristisch für alle Mäuse, die einen CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Tumor entwickelt hatten. Zumal die erhöhte Frequenz der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die in jungen „gesunden“ Mäusen detektiert wurde, durch die Expansion der malignen Population das Verhältnis zwischen CD4/CD8 Zellen in Richtung der CD4<sup>+</sup>-Zellen noch einmal zusätzlich verstärkte. Konnte in der Analyse mehrerer Tumoren, nach der TZR-spezifischen PCR nur eine homogene V $\beta$ -Kette detektiert werden, so wurde der Tumor als monoklonal bestimmt.

Wurden mehrere homogene V $\beta$ -Ketten detektiert, dann wurden diese zusätzlich einer FACS-Analyse unterzogen. Die Analyse der Klonalität der weiteren untersuchten T-Zell-Tumoren aus der Milz wurde in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

**Tab. 16: Klonalität der untersuchten T-Zell-Tumoren**

DR4-P T-Zell-Tumor	Ergebnis nach PCR		Ergebnis nach FACS-Analyse	Gesamtergebnis
	V $\beta$ -Ketten	J-Ketten	Phänotyp des Tumors (jeweils nur eine Population)	Klonalität
<b>No. 8</b>	V $\beta$ 7 V $\beta$ 10	J1.5 J1.2	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Monoklonal/Biklonal
<b>No. 10</b>	V $\beta$ 8.2 V $\beta$ 6	J1.6 J1.2	CD4 <sup>+</sup>	Monoklonal/Biklonal
<b>No. 16</b>	V $\beta$ 6	J1.3	CD4 <sup>dim</sup>	Monoklonal
<b>No. 41</b>	V $\beta$ 3.1	J1.3	CD4 <sup>+</sup>	Monoklonal
<b>No. 52</b>	V $\beta$ 7	J2.6	CD4 <sup>+</sup>	Monoklonal
<b>No. 53</b>	V $\beta$ 3.1 V $\beta$ 11	J2.3 J2.5	CD4 <sup>+</sup>	Monoklonal/Biklonal
<b>No. 72</b>	V $\beta$ 2	J1.6	CD4 <sup>+</sup>	Monoklonal
<b>No. 97</b>	V $\beta$ 10	J2.6	CD4 <sup>+</sup>	Monoklonal
<b>No. 101</b>	V $\beta$ 4 V $\beta$ 7	J2.6 J2.2	CD4 <sup>+</sup>	Monoklonal/Biklonal
<b>No. 106</b>	V $\beta$ 14	J1.1	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Monoklonal
<b>No. 108</b>	V $\beta$ 11	J2.3	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Monoklonal
<b>No. 130</b>	V $\beta$ 6 V $\beta$ 11	J2.4 J2.6	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Monoklonal/Biklonal

*Monoklonal – nach PCR und Sequenzierung nur eine homogene Sequenz. Monoklonal/biklonal – nach PCR und Sequenzierung zwei homogene Sequenzen, die auch durch die FACS-Analyse nicht eindeutig als monoklonal oder biklonal definierbar war.*

Von den 12 analysierten Tumoren konnten nach PCR und Sequenzierung sieben (gelb hinterlegt) als eindeutig monoklonal bestimmt werden (58,3%). Fünf der T-Zell-Tumoren zeigten zwei homogene V $\beta$ -Ketten (41,6%) und wurden als monoklonal/biklonal bestimmt, da sie nicht genauer definiert werden konnten. Mehr als zwei homogene V $\beta$ -Ketten konnten bei keinem der untersuchten Tumoren festgestellt werden. Insgesamt bestanden die Tumoren also aus maximal zwei verschiedenen Populationen des gleichen T-Zell-Subtyps. Besonders auffällig bei der Untersuchung war: Fast alle T-Zell-Tumoren waren CD4<sup>+</sup>. So zeigten 8 (66,6%) einen CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-Phänotyp (orangefarben hinterlegt). Bei vier

Tumoren konnte ein  $CD4^+CD8^+$ -Phänotyp (33%) festgestellt werden, von denen je zwei  $CD3^+$  (No. 8, No. 130) bzw.  $CD3^-$  (No. 106, No. 108) waren. Bei diesen  $CD4^+/CD8^+$  doppelt positiven Zellen handelt es sich um frühe, unreife T-Zellen. Der Ursprung der Tumoren liegt also hauptsächlich in der  $CD4^+$ -T-Zell-Population, wobei die Tumoren auch schon in einem frühen unreifen Stadium dieser T-Zellen entstehen können. Trifft die Verteilung der  $CD4^+$ -Populationen auf alle T-Zell-Tumoren aus der DR4-P-Generation zu? Um diese Frage zu klären, wurden die bereits von Dr. J. Mysliwicz per FACS klassifizierten T-Zell-Tumoren ebenfalls statistisch ausgewertet.

**Tab. 17: Verteilung der T-Zell-Populationen in DR4-P-T-Zell-Tumoren nach FACS-Analyse**

Anzahl der untersuchten Tumoren	$CD4^+CD8^-CD3^+$	$CD4^-CD8^+CD3^+$	$CD4^+CD8^+CD3^+$ $CD4^+CD8^+CD3^-$	$CD4^-CD8^-CD3^+$
28	18 (64,3%)	2 (7,1%)	7 (25%)	1 (3,6%)

Von 33 klassifizierten Tumoren wurden 28 per FACS untersucht. Diese Analyse ergab, dass tatsächlich 64,3% der Tumoren aus einer  $CD4^+CD8^-CD3^+$ -Zellpopulation bestanden. Nur bei zwei Tumoren konnte eine massiv erhöhte  $CD8^+CD4^-CD3^+$ -Fraktion festgestellt werden. Die Frequenz der doppelt positiven  $CD4^+CD8^+$  frühen, unreifen T-Zellen lag bei 25%, wohingegen die doppelt negativen  $CD4^-CD8^-$ -T-Zellen bei nur einem Fall detektierbar waren (3,6%).

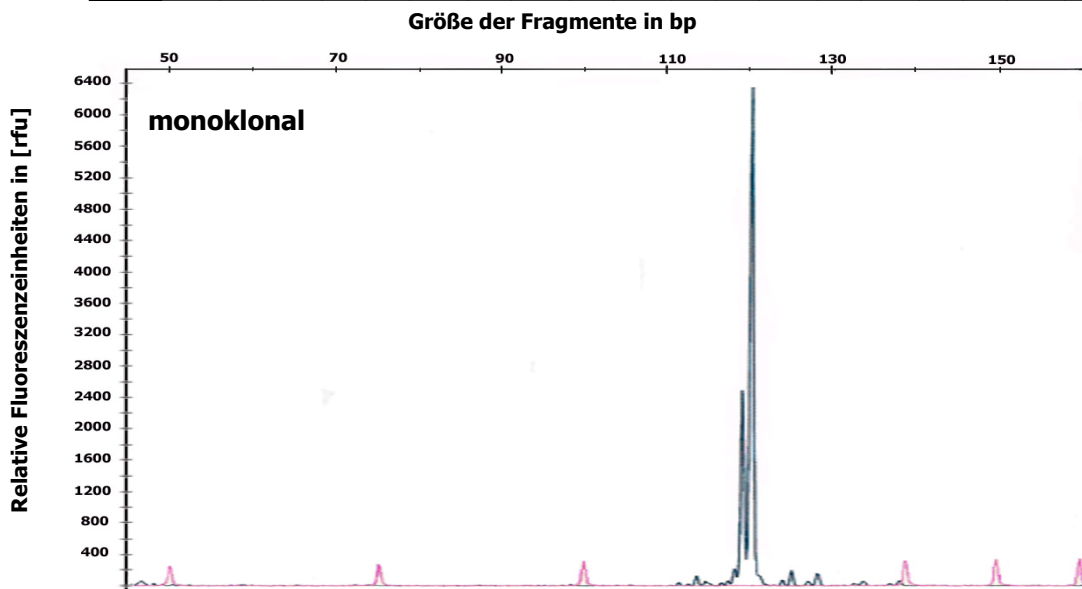
### 3.6.3.2. Klonalität der B-Zell-Tumoren

Auch bei den klassifizierten B-Zell-Tumoren der DR4-P-Generation sollte geklärt werden, ob diese nur aus einer oder mehreren Zellen entstanden waren. Zusätzlich wurden Untersuchungen bei nicht klassifizierten Tumoren vorgenommen. Ähnlich wie beim TZR kann bei B-Zellen aufgrund der Umlagerung der schweren Immunglobulin-Ketten (IgH) untersucht werden, ob die Tumoren monoklonal sind. Dies wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen



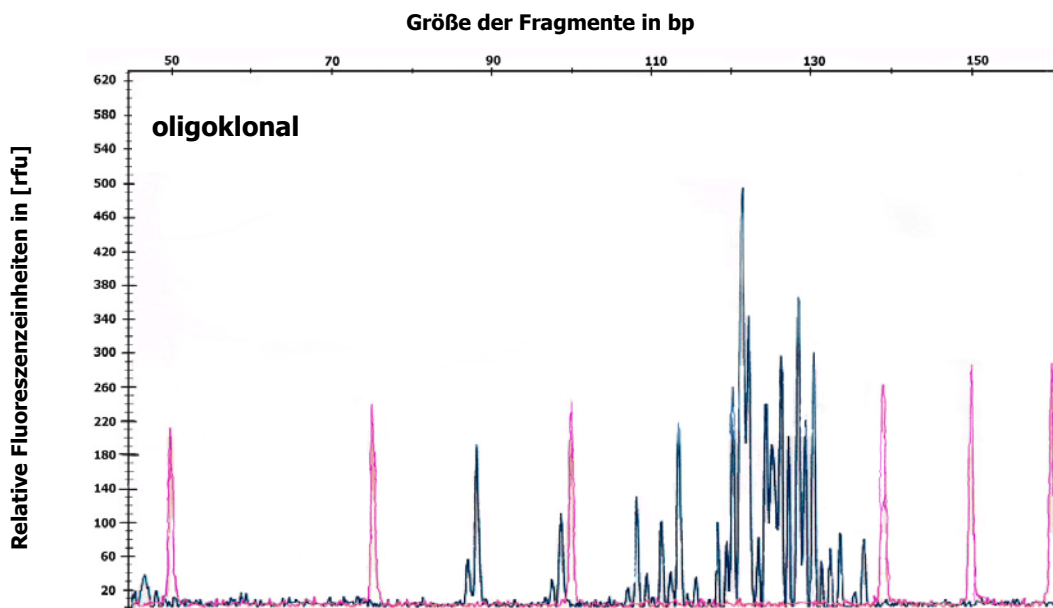
durchgeführt. Zunächst wurde mittels Fragmentanalyse die DNA nicht-klassifizierter Tumoren aus Lymphknoten und Milz der DR4-P-Generation untersucht, da von den klassifizierten B-Zell-Tumoren sehr wenig Material zur Verfügung stand. Diese wurden zusätzlich mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung untersucht.

Die Fragmentanalyse beruht auf dem Prinzip der Messung von der relativen Fluoreszenzintensität und der Anzahl spezifisch amplifizierter Produkte. Die Länge bzw. Größe der Produkte kann anhand eines Standards bis auf eine Base genau ausgelesen werden. Die Fluoreszenzintensität, die in relativen Fluoreszenzeinheiten [rfu] gemessen wird, gibt Aufschluss über die Quantität der amplifizierten Kopien. Der Fragmentanalyse ging eine PCR mit spezifischen Primern für die Amplifikation der IgH-Bereiche der V-Region aus DNA voraus. Der 5'-Primer (Sense-Primer) band im invariablen 5'-Bereich der V-Region und der 3'-Primer (Antisense-Primer) in der D-Region (DSF-Primer). Der Antisense-Primer war am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM gekoppelt. Die Größe der spezifisch amplifizierten Produkte lag zwischen 90 und 140 bp (Kawamoto et al., 2000). Die Amplifikate wurden anschließend verdünnt und mit einem speziellen Mix angesetzt, der unter anderem einen Längenstandard beinhaltet. Für die Unterscheidung zwischen monoklonalen und oligoklonalen Tumoren wurden zwei Kontrollen verwendet. Als Positivkontrolle diente die DNA eines DLBZL, die bereits mittels Southern Blot als monoklonal bestätigt worden war. Eine Mischung aus mehreren Tumorgeweben wurde als oligoklonale Kontrolle benutzt. Zusätzlich wurden als Kontrollen DNA aus Milz und Lymphknoten gesunder B16-Mäuse mitgeführt, um die oligoklonalen Tumoren von polyklonalen normalen gesunden B-Zellen zu unterscheiden. Die mit dem „Genetic Analyzer“ (ABI Prism 3730 Applied) und der „GeneMapper“ v3.5 – Software analysierten Elektropherogramme sollen anhand der zwei verwendeten klonalen Kontrollen als Beispiel dienen.



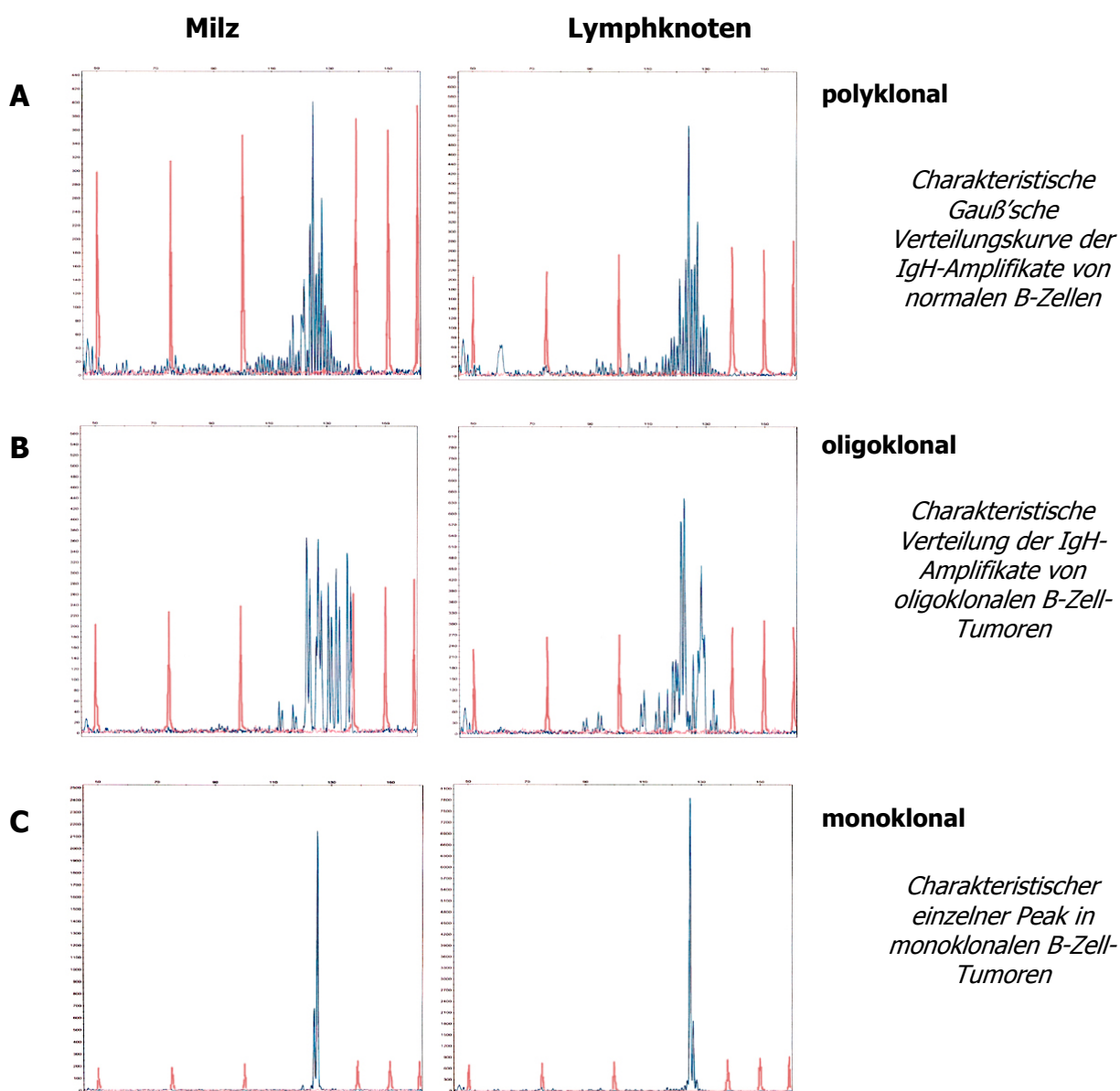
**Abb. 45: Fragmentanalyse der monoklonalen Kontrolle.** Rosafarbene Peaks: Standard von links nach rechts: 50 bp, 75 bp, 100 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp. Rfu; relative Fluoreszenzeinheiten.

In der Abb. 45 ist das Elektropherogramm der Positivkontrolle eines monoklonalen DLBZL abgebildet. Wie man deutlich erkennen kann, gibt es einen dominanten blauen Peak mit einer Fluoreszenzintensität von über 6000 rfu, der bei einer Größe von 121 bp liegt. Dieser stellt eine monoklonale Umlagerung der IgH-Kette des Tumors dar. Die blaue Farbe des Peaks kommt durch die Fluoreszenz 6-FAM zustande. Die rosafarbenen Peaks mit einer Fluoreszenzintensität bis zu 300 rfu zeigen den Größenstandard.



**Abb. 46: Fragmentanalyse der oligoklonalen Kontrolle.** rosafarbene Peaks: Standard von links nach rechts: 50 bp, 75 bp, 100 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp. Rfu; relative Fluoreszenzeinheiten.

Das Elektropherogramm der oligoklonalen Tumor-Kontrolle ist in Abb. 46 zu sehen. Es sind mehrere blaue Peaks zwischen 110 und 140 bp zu erkennen, die eine Fluoreszenzintensität zwischen 200-500 rfu aufwiesen. Das bedeutet, es wurden zwar mehrere Produkte amplifiziert, diese sind aber weniger oft amplifiziert worden, was für kleinere Populationen spricht. Im Folgenden werden exemplarisch für die Ergebnisse einige Beispiele von gesunden polyklonalen B-Zellen einer Bl6-Kontrollmaus sowie von mono- und oligoklonalen Tumoren in Milz und Lymphknoten von DR4-P-Mäusen gezeigt.



**Abb. 47: Ergebnisse der Fragmentanalyse anhand einiger Beispiele.** A) Fragmente gesunder B-Zellen aus Milz und Lymphknoten einer Bl6-Maus. B) Fragmente oligoklonaler Tumoren aus Milz und Lymphknoten nicht-klassifizierter Tumoren aus DR4-P-Mäusen. C) Fragmente monoklonaler Tumoren aus Milz und Lymphknoten nicht-klassifizierter Tumoren aus DR4-P-Mäusen

Die Ergebnisse der Fragmentanalyse der nicht-klassifizierten Tumoren aus der DR4-P-Generation wurden in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

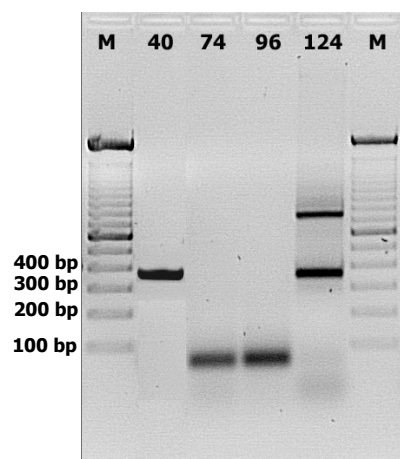
**Tab. 18: Monoklonalität versus Oligoklonalität nicht-klassifizierter Tumoren von DR4-P-Mäusen**

Anzahl der untersuchten DR4-P-Mäuse	Monoklonale Tumoren Anzahl [%]	Oligoklonale Tumoren Anzahl [%]
<b>LK: 11</b>	<b>6 [54,5%]</b>	<b>5 [45,5%]</b>
<b>Milz: 7</b>	<b>4 [57,1%]</b>	<b>3 [42,9%]</b>
<b>Gesamt: 18</b>	<b>10 [55,6%]</b>	<b>8 [44,4%]</b>

Die Fragmentanalyse ergab, dass über die Hälfte, also 55,6% der untersuchten Tumoren monoklonal und 44,4% der Tumoren oligoklonal waren.

Mittels PCR wurden zusätzlich noch einige, der durch Pathologie klassifizierten B-Zell-Tumoren, auf ihre Klonalität hin untersucht. Dafür musste zunächst die RNA aus dem Tumormaterial von vier DR4-P-Mäusen aus der Milz isoliert werden. Diese wurde anschließend in cDNA revers transkribiert. Der Grund hierfür war, dass die verwendeten Primer auf cDNA-Ebene eine größere Spezifität aufwiesen. Ein weiterer Vorteil dieser Primer (Kutemeier et al., 1992) gegenüber den Primern aus der Fragmentanalyse war, dass sie größere Produkte amplifizierten (340-380 bp). Mit diesen Primern werden alle CDR („complementary determining region“)-Bereiche der V-Region vollständig amplifiziert. Der 5'-Primer hatte seine Erkennungssequenz im invariablen Bereich der V-Region, wohingegen der 3'-Primer in der Lage war an alle J-Ketten ( $J_{1-4}$ ) zu binden. Somit konnte nach der Sequenzierung bestimmt werden, ob die Tumoren aus Keimzentrums-B-Zellen entstanden sind. Nur in den Keimzentren der Milz und den Lymphknoten läuft die so genannte somatische Hypermutation ab. Während der somatischen Hypermutation werden Nukleotide inner- oder außerhalb des Leserahmens („in frame“ o. „out of frame“ Mutationen)

hauptsächlich im hypervariablen Bereich der CDR3-Region, meistens in Form von Punktmutationen deletiert oder integriert. Dies hat im besten Fall zur Folge, dass die Bindungsaffinität des B-Zell-Rezeptors ansteigt („affinity maturation“). Es kann aber auch dazu führen, dass diese Mutationen zu nicht funktionellen IgH-Ketten führen und die normalen B-Zellen deshalb absterben. Das Ergebnis der IgH-PCR ist in der folgenden Abbildung dargestellt:



**Abb. 48: PCR – Amplifikation der IgH-Region von klassifizierten DLBZL aus vier DR4-P-Mäusen**

*M: 1 kb Marker; 40-DLBZL; 74-DLBZL, 96-DLBZL; 124-DLBZL. Die Proben No. 40 und No. 124 zeigten Amplifikation der zu erwartenden Größe zwischen 340 und 380 bp. Die Amplifikate der Proben No. 74 und No. 96 liegen unter 100 bp und sind demnach wahrscheinlich Primer-Dimere*

Wie in der Abb. 48 zu sehen ist, zeigten nur die Proben der DR4-P-Mäuse No. 40 und No. 124 Amplifikate in der zu erwartenden Größe. Zudem wurde bei der Probe No. 124 noch ein größeres Produkt unbekanntes Ursprungs amplifiziert. Auch hier bestanden die Tumorproben nicht aus einer reinen Tumorzellpopulation, sondern aus einer Mischpopulation der gesamten Milz. Die Tumorproben der Mäuse No. 74 und No. 96 zeigten keine Amplifikate von IgH Umlagerungen. Die VDJ-Region der Keimbahn kann nicht amplifiziert werden, da sie schlichtweg zu groß ist. Dies sprach in den Proben No. 74 und No. 96 für Tumoren aus frühen, unreifen Pro-B-Zellen, da die VDJ-Umlagerung in diesem Stadium noch nicht stattgefunden hat. Die Amplifikate der Proben No. 40 und No. 124 wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass nur das Amplifikat der Tumor-Probe No. 40 homogen und deshalb gut lesbar war. Die Probe No. 124 bestand aus einer Mischsequenz, die sich als nicht lesbar herausstellte. Somit konnte bestimmt werden, dass der Tumor No. 40 aus einer monoklonalen Population besteht, wohingegen der Tumor No.

124 aus einer oligoklonalen Population entstanden ist. Die exakte Bestimmung der VDJ-Regionen der Probe No. 40 wurde mittels Sequenzvergleich mit der IMGT-Datenbank erreicht. Zusätzlich wurde diese Sequenz unter Zuhilfenahme der IMGT/V-QUEST-Software (Giudicelli et al., 2004) mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen verglichen, um zu prüfen, ob somatische Hypermutationen aufgetreten waren (<http://imgt.cines.fr/>).

### B-Zell-Tumor No. 40 - IgHV2-3/ D - FL16.1/ J<sub>H</sub>3\*01 5'-3'

```

AG GTG CAG CTG CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTG GTG GCG CCC TCA CAG AGC CTG TCC ATC ACA TGC ACT
  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  A  P  S  Q  S  L  S  I  T  C  T
GTC TCA GGG TTC TCA TTA ACC AGC TAT GGT GTA AGC TGG GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG
  V  S  G  F  S  L  T  S  Y  G  V  S  W  V  R  Q  P  P  G  K  G  L  E
TGG CTG GGA GTA ATA TGG GGT GAC GGG AGC ACA AAT TAT CAT TCA GCT CTC ATA TCC AGA CTG AGC ATC
  W  L  G  V  I  W  G  D  G  S  T  N  Y  H  S  A  L  I  S  R  L  S  I
AGC AAG GAT AAC TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTA AAA CTG AAC AGT CTG CAA ACT GAT GAC ACA GCC ACG
  S  K  D  N  S  K  S  Q  V  F  L  K  L  N  S  L  Q  T  D  D  T  A  T
TAC TAC TGT GCC AAA TTT ATT ACT TCC ACG GGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC
  Y  Y  C  A  K  F  I  T  S  T  G  F  A  Y  W  G  Q  G  T  T  V  T  V
TCC TCA
  S  S

```

#### Legende:

V-Region (grau hinterlegt) mit CDR1 (G F S L T S Y G), CDR2 (I W G D G S T) und einem Teil des CDR3 (AK)-Bereichs (rot markiert). D-Region (F I T) (grün hinterlegt), J-Region (gelb hinterlegt) mit Trp (W) – Gly (G) – Gln (Q) – Gly (G) - Motiv (rosa markiert); eingefügte N-Nukleotide (N<sub>2</sub>DJ - TCC ACG G) während der VDJ-Umlagerung; Länge der CDR3-Region 11 Aminosäuren (blaue Box); Gesamtlänge: 116 Aminosäuren

Von vier untersuchten Tumorproben konnte nur bei jeweils einer Probe mit Bestimmtheit festgelegt werden, dass es sich hierbei um einen monoklonalen (No. 40) bzw. oligoklonalen (No. 124) Tumor handelte. In der monoklonalen IgH-Umlagerung des Tumors No. 40 gab es keine Hinweise auf eine somatische Hypermutation. Die beiden anderen untersuchten Proben (No. 74 und No. 96) konnten nicht anhand der VDJ-Umlagerung als mono- oder oligoklonal eingestuft werden, da diese vermutlich aus einem Tumor von frühen Pro-B-Zellen bestehen. Um zu untersuchen, in welches Stadium der B-Zell-Entwicklung die anderen klassifizierten B-

Zell-Tumoren einzustufen sind, wurden diese anhand vorangegangener FACS-Untersuchungen in einer Tabelle zusammengefasst:

**Tab. 19: Entwicklungsstufen der B-Zell-Tumoren aus der DR4-P-Generation**

Anzahl der analysierten B-Zell-Tumoren	Tumor aus unreifen B-Zellen [%]*1	Tumor aus reifen B-Zellen [%]*2	Tumor – unbestimmbar [%]
16	4 [25%]	6 [37,5%]	6 [37,5%]

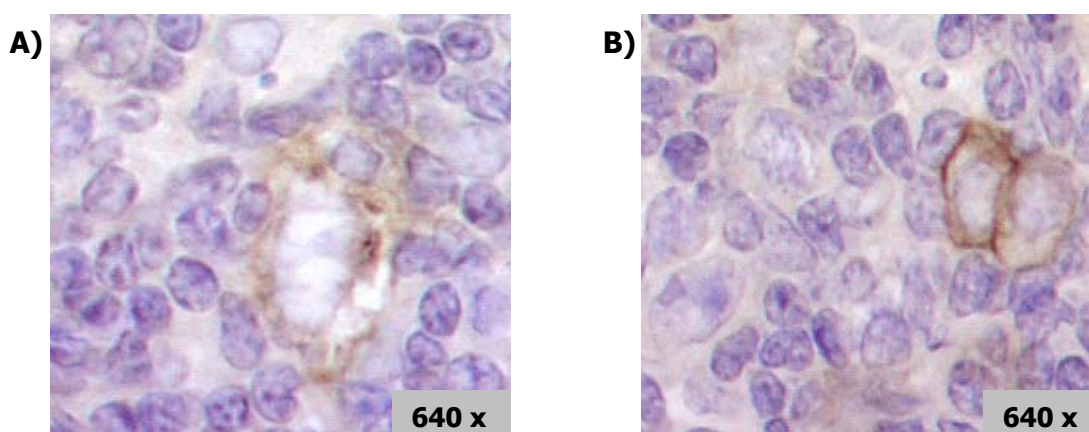
\*1 - Unreife B-Zellen ( $IgM^+$   $IgD^-$ ), \*2- Reife B-Zellen ( $IgM^+$ ,  $IgD^+$ )

Von den 16 per FACS phänotypisch untersuchten Tumoren, die immunhistologisch als B-Zell-Tumoren klassifiziert wurden, zeigten vier Tumoren (25%) einen unreifen expandierten B-Zell-Phänotyp ( $IgM^+$   $IgD^-$ ), während sechs Tumoren (37,5%) einen reifen B-Zell-Phänotyp ( $IgM^+$   $IgD^+$ ) aufwiesen, der expandiert war. Die übrigen sechs Tumoren (37,5%) konnten entweder aufgrund fehlender Marker oder unkonventioneller Phänotypen in der FACS-Analyse nicht eindeutig als unreife oder reife B-Zellen bestimmt werden. So kam es zum Beispiel vor, dass manche Zellen sowohl Marker für NK-Zellen als auch Marker für B-Zellen exprimierten und diese Populationen deshalb nicht eindeutig als B-Zellen definiert werden konnten. Zudem zeigte diese Untersuchung, dass die beiden Tumor-Proben No. 74 und No. 96 tatsächlich einen unreifen expandierten B-Zell-Phänotyp ( $IgM^+$   $IgD^-$ ) aufwiesen.

### 3.7. Hodgkin Lymphome in der DR4-P-Maus

In einigen der entstandenen Tumoren der DR4-P-Generation wurden Zellen in den Gewebeschnitte aus Lymphknoten und Milz gefunden, die nach morphologischer Untersuchung große Ähnlichkeit mit den aus dem humanen System bekannten Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen (H/RS) aufwiesen. Ähnlich wie beim Menschen traten diese z. T. riesigen H/RS-ähnlichen Zellen in einer sehr niedrigen Frequenz auf. So konnten pro Gewebeschnitt maximal 10 dieser Zellen gezählt werden. Für die Bestätigung, dass es sich bei diesen Zellen tatsächlich um H/RS-Zellen handelte wurden die Gewebeschnitte zunächst

immunhistologisch untersucht. Es ist bekannt, dass das CD30-Oberflächenprotein, das zu der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie gehört, im humanen System sehr stark von den H/RS-Zellen exprimiert wird (Irsch et al., 1998). Nachdem ein CD30-Antikörper auch gegen das Maus-Protein erhältlich war, wurden alle morphologisch auffälligen Hodgkin Lymphom (HL)-ähnlichen Fälle mit diesem CD30-Antikörper gefärbt. In Formalin fixierte, periphere Lymphknoten und Milzen, die in Paraffin eingebettet waren, wurden in 2-3 µm dicke Scheiben geschnitten und mit dem CD30-Antikörper aus dem Hamster angefärbt. Als Sekundär-Antikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter Kaninchen Anti-Hamster Antikörper.



**Abb. 49: Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten HL-ähnlicher Tumoren aus der DR4-P-Generation.** Die Gewebeschnitte wurden mit einem Hamster anti-Maus-CD30-Antikörper und einem Peroxidase markierten Kaninchen Anti-Hamster-Antikörper gefärbt. **A)** und **B)** riesige CD30<sup>+</sup>- H/RS-ähnliche Zellen (braun umrandet), die hauptsächlich von Histozyten (Gewebsmakrophagen) und großen aktivierten T- und B-Zellen umrandet sind. A) typische Spiegelei-Form einer H/RS-Zelle. B) Typische Eulenaugen-Form von einer mehrkernigen H/RS-Zelle. Die Aufnahmen erfolgten mit einer 640-fachen Vergrößerung.

Wie in Abb. 49 gut zu erkennen ist, waren die H/RS-Zellen braun umrandet, was mit der Expression von CD30 auf der Membran übereinstimmte. Umgeben waren diese Tumorzellen hauptsächlich von Histozyten (Gewebsmakrophagen), großen und deshalb aktivierten T- und B-Lymphozyten und eosinophilen Zellen. Diese „Nachbarschaft“ der H/RS-Zellen wurde bereits sehr früh bei der Pathogenese des Hodgkin Lymphoms beschrieben (Pinto et al., 1997). Bei allen acht morphologisch bestimmten HL-ähnlichen Fällen konnten CD30<sup>+</sup>- H/RS-Zellen gefunden werden.



### 3.7.1. Klonalität der begleitenden Tumoren von Mäusen mit diagnostiziertem Hodgkin Lymphom

Wie die immunhistochemischen Untersuchungen der Pathologie ergaben, bestehen zudem fünf dieser acht HL-Fälle aus weiteren, begleitenden Tumoren, die als Lymphoblastoide Lymphome (LL) diagnostiziert wurden. Dies ist nicht ungewöhnlich, da dies auch schon im humanen System beobachtet worden ist (Al Saati et al., 1997). Da die Konstitution der Tumorproben in Bezug auf die begleitenden diagnostizierten Tumoren stark variierte und um eventuell zwischen reaktiven infiltrierenden Zellen und Tumorzellen unterscheiden zu können, wurden die Diagnosen der Pathologie für alle HL-Fälle mit Begleit-Tumoren zur Verdeutlichung in einer Tabelle zusammengefasst:

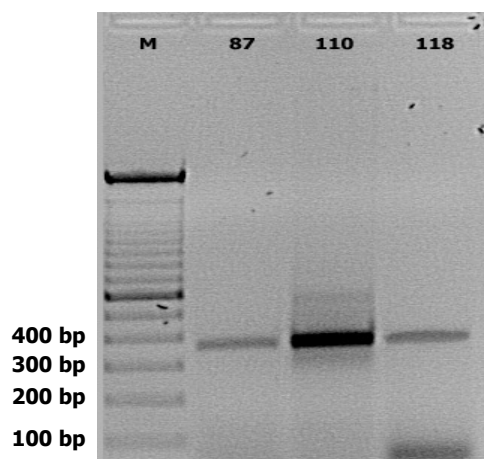
**Tab. 20: Diagnose der HL-Tumorproben durch die Pathologie aus der Milz von DR4-P-Mäusen**

HL-Mäuse mit Begleit-Tumoren	H/RS-Zellen enthalten in	Anzahl der Tumoren	Begleitender T-Zell-Tumor	Begleitender B-Zell-Tumor	Anteil von T-Zellen
No. 87	DLBZL-HA (B220 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD79a <sup>+</sup> )	2	-	SMZL (B220 <sup>-</sup> /CD79a <sup>+</sup> )	13%
No. 89	DLBZL-HA (B220 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD79a <sup>+</sup> )	2	LTZL (CD3 <sup>+</sup> /B220 <sup>-</sup> /S100 <sup>-</sup> )	-	54%
No. 99	Histiozyten-Tumor? (fehlende spezifische Färbung)	3	LTZL (CD3 <sup>+</sup> /B220 <sup>-</sup> /S100 <sup>-</sup> )	DLBZL-HA (B220 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD79a <sup>+</sup> )	27%
No. 110	DLBZL-HA (B220 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD79a <sup>+</sup> )	2	LTZL (CD3 <sup>+</sup> /B220 <sup>-</sup> /S100 <sup>-</sup> )	-	30%
No. 115	DLBZL-HA (B220 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD79a <sup>+</sup> )	2	LTZL (CD3 <sup>+</sup> /B220 <sup>-</sup> /S100 <sup>-</sup> )	-	38%
No. 118	DLBZL-HA (B220 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD79a <sup>+</sup> )	2	LTZL (CD3 <sup>+</sup> /B220 <sup>-</sup> /S100 <sup>-</sup> )	-	85%

Die Einteilung der Tumoren wurde nach den Bethesda Proposals durchgeführt. DLBZL-HA: histiozytenreiches diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; LTZL: Lymphoblastoides T-Zell-Lymphom; SMZL: Marginalzonen-Lymphom.

Es wurden zunächst die Umlagerungen der IgH-Ketten und des  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors untersucht, um zu prüfen, um welche Art von Tumoren es sich hierbei handelte und ob diese

zudem monoklonal oder oligoklonal sind. Von drei HL-ähnlichen Tumoren (No. 87, No. 110 und No. 118) wurde deshalb die RNA aus dem Tumormischgewebe der Milz isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine PCR mit den gleichen spezifischen Primern wie in 3.6.3.2. durchgeführt, um die umgelagerten IgH-Ketten zu amplifizieren. Zudem sollte geklärt werden, ob die amplifizierten Produkte Hinweise auf somatische Hypermutationen geben konnten.



**Abb. 49: IgH-Umlagerungen in HL-ähnlichen Tumoren**  
M: 1kb Marker, 87 – HL; 110 – HL, 118 – HL. Alle Proben zeigten Amplifikate in der erwarteten Größe zwischen 340 und 380 bp.

In Abb. 49 ist deutlich zu erkennen, dass alle HL-Tumorproben Fragmente in der zu erwartenden Größe produziert hatten. Diese wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Das ergab, dass die IgH-Umlagerungen der Proben No. 87 und No. 118 monoklonal (66,6%) waren, wohingegen die intensive, aber „verschmierte“ Bande der Probe No. 110 aus einer oligoklonalen (33,3%) Population bestand. Die sich ergebenden homogenen Sequenzen wurden wiederum mit der IMGT-Datenbank verglichen (Lefranc et al., 2001):

**87-HL: IgH V<sub>H</sub> 14-2\*01/D 2-1\*01/J<sub>H</sub> 1\*01**

AG GAG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AAG CCA GGG GCC TCA GTC AAG TTG TCC  
 E Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S

TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG ACT GAA  
 C T A S G F N I K D Y Y M H W V K Q R T E

CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GAG GAT GGT GAA ACT AAA TAT GCC CAG AAA  
 Q G L E W G R I D P E D G E T K Y A Q K F

TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATA ACA GCA GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC  
 Q G K A T I T A I D T S S N T A Y L Q L S

AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT GCC ATA TAT GGT AAC TAC TGG TAC TTC  
 S L T S E D T A V Y Y C A I Y G N Y W Y F

GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GCC TCC TCA  
 D V W G Q G T T V T A S S

**Legende:**

V-Region (grau hinterlegt) mit CDR1 (G F N I K D Y Y), CDR2 (I D P E D G E T) und einem Teil des CDR3 (A I) - Bereichs (rot markiert). D-Region (Y G N Y) (grün hinterlegt), J-Region (gelb hinterlegt) mit Trp (W) - Gly (G) - Gln (Q) - Gly (G) - Motiv (rosafarben markiert); eingefügte P-Nukleotide (VD - C ATA; Länge der CDR3-Region: 11 Aminosäuren (blaue Box); Gesamtlänge: 117 Aminosäuren

**118-HL: IgH V<sub>H</sub> 1-64\*01/D 1-1\*01/J<sub>H</sub> 1-7\*01**

AG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG TTG GTA AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG TTG TCC  
 V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S

TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACT TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA  
 C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G

CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGA ATG ATT CAT CCT AAT AGT GGT AGT ACT AAC TAC AAT GAG AAG  
 Q G L E W I G M I H P N S G S T N Y N E K

TTC AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC  
 F K S K A T L T V D K S S S T A Y M Q L S

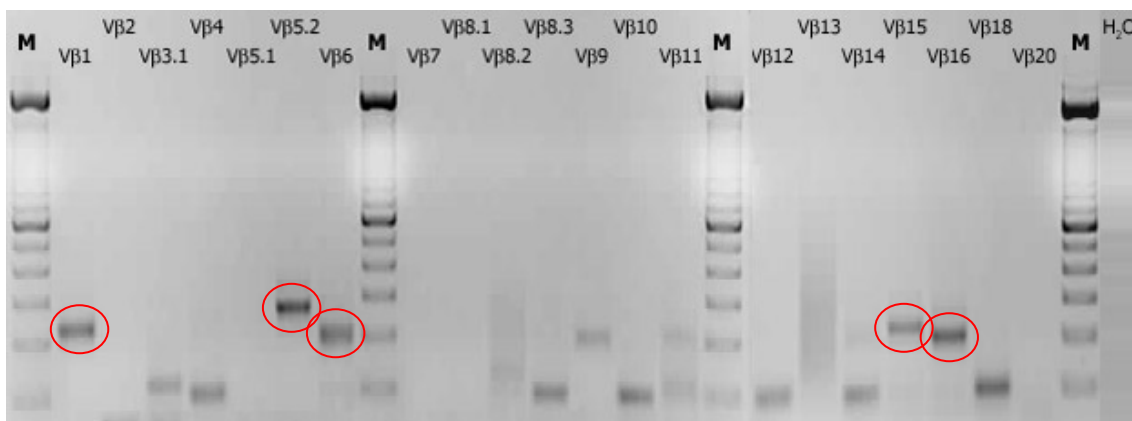
AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA CCT CAT TAC TAC GGT AGT AGC  
 S L T S E D S A V Y Y C A R P H Y Y G S S

TCC CCG GGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA  
 S P G Y F D V W G Q G T T V T V S S

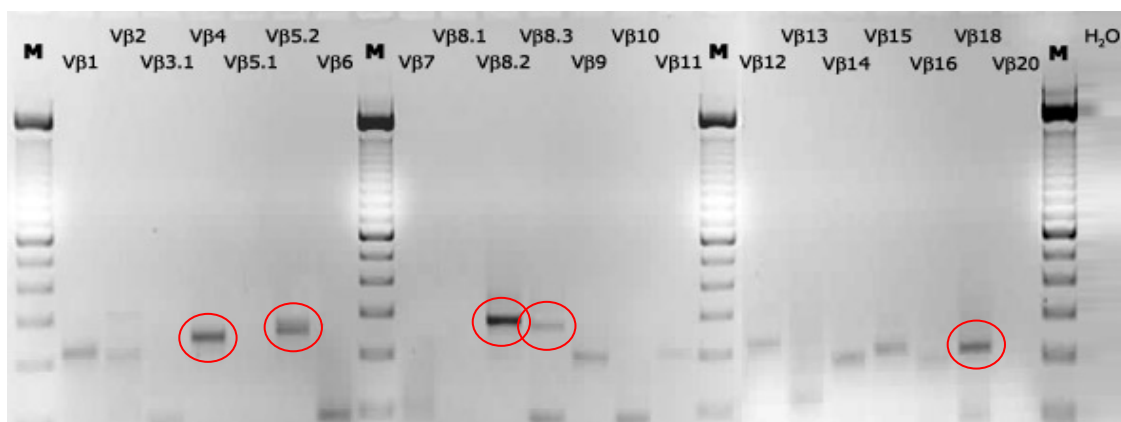
**Legende:**

V-Region (grau hinterlegt) mit CDR1 (G Y T F T S Y W), CDR2 (I H P N S G S T) und einem Teil des CDR3 (A R) - Bereichs (rot markiert). D-Region (Y Y G S S) (grün hinterlegt), J-Region (gelb hinterlegt) mit Trp (W) - Gly (G) - Gln (Q) - Gly (G) - Motiv (rosafarben markiert); eingefügte P-Nukleotide (VD - CCT C; DJ - CC CCG G); Länge der CDR3-Region: 16 Aminosäuren (blaue Box); Gesamtlänge: 122 Aminosäuren

Beide Sequenzen gaben keinen Hinweis auf somatische Hypermutationen im Vergleich zu den jeweiligen Keimbahnsequenzen (IMGT/V-QUEST) (Giudicelli et al., 2004). Diese beiden Tumoren bestanden also aus Zellen, die keine somatische Hypermutation in den Keimzentren vollzogen hatten. Zusätzlich erfolgte mit zwei der HL-Tumorproben eine TZR-Repertoire-Analyse, um zu überprüfen, ob begleitende Tumoren auch in der T-Zell-Population zu finden waren. Hierfür wurden die HL-Proben No. 87 (IgH-monoklonal) und No. 110 (IgH-oligoklonal) ausgewählt. Das Ergebnis der TZR-Analyse ist in den folgenden Abbildungen dargestellt:



**Abb. 50: TZR-Repertoire-Analyse der V $\beta$ -Ketten der Tumorprobe HL-87.** V $\beta$ -Ketten 1-20, H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle (keine cDNA im Ansatz enthalten). M: 1 kb Marker. In den rot umrandeten Kreisen befinden sich Amplifikate, die aus dem Gel eluiert und sequenziert wurden (V $\beta$ 1, V $\beta$ 5.2, V $\beta$ 6, V $\beta$ 15, V $\beta$ 16).



**Abb. 51: TZR-Repertoire-Analyse der V $\beta$ -Ketten der Tumorprobe HL-110.** V $\beta$ -Ketten 1-20, H<sub>2</sub>O: Negativkontrolle (keine cDNA im Ansatz enthalten). M: 1 kb Marker. In den rot umrandeten Kreisen befinden sich Amplifikate, die aus dem Gel eluiert und sequenziert wurden (V $\beta$ 4, V $\beta$ 5.2, V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 8.3, V $\beta$ 18).

Bei beiden Tumorproben konnten mehrere V $\beta$ -Ketten amplifiziert werden. Diese (rote Kreise) wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzen nach Vergleich mit der IMGT-Datenbank ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

**Tab. 21: TZR-Repertoire-Analyse von HL-ähnlichen Tumorproben mit Begleit-Tumoren**

Tumorprobe HL-Fall Maus No.	„Funktionelle“ V $\beta$ -Ketten	VDJ-Umlagerungen Gen/Allel	Nicht funktionelle V $\beta$ -Ketten	Klonalität der Tumorprobe
87	4 [V $\beta$ 1,V $\beta$ 5.2,V $\beta$ 6,V $\beta$ 15]	V $\beta$ 1/ D2-1/ J $\beta$ 2-3 V $\beta$ 5.2/ D1-1/ J $\beta$ 1-2 V $\beta$ 6/ D1-1/ J $\beta$ 2-7 V $\beta$ 15/ D1-1/ J $\beta$ 1-3	1 [V $\beta$ 16]	Oligoklonal o. reaktive T-Zellen?
110	4 [V $\beta$ 4,V $\beta$ 8.2,V $\beta$ 8.3,V $\beta$ 18]	V $\beta$ 4/ D1-1/ J $\beta$ 1-1 V $\beta$ 8.2/ D1-1/ J $\beta$ 2-7 V $\beta$ 8.3/ D1-1/ J $\beta$ 1-4 V $\beta$ 18/ D1-1/ J $\beta$ 2-3	1 [V $\beta$ 5.2]	Oligoklonal

Die amplifizierten V $\beta$ -Ketten beider HL-Tumorproben waren insgesamt homogen und gut auslesbar. Vier der jeweils fünf V $\beta$ -Ketten zeigten alle nötigen Motive. Nur jeweils eine V $\beta$ -Kette (No. 87-V $\beta$ 16; No. 110-V $\beta$ 5.2) wies Stop-Codons in ihrer Sequenz auf. In wieweit die vier „funktionellen“ V $\beta$ -Ketten an der Oberfläche exprimiert werden, konnte aufgrund fehlendem zur Verfügung stehendem Material nicht untersucht werden.

Anhand der Pathologie-Ergebnisse wurden die T-Zellen aus der Maus No. 87 als reaktive infiltrierende Zellen erachtet, da in dieser Maus kein Hinweis auf einen T-Zell-Tumor gefunden wurde. Die T-Zellen aus der Maus No. 110 könnten hingegen eventuell als oligoklonale Tumoren gelten, da die Pathologie in dieser Maus ein begleitendes LTZL diagnostiziert hatte. Das begleitende Infiltrat der untersuchten HL-ähnlichen Tumoren bestand also in Bezug auf die T-Zellen entweder aus einem oligoklonalen Tumor, der aus mehreren T-Zell-Populationen bestand, oder aus reaktiven infiltrierenden T-Zell-Klonen, die sich ebenfalls aus mehreren Populationen zusammensetzten. Eine weitere denkbare

Möglichkeit wäre, dass die T-Zellen aus einer Kombination von Tumorzellen und reaktiven T-Zell-Klonen bestanden. Dazu wurden zwei Hypothesen aufgestellt:

- 1) Basierend auf den TZR-Sequenzen repräsentieren die T-Zellen in Maus No.87 tatsächlich T-Zell-Tumoren, die nicht ausreichend proliferierten, um durch immun-histologische Untersuchungen diagnostiziert werden zu können.
- 2) Werden die TZR von nicht malignen reaktiven T-Zellen exprimiert, würde das bedeuten, dass spezifische T-Zell-Klone zum Tumor rekrutiert wurden. Studien über das Hodgkin-Lymphom haben gezeigt, dass reaktive nicht maligne T-Zellen normalerweise ein polyklonales TZR-Repertoire präsentieren (Re et al., 2005).

In Anbetracht dieser Tatsache erscheint die erste Hypothese daher am plausibelsten.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden: Die meisten HL-ähnlichen Tumoren (5 von 8; 62,5%) wiesen zusätzlich durch die pathologische Untersuchungen diagnostizierte Begleit-Tumoren auf. Die Analyse der IgH-Umlagerungen ergab für zwei der drei untersuchten HL-Fälle (No. 87 und No. 118) eine monoklonale Umlagerung. Die Probe No. 110 zeigte dagegen einen Tumor mit einer oligoklonalen IgH-Umlagerung.

Nach der Untersuchung der TZR-Analyse stellte sich heraus, dass in zwei Proben (No. 87 und No. 110) oligoklonale T-Zellen enthalten waren. Allerdings konnte bei beiden Proben nicht genau definiert werden, ob es sich bei dem Infiltrat um oligoklonale Tumoren oder reaktive T-Zell-Klone bzw. aus einer Kombination aus beiden handelte. Sollten einige der homogenen V $\beta$ -Ketten tatsächlich eher von reaktiven T-Zell-Klonen als von Tumorzellen exprimiert werden, würde das einen Unterschied zum Hodgkin-Lymphom im humanen System darstellen. Denn dort repräsentierten reaktive T-Zellen immer ein uneingeschränktes TZR-Repertoire (Re et al, 2005). Nach der Überprüfung der bereits vorangegangenen FACS-Untersuchung zur Phänotypisierung der Tumoren stellte sich folgendes heraus: In den zwei Tumorproben No. 87 und No. 110 war die Population unreifer B-Zellen (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>) expandiert. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass es in diesen Proben relativ

wenige CD3<sup>+</sup>-T-Zellen gab, die für die jeweilige oligoklonale Population (reaktive T-Zellen bzw. T-Zell-Tumor) in Frage kamen. Die Probe No. 87 enthielt ca. 13% T-Zellen und die Probe No. 110 ca. 30%. Diese niedrige Frequenz an T-Zellen in den Tumorproben könnte in Bezug auf den oligoklonalen T-Zellen ein Hinweis auf ein frühes Entwicklungsstadium dieses Tumors sein. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass es sich um sehr kleine monoklonale Populationen handelte, da die T-Zellen vermutlich nicht genügend Zeit zum expandieren hatten. Dafür waren allerdings CD69<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>TCRab<sup>-</sup> stark expandiert, also aktivierte Thymozyten, die den  $\delta\gamma$ -T-Zellen zuzuordnen wären (persönliche Mitteilung von Dr. Mysliwicz). Eine Tatsache, die auch schon häufiger im Zusammenhang mit Hodgkin-Lymphomen im humanen System beschrieben wurde (Al Saati et al., 1997; Quintanilla-Martinez et al., 1999).

Für die Klärung, ob die festgestellten monoklonalen bzw. oligoklonalen IgH-Umlagerungen von einem B-Zell-Tumor oder den H/RS-Zellen stammen, sollten einzelne H/RS-Zellen mittels Laser-Capture-Mikromanipulation (LCM) [Technologie von P.A.L.M.] aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten isoliert werden. Zehn morphologisch bestimmte H/RS-Zellen aus einem Tumor wurden isoliert und gepoolt. Zusätzlich wurden die umliegenden Bereiche der isolierten H/RS-Zellen in einem Radius von 100  $\mu\text{m}$  um die H/RS-Zellen isoliert. Mittels PCR sollten anschließend die IgH-Umlagerungen sowohl in den H/RS-Zellen als auch in den umliegenden Bereichen amplifiziert werden. Wie sich herausstellte war es aber technisch nicht möglich, aus den in Paraffin eingebetteten Geweben, Produkte zu amplifizieren, die größer als 300 bp sind. Leider war es im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich eine geeignete Technologie für die Amplifikation großer PCR-Produkte aus Paraffin-Geweben zu etablieren. Dies soll aber zu einem späteren Zeitpunkt noch geschehen.

### **3.8. Untersuchung möglicher Signalwege in der Entwicklung von hämatopoietischen Tumoren der DR4-P-Mäuse**

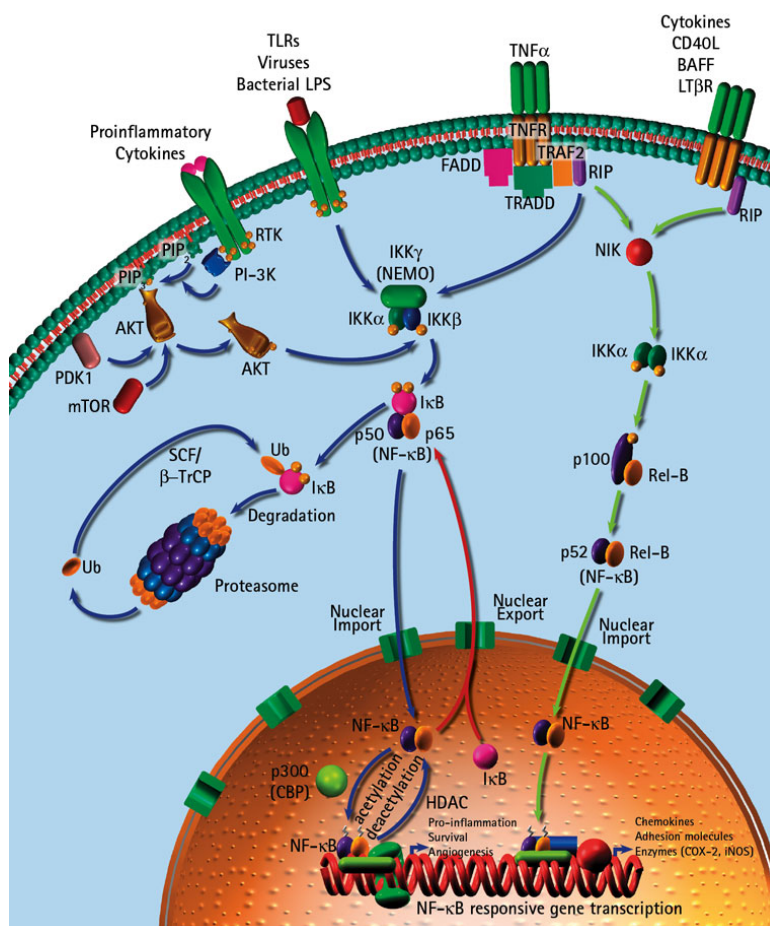
Im humanen System sind mehrere Signalwege bekannt, die bei der Entstehung hämatologischer Tumoren eine wichtige Rolle spielen. So wird zum Beispiel der NF $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg durch Fehler in dessen Regulierung für verschiedene Krebserkrankungen, die hauptsächlich lymphoiden Ursprungs sind, verantwortlich gemacht (Jost et al., 2006).

#### **3.8.1 Der NF $\kappa$ B-Signalweg**

NF $\kappa$ B ist ein eukaryontischer, nukleärer Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei Entzündungen, Autoimmunität, der Zellproliferation und der Apoptose spielt, indem er die Expression der Gene reguliert, die bei diesen Prozessen involviert sind. Es wurde auch schon über einige lymphoide Krebserkrankungen berichtet, die Mutationen oder Amplifikationen von Genen aufwiesen, die für Transkriptionsfaktoren aus der NF $\kappa$ B-Familie kodieren (Martinez-Delgado et al., 2005). In den meisten Krebszellen ist das NF $\kappa$ B in konstitutiver Weise aktiv und bleibt deshalb ständig im Nukleus. In einigen Fällen kann dies aufgrund der ständigen Stimulierung des IKK-Signalwegs auftreten. Zudem wurde auch schon für das Hodgkin-Lymphom beschrieben, dass das für I $\kappa$ Ba-kodierende Gen fehlerhaft oder defekt ist (Cabannes et al., 1999). Eine solche kontinuierliche Aktivität des NF $\kappa$ B schützt nicht nur die Krebszellen vor der Apoptose, sondern kann sogar die Wachstumsaktivität der Krebszellen verstärken. Im Hodgkin-Lymphom ist der NF $\kappa$ B-Signalweg also schon als bedeutender Faktor in der Pathogenese dieser Krankheit beschrieben (Mathas et al., 2005) worden. Zwar konnte in der Untersuchung der Transkriptionsfaktoren (siehe 3.6.2) keine erhöhte Expression in der NF $\kappa$ B p50-Untereinheit detektiert werden, dennoch reichte dieses Ergebnis nicht aus, um den Aktivierungszustand des NF $\kappa$ B-Komplexes zu definieren. Aus diesem Grund stellt sich die Frage: Spielt der NF $\kappa$ B-Signalweg auch in den hämatopoietischen Tumoren der DR4-P-Mäuse eine zentrale Rolle?



Für die Klärung dieser Frage sollte zunächst eine Analyse der Faktoren, die in den NF $\kappa$ B-Signalweg involviert sind, mittels eines NF $\kappa$ B-Arrays in einigen klassifizierten LTZL, DLBZL und HL-Fällen durchgeführt werden. Der Signalweg der NF $\kappa$ B-Aktivierung ist in Abb. 52 dargestellt:



[http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/NFkb NFkappaB Ikb IKK Pathway Products.htm](http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/NFkb%20NFkappaB%20Ikb%20IKK%20Pathway%20Products.htm)

### Abb. 52: Der NF $\kappa$ B-Signalweg

Dargestellt ist eine inflammatorische Antwort, ausgelöst durch das NF $\kappa$ B-Heterodimer von p50 und p65. Die NF $\kappa$ B-Dimere werden durch eine Familie von Inhibitoren, die so genannten I $\kappa$ B Inhibitoren in einem inaktivierten Zustand gehalten. Die Signale des Rezeptors (u.a. von Zytokinen, Toll-like-Rezeptoren (TLR), TNF- $\alpha$  oder Lymphotoxin-beta-Rezeptor (LT $\beta$ R)) führen zu der Aktivierung von einem Multi-Proteinkomplex, der als I $\kappa$ B-Kinase (IKK) –Komplex bezeichnet wird und der das I $\kappa$ B an zwei Serinen phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung des I $\kappa$ B wird der „Startschuss“ für dessen Degradierung im Ubiquitin-Signalweg gegeben. So kann das „befreite“ NF $\kappa$ B-Dimer in den Nucleus wandern, an DNA binden und die Transkription aktivieren.

Mit dem Maus NF $\kappa$ B-Signalweg-Array (RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array) ist es möglich, das Expressionsprofil von 84 Genen und zusätzlichen Kontrollen (Abb. 53) zu untersuchen, die in den NF $\kappa$ B- vermittelten Signalweg involviert sind. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer qRT-PCR mit einer Signalweg fokussierten Genexpressionsanalyse im 96-Well-Platten-Format. Dafür wurde die isolierte RNA von den zu untersuchenden Tumorproben zunächst in cDNA umgeschrieben. Für dieses Experiment wurden je drei LTZL-Proben (No. 41; No. 97; No. 108), DLBZL-Proben (No. 74; No. 96; No. 117) und HL-Proben (No. 87; No. 110; No. 118) aus der Milz verwendet. Als Kontrollen dienten mittels magnetischer Separation isolierte CD19<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Populationen gesunder DR4-P- und Bl6-Mäuse, die aus einem Pool von je drei Mäusen aus der Milz angereichert wurden. Von der daraus gewonnenen RNA wurden ebenfalls in cDNA umgeschrieben. Nachdem die Tumorzellen in den verschiedenen Tumorproben expandiert waren, sollte durch die Anreicherung der B- bzw. T-Zellen ein besserer Vergleich mit den Tumorproben ermöglicht werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Akt1	Atf1	Atf2	Bcl10	Bcl3	C3	Card10	Card4	Casp1	Casp8	Ccl2	Cflar
B	Chuk	Crebbp	Csf2	Csf3	Edg2	Egr1	Elk1	F2r	FADD	FasL	Fos	Gja1
C	Htr2b	ICAM1	IFN $\gamma$	I $\kappa$ Bk $\beta$	I $\kappa$ Bk $\epsilon$	I $\kappa$ Bk $\gamma$	IL10	IL1 $\alpha$	IL1 $\beta$	IL1R1	IL6	IRAK1
D	IRAK2	Irf1	Jun	Lta	LT $\beta$ R	Map3k1	Mapk3	Myd88	Nalp12	NF $\kappa$ B1	NF $\kappa$ B2	NF $\kappa$ Bia
E	Pcaf	Prkr	Raf1	Rel	Rela	Relb	Ripk1	Ripk2	Slc20a1	Smad3	Stat1	Tbk1
F	TGF $\beta$ R1	TGF $\beta$ R2	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TNF	TNFaip3
G	TNFRsf10b	TNFRsf1a	TNFRsf1b	TNFRsf5	TNFRsf7	TNFRsf10	TNFRsf14	TRADD	Tollip	Traf2	Traf3	Zap70
H	Gusb	Hprt1	HSPcb	GAPDH	$\beta$ -Akt	$\beta$ -Akt	$\beta$ -Akt	$\beta$ -Akt	$\beta$ -Akt	$\beta$ -Akt	$\beta$ -Akt	$\beta$ -Akt

**Abb. 53: Maus-NF $\kappa$ B-Array-Layout**

**Legende:**

- Gene, die bei der Aktivierung von NF $\kappa$ B involviert sind.
- Gene, die auf NF $\kappa$ B reagieren („NF $\kappa$ B responsive Genes“).
- Andere Faktoren die im NF $\kappa$ B – Signalweg involviert sind.
- Kontrollen, Haushaltsgene, Verdünnungsreihe für Act $\beta$  –Standardkurve.

Die Bezeichnungen der Gene wurden für dieses Kapitel aus der Beschreibung des Kits übernommen. Die Synonyme und weitere Informationen können dem Appendix entnommen werden.

Nach der Durchführung aller Experimente wurden die Ergebnisse analysiert und in den folgenden Tabellen (Tab. 22 und 23) zusammengefasst:

Die unterschiedliche Expression wurde gegen Haushaltsgene bzw. gegen die  $\beta$ -Aktin-Standardkurve normalisiert und als x-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.

**Tab. 22: Grundlegende Unterschiede zwischen DR4-P- und Bl6-Mäusen in der Expression von Genen, die im  $NF\kappa B$ -Signalweg involviert sind.**

Zellpopulationen im Vergleich	In DR4-P-Mäusen erhöhte Genexpression [x-fach]	In DR4-P-Mäusen reduzierte Genexpression [x-fach]
CD19 <sup>+</sup> B-Zellen	IL1R1 50,4x	-*
	TNFRsf10b 23,9x	
	IL-10 18,8x	
	Ccl2 17,7x	
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	-*	-*

Angegebene Werte waren im Vergleich zu Bl6-Mäusen signifikant ( $p < 0,05$ ) und zudem mindestens 10-fach erhöht oder reduziert. \* Es sind keine signifikanten Unterschiede detektierbar. Die unterschiedliche Expression der Fraktionen wurde gegen Haushaltsgene normalisiert und mit den Kontrollen verglichen (Die Proben sowie die Kontrollen bestanden aus einem Pool von je drei Mäusen). Die x-fache Expression wurde mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.

Diese Analyse ergab, dass nur grundlegende Unterschiede zwischen den B-Zellen der beiden Mausstämme detektierbar waren. So war die Anzahl der Transkripte gegenüber den Bl6-Kontrollen der folgenden Gene in der Fraktion der CD19<sup>+</sup>-Zellen erhöht: IL1R1, TNFRsf10b, IL-10 und Ccl2 (Synonym: MCP1). Überraschenderweise konnten im Vergleich der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Populationen zwischen DR4-P- und Bl6-Mäusen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

Die Verschiebungen in der Genexpression zwischen LTZL, DLBZL und HL-Tumorproben und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus der DR4-P-Generation wurden in der Tab. 23 dargestellt. Generell wurden die Ergebnisse aller einzelnen Tumorgruppen (LTZL, DLBZL und HL) zusammengefasst und mit den Kontrollen (CD4<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Zellpopulationen) aus DR4-P-Mäusen verglichen. Alle Kontrollgruppen bestanden immer aus zwei Proben, von denen eine aus weiblichen und die andere aus männlichen Mäusen stammten. So wurden die LTZLs mit den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und

die DLBZLs mit den CD19<sup>+</sup>-Populationen aus DR4-P-Mäusen verglichen. HL-Fälle wurden gegen CD19<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellfraktionen analysiert, da vorangegangene Ergebnisse gezeigt hatten, dass sowohl T-Zell-Tumoren als auch B-Zell-Tumoren in diesen HL-Mischproben enthalten waren.

**Tab. 23: Vergleich zwischen Tumoren und DR4-P-Kontrollen**

LTZL im Vergleich	In Tumoren erhöhte Genexpression [x-fach]		In Tumoren reduzierte Genexpression [x-fach]	
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	-*		Lta	-16,4x
<b>DLBZL im Vergleich</b>				
CD19 <sup>+</sup> B-Zellen	C3	21,7x	Csf3	-48,2x
	LTβR	10,6x		
<b>HL im Vergleich</b>				
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	IL-10	11,9x	Prkr	-148,5x
			Prkr	-168,9x
CD19 <sup>+</sup> B-Zellen			Csf3	-35,9x
	TLR8	23,4x	IL1R1	-25,6x
	TLR2	15,9x	Bcl10	-23,0x
	Zap70	15,3x	Map3k1	-18,5x
	C3	15,1x	TGFβR2	-13,4x
			Ripk2	-13,3x

Angegebene Werte waren im Vergleich zu den angereicherten CD4/CD19-Populationen signifikant ( $p < 0,05$ ) und zudem mindestens 10-fach erhöht oder reduziert. \* Es sind keine signifikanten Unterschiede detektierbar. Auch hier wurde die unterschiedliche Expression durch Haushaltsgene normalisiert und mit den Kontrollen verglichen. Die x-fache Expression wurde mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben. Angegeben sind die Mittelwerte des delta-delta-Ct-Wertes aus je 3 Tumorproben im Vergleich zu den gepoolten Kontrollen (Pool aus je drei Mäusen).

Bei den LTZL-Proben waren im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus gesunden DR4-P-Mäusen nur das Lymphotoxin A (Lta) – Transkript 16-fach reduziert. Der Vergleich der B-Zell-Tumoren mit der CD19<sup>+</sup>-Fraktion ergab in den Tumoren eine erhöhte Expression von C3 (Komplement Faktor 3) und dem Lymphotoxin-beta-Rezeptor (LTβR). Im Gegensatz dazu konnte in der Gesamtheit der DLBZL-Tumoren nur in dem Gen, das für Csf3 kodiert (G-CSF), eine stark reduzierte Genexpression festgestellt werden. Der Vergleich der HL-Tumoren mit der CD4<sup>+</sup>-

Fraktion ergab eine erhöhte Menge an IL-10-Transkripten und eine stark reduzierte Genexpression für Prkr (Proteinkinase). Im Vergleich zu CD19<sup>+</sup>-angereicherten B-Zellen wiesen die HL-Proben eine erhöhte Genexpression in den folgenden Genen auf: TLR8, TLR2, Zap70 (src-Kinase), C3. Eine mehr oder weniger stark reduzierte Genexpression konnte dagegen in den Genen detektiert werden, die für Prkr, Csf3, IL1R1, Bcl10, Map3k1, TGFβR2 und Ripk2 kodieren. Für eine übersichtlichere Einteilung wurden die verschiedenen Gene der Tumorproben, die im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen entweder erhöhte (↑) oder reduzierte (↓) Mengen an Transkripten aufwiesen in ihre funktionellen Gruppen unterteilt:

#### **Kinasen:**

↑Zap70, ↓Map3k1, ↓Bcl10, ↓Ripk2, ↓↓ Prkr

#### **Liganden und Rezeptoren:**

↑LtβR, ↑Tlr2, ↓Lta, ↓IL1R1, ↓TGFβR2, ↑TNFRsf10b

#### **Moleküle inflammatorischer Antworten:**

↑IL-10, ↑TLR8, ↑C3, ↓Csf3, ↓ Ccl2

**Legende:**

- Gene, die in der Aktivierung von NFκB involviert sind.
- Gene, die auf NFκB reagieren („NFκB responsive Genes“).
- Andere Faktoren die im NFκB – Signalweg involviert sind.

Die Einteilung der Gene in ihre funktionellen Gruppen ergab keine Auffälligkeiten in Bezug auf ein einheitliches Auftreten von über- oder minderexprimierten Genen in den verschiedenen Tumormischproben.

Zusammenfassend konnte nach der Analyse der Ergebnisse festgestellt werden: Es gab kein Muster von Genen, die in allen Tumorproben einheitlich in erhöhter oder reduzierter Transkriptmenge aufgetreten wären. Eine Aktivierung bzw. erhöhte Expression von NFκB konnte in keinem der Tumoren festgestellt werden.

Aber es gab Übereinstimmungen innerhalb den Tumorgruppen von DLBZL und HL. So konnte in diesen beiden Tumorproben im Vergleich zu der CD19<sup>+</sup>-Population eine erhöhte Transkriptmenge von C3 und eine stark reduzierte Menge an Csf3 (G-CSF)-Transkripten

detektiert werden. C3 ist ein Komplementfaktor, der eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Pathogenen spielt. G-CSF ist der Granulozyten-Kolonie-Stimulationsfaktor, der hauptsächlich in seiner Rolle als Aktivator von Zytokinen und bei der Differenzierung von Granulozyten zu finden ist. Die Beteiligung von G-CSF und C3 in dem NF $\kappa$ B-Signalweg liegt in der Vermittlung inflammatorischer Antworten. Darüber hinaus ist das Gen, das für die Proteinkinase Prkr kodiert, in HL-Fällen gegenüber der CD4<sup>+</sup>-und CD19<sup>+</sup>-Kontrollgruppe in einer sehr stark reduzierten Transkriptmenge aufgetreten. Die Proteinkinase Prkr wird durch IFN-Typ I induziert und durch doppelsträngige RNA aktiviert. Sie wird zudem als eukaryontischer Translations-Initiator beschrieben (Eif2ak2) ([www.jax.org](http://www.jax.org)). Darüber hinaus wird der Proteinkinase Prkr die Fähigkeit zugeschrieben, NF $\kappa$ B durch die Interaktion mit dem I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplex zu aktivieren (Bonnet et al., 2000).

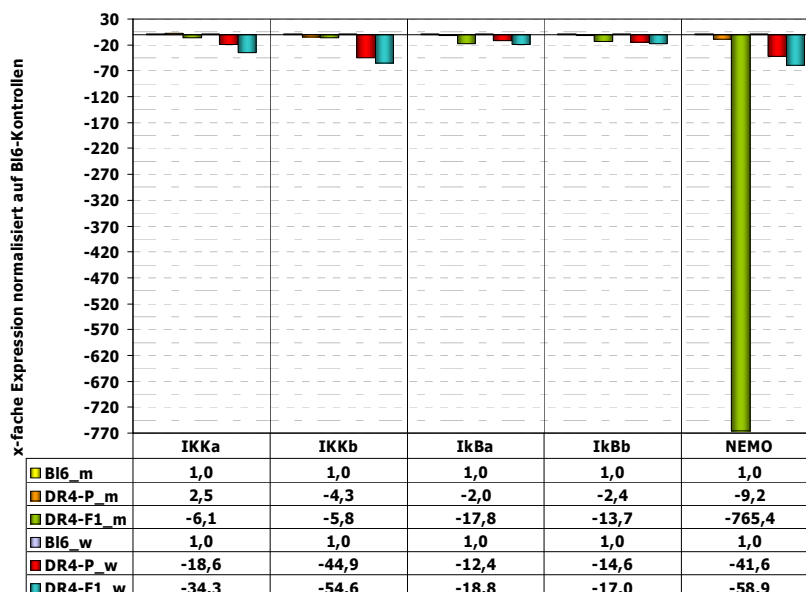
### **3.8.2. Untersuchung des IKK-Signalosoms**

Das IKK-Signalosom ist ein Multi-Proteinkomplex, der wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, eine wichtige Rolle in der Aktivierung von NF $\kappa$ B spielt. Dieser Komplex setzt sich aus den zwei aktiven Kinasen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie aus den Gerüstproteinen NEMO (IKK $\gamma$ ) und IKAP (IKK-Komplex-assoziiertes Protein) zusammen. Die katalytische Aktivität des IKK-Komplexes vermittelt die Phosphorylierung der NF $\kappa$ B-inhibitorischen I $\kappa$ B Proteine.

Wie schon vorher beschrieben, wurden in HL-Tumoren beim Menschen in einigen dieser Gene Mutationen gefunden (Nishikori et al., 2005, Cabannes et al., 1999). Zudem konnte festgestellt werden, dass die Proteinkinase Prkr stark reduzierte Transkriptmengen in HL-Tumoren der DR4-P-Mäuse aufwies. Deshalb wurde mittels qRT-PCR die Genexpression der Gene untersucht, aus denen sich der IKK-Komplex zusammensetzt: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , NEMO. Bei diesem Experiment sollte zunächst geklärt werden, ob Unterschiede in der Genexpression bei den verschiedenen Mäusen (Bl6-, DR4-P- und DR4-F1) detektiert werden können. Hierfür wurden aus je einer weiblichen und einer männlichen Maus der verschiedenen Stämme im Alter von drei Monaten die isolierte RNA aus der Milz in cDNA umgeschrieben.

Im Anschluss an die letzte Elongationsphase der qRT-PCR wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produktes durchgeführt. Die unterschiedliche Expression wurde mit Hilfe des Haushaltsgens 18S rRNA normalisiert und mit den jeweils geschlechtsspezifischen Kontrollen aus der Bl6-Maus verglichen.

Die Ergebnisse der Analyse sind in der folgenden Graphik dargestellt:



**Abb. 54: Genexpression von IKK-Komplex-Genen in der Milz im Vergleich DR4-P, DR4-F1- und Bl6-Kontrollen.** Im Vergleich wurden die Proben männlicher Mäuse auf Bl6\_m normalisiert und die Proben weiblicher Mäuse auf Bl6\_w normalisiert. Die Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und die Unterschiede als x-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben. Angegeben wurden die Werte aus je einer Maus.

Die Genexpressionsanalyse der Gene IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , NEMO ergab eine leichte bis starke Reduzierung der Transkriptmengen im Vergleich zu den geschlechts-spezifischen Bl6-Kontrollen. Auffällig war das stark herunterregulierte Gen NEMO in DR4-F1\_m-Mäusen. Darüber hinaus zeigten die Weibchen der DR4-P- und DR4-F1-Mäuse eine tendenziell stärkere Reduzierung der Transkriptmengen als die Männchen, vor allem bei den Genen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ . Um auszuschließen, dass die geringe gemessene Transkriptmenge von NEMO in DR4-F1\_m kein Artefakt war, wurde dieser Versuch mit neu synthetisierter cDNA wiederholt. Mit diesem Versuch konnte das vorangegangene Ergebnis bestätigt werden.

### 3.8.3. Mutationen in IKK-Komplex-Genen?

Zusätzlich wurden die untersuchten Gene IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  und NEMO aus der Milz einer drei Monate alten DR4-P-Maus in ihrer vollen Länge amplifiziert und sequenziert. Hierfür wurden neue Primer ausgesucht (primer3\_www.cgi v 0.2; Rozen et al., 2000), die es in einer qRT-PCR ermöglichen, die komplette kodierende Region der Gene auf cDNA-Ebene zu amplifizieren. Gene, deren kodierende Region größer als 1250 bp war, wurden fragmentarisch amplifiziert. Das heißt, es wurden mehrere Primer ausgesucht, die auf der gesamten Länge der kodierenden Region immer nur Produkte bis zu einer Größe von 1250 bp amplifizierten. Nach der anschließend durchgeführten Sequenzierung wurden die Fragmente zu einer kompletten Sequenz zusammengefügt. Die Analyse der Sequenzen im Vergleich mit den Sequenzen in der NCBI-Datenbank ergab keine Mutationen in den IKK-Komplex-Genen.

In der folgenden Tabelle sind die Lokalisation der Gene im Genom und die Größen ihrer kodierenden Bereiche angegeben.

**Tab. 24: Informationen der untersuchten IKK-Komplex-Gene**

Gen [Synonym]	Transkript RefSeq	Lokalisation	Größe der mRNA	Position der kodierenden Region in der mRNA (Größe)	Mutationen
IKK $\alpha$ [Chuk]	NM_007700	Chr. 19	3466 bp	54-2291 (2237bp)	keine
IKK $\beta$ [Ikbkb]	NM_010546	Chr. 8	3973 bp	127-2343 (2216bp)	keine
I $\kappa$ B $\alpha$ [Nfkbia]	NM_010907	Chr. 12	1091 bp	66-1010 (944 bp)	keine
I $\kappa$ B $\beta$ [Nfkbib]	NM_010908	Chr. 7	1945 bp	103-1182 (1079 bp)	keine
I $\kappa$ B $\epsilon$ [Nfkbie]	NM_008690	Chr. 17	2422 bp	222-1320 (1098 bp)	keine
NEMO [Ikbkg]	NM_178590	Chr. X	4535 bp	136-1371 (1235 bp)	keine

Zusammenfassend ergab die Untersuchung der IKK-Komplex-Gene keine Hinweise auf Mutationen in den Sequenzen der kodierenden Bereiche. Um generell Mutationen in diesen Genen auszuschließen, müssten allerdings die Sequenzen in den verschiedenen Tumorproben analysiert werden. Dies wurde aber im Rahmen dieser Arbeit aus Kosten- und Zeitgründen nicht mehr durchgeführt.



## **4. Diskussion**

### **4.1 Mechanismen der Tumorentstehung**

Aufgrund der im Ergebnisteil gezeigten Versuche konnten bereits folgende Mechanismen als primäre Faktoren ausgeschlossen werden, die eine Tumorentstehung in den DR4-P-Mäusen begünstigen: Retrovirale Insertion durch ein endogen aktiviertes Provirus, MHV-Infektion, Störung der Hämatopoese und Immuninsuffizienz. Des Weiteren erscheint eine direkte ursächliche Rolle des chimären DR4-Transgens eher unwahrscheinlich, da nicht alle Tiere Tumoren entwickelten. Die transgenen DR4-IE $\alpha$ - und DR4-IE $\beta$ -Konstrukte wurden durch den direkten Austausch des Exon-2 in dem murinen MHC-Klasse-II-IE Locus konstruiert. Diese wurden als DNA-Sequenzen mikroinjiziert, wobei Fremd-DNA enzymatisch entfernt wurde, so dass die Expression des Transgens unter der Kontrolle der natürlich auftretenden regulatorischen Elemente erhalten blieb. Diese sind Promotor, Enhancer und Locus-kontrollierende Regionen des H2-IE-Mausgens, das sich über eine Größe von 9,5 kb (alpha-Lokus) bzw. 18,5 kb (beta-Lokus) erstreckt. Dies ermöglichte die eingeschränkte Expression des Transgens während der Entwicklung und in den entsprechenden Zellen in einer dem normalen murinen MHC-Klasse-II-Allel vergleichbaren Weise zu erhalten (Ito et al., 1996). Dadurch wurde das Transgen nicht in einer zeitlich oder örtlich abweichenden Form exprimiert, die zu der Tumorentwicklung beitragen könnte. Bei anderen Mausstämmen, die transgene MHC-Klasse-I- oder Klasse-II-Moleküle exprimieren, konnte sogar unter der Kontrolle fremder Promotoren keine Entwicklung hämatopoietischer Erkrankungen festgestellt werden (Pascolo et al., 2005; Sonderstrup et al., 1999). Generell funktionieren die Klasse-II-Moleküle nicht als Signalmoleküle, die extrazelluläre Interaktionen mit intrazellulären Signalwegen verbinden. Dafür fehlen ihnen wichtige Merkmale zellulärer Rezeptoren, wie zum Beispiel Wachstumsfaktor-Rezeptoren („growth factor receptors“), die an der zellulären Transformation mitwirken.

Dennoch kann das DR4-Transgen nicht vollständig als mitwirkender Faktor der Tumorentstehung ausgeschlossen werden. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass kein Vergleich der verschiedenen Founder-Linien mit der Integration des Transgens in verschiedenen chromosomalen Lokationen vorgenommen werden konnte. Leider wurde von den Urhebern nur eine Founder-Linie für die anschließende Zucht erhalten. Darüber hinaus ist auch denkbar, dass die Integration multipler Kopien des Transgens Einfluss auf die Tumorentwicklung ausgeübt haben könnte.

Da weder das ursprüngliche Labor noch kommerzielle Züchter eine Tumorentstehung in DR4tg-Mäusen festgestellt haben (persönliche Korrespondenz), war es sehr wichtig, die Rolle ungewöhnlicher Umwelteinflüsse bei der Tumorentwicklung in der Maus-Tierhaltung der GSF auszuschließen. Deshalb wurden in Kooperation mit einem Labor in Berlin, das die DR4tg-Mäuse sowohl direkt vom Züchter erhält als auch selbst nachzüchtet, einige Mäuse über einen längeren Zeitraum beobachtet. Die betreffenden Organe erkrankter Mäuse wurden uns für histopathologische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Auch hier entwickelten einige der älteren DR4tg-Mäuse hämatopoietische Tumoren, wobei es keinen Unterschied machte, ob die Mäuse direkt vom Züchter stammten oder aus der hauseigenen Zucht (Daten nicht gezeigt). Mit dem Entstehen dieser Tumoren konnten also ungewöhnliche Umwelteinflüsse in der Maus-Tierhaltung der GSF als Faktoren für eine Tumorentstehung ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass andere DR4tg-Mäuse-Halter keine Tumoren detektierten, liegt also höchstwahrscheinlich daran, dass die Mäuse nicht lange genug gehalten wurden, um die Entstehung von Tumoren zu ermöglichen. Aus all diesen Überlegungen ergab sich die Annahme, dass die Integration des Transgens in das Chromosom 16-B4 als Hauptursache der Tumorentstehung anzusehen ist.

Zwei Möglichkeiten der Störung sind durch die Integration des Transgens denkbar: Die Zerstörung eines Suppressorgens oder die Aktivierung eines Onkogens. In dem Fall der Zerstörung eines Suppressorgens müssten beide Allele betroffen sein, um die Tumorentwicklung zu erlauben, da ein intaktes Allel normalerweise für das Verhindern der

Tumorentwicklung ausreichend ist. Im Gegensatz hierzu sind Onkogen-Effekte normalerweise dominant, so dass die Aktivierung eines Allels bereits ausreicht, um die Tumorentwicklung zu begünstigen. Der Unterschied in diesen beiden Mechanismen konnte durch die Zucht und Analyse der DR4-F1-Generation erhoben werden. Das Auftreten von Tumoren in der DR4-F1-Generation unterstützte die Behauptung, dass die Insertion des Transgens zu der Aktivierung eines Onkogens geführt hatte. Nachdem bestimmt werden konnte, dass die Insertion des Transgens eine kritische Rolle in der Tumorentwicklung spielen muss, war es essentiell, die exakte Lokalisierung der Integrationsstelle herauszufinden. Das chimäre MHC-Klasse-II DR4-Heterodimer wurde durch die Generierung zweier unabhängiger Konstrukte für die jeweiligen alpha- und beta-Ketten verwirklicht, die mittels Mikro-Koinjektion in die Eizellen von B16-Mäusen transferiert wurden. So war es durchaus denkbar, dass jedes Konstrukt in einen anderen Locus und möglicherweise in mehrere verschiedene Stellen integriert hatte und somit mehrere Mutationen zu der Tumorentstehung beitragen könnten. Eine FISH-Analyse, unter Verwendung markierter Sonden für das jeweilige alpha- und beta-Konstrukt, konnte diese Annahme widerlegen. Zudem konnte festgestellt werden, dass beide Konstrukte an nur einer Stelle des Chromosoms 16 (zytogenetische Bande B4) integriert hatten, wenn auch mit einer unterschiedlichen Anzahl an Kopien. Mittels „Genome-Walking“ war es möglich, die exakte Position der Integration zu bestimmen. Diese Position stimmte mit dem Ergebnis der FISH-Analyse überein. Leider konnte die exakte Position der Integration keine weiteren Hinweise in Bezug auf die Tumorentstehung liefern, da die Integration weder in der unmittelbaren Nähe eines bekannten Onko- oder Suppressorgens noch eines experimentell bestätigten annotierten Gens mit unbekannter Funktion stattfand. Darüber hinaus konnten spezielle Programme, die es ermöglichen, aus einer unbekanntem Sequenz Gen-Strukturen vorherzusagen, keine Ergebnisse liefern. ESTs, die in der Nähe der Integrationsstelle lokalisiert waren, konnten ebenfalls nicht als kodierende funktionelle cDNAs bestimmt werden, obwohl diese in einer Reihe von unterschiedlichen untersuchten Geweben exprimiert

waren. Nachdem die komplette Sequenz des Maus-Genoms mittlerweile verfügbar ist und die annotierten Gene etwa 85 % ausmachen (Maeda et al., 2006), scheint es, dass das Transgen nicht direkt in der Nähe einer proteinkodierenden Sequenz integriert ist. Es ist eher anzunehmen, dass das Transgen einen so genannten „long-range“-Effekt ausübt, indem es ein oder mehrere Gene beeinflusst, die in einer größeren Entfernung lokalisiert sind. Es wurde schon berichtet, dass „long-range“-Effekte die Genfunktionen von bis zu 1000 kb entfernt liegenden Genen beeinflussen können (Kleinjahn et al., 2005). Diese Entfernung würde aber nicht ausreichen, um das ausgewählte Kandidaten-Onkogen (siehe 3.4.1.) zu beeinflussen. Da das Transgen durch die Integration multipler Kopien etwa 260 kb groß ist, wäre es aber durchaus denkbar, dass sich durch die Faltung der Chromatinstruktur auch die Reichweite des Einflusses vergrößern könnte.

Allerdings reicht die Aktivierung eines Onkogens oder die Zerstörung bzw. Inaktivierung der Funktion eines Suppressorgens im Normalfall nicht aus, um Tumoren zu entwickeln. Auch eine Infektion durch exogene Viren wäre, alleine auftretend, nicht ausreichend für die Tumorentwicklung. Die Aktivierung eines endogenen Provirus könnte nur ausreichen, wenn eine Zelle durch eine multiple Integration des Provirus in mehreren Genen betroffen ist. Die These des zweiten „Hits“ (Knudson et al., 1971) bzw. der multiplen „Hits“ (Fearon et al., 1990) spielt hier eine wichtige Rolle. Demnach können Tumoren nur entstehen, wenn mindestens zwei Mutationen parallel auftreten. Das bedeutet: Es müssen erst Mutationen in zwei verschiedenen Genen auftreten, um einen genetischen Effekt (Tumorentstehung) auszulösen. Dies zeigten Sinn und Kollegen bereits 1987: Mäuse, die durch einen Maus-Brustkrebs-Tumor-Virus (MMTV, Mouse Mammary Tumor Virus) Promotor/Enhancer-angetriebene v-Ha-ras- oder c-myc-Transgene besaßen, entwickelten keine malignen Veränderungen. Erst nach Kreuzung der beiden transgenen Mausstämme MMTV/v-Ha-ras und MMTV/c-myc traten in dramatischer Weise maligne Tumorbildungen auf. Nachdem die Tumoren meist monoklonal waren und stochiastisch auftraten, wurde folgendes vermutet: Trotz der Anwesenheit der aktivierten Onkogene v-Ha-ras und c-myc müssen zusätzliche

somatische Ereignisse aufgetreten sein, um diesen malignen Krankheitsverlauf entwickeln zu können (Sinn et al., 1987).

Obwohl die Möglichkeit der multiplen Hits durch die Integration des Transgens als Basis der Tumorentstehung eliminiert werden konnte, unterstrichen doch einige Beobachtungen die Annahme, dass auch bei den DR4tg-Mäusen multiple Ereignisse stattgefunden haben mussten, die zu der Entwicklung der Tumoren führten:

1) Da nur knapp 70% der DR4-P-Mäuse und ca. 53% der DR4-F1-Mäuse Tumoren entwickelten, kann die Integration des Transgens alleine nicht für die Tumorgenese ausreichend sein.

2) Es waren Zellen unterschiedlicher Linien (myeloide und lymphoide) von der Tumorgenese betroffen, die in fast allen unterschiedlichen Stadien der Entwicklung (pro-, prä-, unreife und reife) festgestellt werden konnten. Darüber hinaus waren die meisten Tumoren monoklonal oder biklonal. Da man erwarten würde, dass die Transformation von frühen Stamm- und Vorläuferzellen zu polyklonalen Tumoren führt, kann dies nicht für die Vielfalt der Tumoren verantwortlich gemacht werden. In den wenigen Mäusen, bei denen mehrere T-Zell-Tumoren festgestellt wurden, konnte anhand der TZR-Sequenzen gezeigt werden, dass diese voneinander unabhängig waren. Das spiegelte wahrscheinlich die starke Neigung zur malignen Transformation dieser Zellen wider. Die Ereignisse, die zur Tumorgenese führten, hatten anscheinend einen Einfluss auf Zellen in einer späteren Phase der hämatologischen Entwicklung. Trotz der Beobachtung der Mäuse über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr gab es keinen Hinweis auf nicht-hämatologische Tumoren, die aufgrund der Transgen-Integration entstanden wären. Die wenigen Fälle von Karzinomen, die bei den DR4tg-Mäusen festgestellt wurden, reflektieren zudem die zu erwartende niedrige Frequenz in normalen alternden Mäusen. So scheinen sich die tumorigenen Effekte auf das hämatopoietische System zu begrenzen. Dennoch waren verschiedene Zellen in stochastischer Form betroffen, was für einen primären Einfluss der genetischen Störung durch die Integration des Transgens in diesem System spricht. Zudem waren ganz eindeutig

Tumoren lymphoiden Ursprungs vorherrschend, wobei hierbei die Aufteilung der T- und B-Zell-Tumoren etwa gleich war. Dies steht wahrscheinlich in Bezug zu der generell größeren Wahrscheinlichkeit von Defekten in Lymphozyten. Durch die genetischen Rearrangements, in denen funktionelle T- und B-Zell-Rezeptoren produziert werden, ist die Möglichkeit der Akkumulation multipler Hits für eine maligne Transformation erhöht.

3) Die Tumoren traten erst in älteren Mäusen, nach etwa 6-9 Monaten auf. Dies spricht für notwendige Ereignisse, die über einen längeren Zeitraum in den transgenen hämatopoietischen Zellen akkumulieren mussten, um zu einer malignen Transformation einzelner myeloider oder lymphoider Zellen zu führen. Wenn Tumoren auftraten, hatten diese meist einen sehr aggressiven Phänotyp, der sich durch ein fulminantes Wachstum und eine weite Verbreitung in mehrere Organe äußerte. Diese Charakteristika sprachen gegen eine Entwicklung von Tumoren, die „ruhig“ und unbemerkt in den ersten Lebensmonaten der DR4tg-Mäuse entstehen. Darüber hinaus konnten histologische Untersuchungen von Mäusen in einem Alter von bis zu sechs Monaten keine pathologischen Anzeichen für eine Erkrankung in diesen jungen Mäusen aufweisen.

Die fehlende Identifizierung eines direkten Kandidaten, dessen Funktion durch die Integration gestört wurde, kombiniert mit dem starken Hinweis, dass multiple Ereignisse für eine maligne Transformation benötigt werden, erforderte eine große Bandbreite an experimentellen Studien. Diese sollten es ermöglichen, die Faktoren bestimmen zu können, die zur Tumorentstehung führen. Diese Untersuchungen wurden in zwei Stufen durchgeführt: Zuerst wurden gesunde transgene Mäuse untersucht, um Veränderungen aufgrund der Transgen-Insertion aufzudecken. Anschließend wurden ausgewählte Tumoren genauer untersucht, um zelluläre und molekulare Ereignisse zu bestimmen, die zu der malignen Transformation geführt haben könnten.

Da nur wenige Informationen über die transgenen DR4-Mäuse verfügbar waren, wurden in der ersten Stufe zunächst Experimente durchgeführt, um generelle Unterschiede im Phänotyp zwischen jungen gesunden transgenen Mäusen und Bl6-Mäusen aufzudecken. In einigen Fällen wurden auch DR4-F1-Mäuse in die Studie mit einbezogen. Aufgrund der ausschließlichen Entwicklung hämatopoietischer Erkrankungen wurden exzessive Analysen der hämatopoietischen Entwicklung in DR4-P-, DR4-F1- und Bl6-Mäusen durchgeführt. Zusätzlich wurden immunphänotypische Studien lymphoider Organe durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Entwicklung der Lymphozyten in den transgenen Mäusen normal verläuft. Zusammengefasst formten diese Experimente ein Gesamtbild des hämatopoietischen/lymphoiden Systems der transgenen DR4-P- und DR4-F1-Mäuse, das vorher noch unbekannt war. Aus Zeitgründen wurden keine Versuche durchgeführt, die zur Aufklärung der Fähigkeit dieser Mäuse in Bezug auf Immunantworten von T- und B-Zellen nach einer Provokation durch Antigene („antigen challenge“) dienen könnten.

In der zweiten Stufe wurden ausgewählte Tumoren sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene charakterisiert. Diese Versuche dienten dazu, um die Tumoren im Hinblick auf ihren Ursprung zu charakterisieren und um potentielle molekulare Signalwege zu identifizieren, die bei der malignen Transformation beteiligt sind. So wurden zum Beispiel Transkriptionsfaktoren untersucht, die in der MHC-Klasse-II-Regulation beteiligt sind. Die Entdeckung von Zellen, die morphologisch stark den H/RS-Zellen ähneln sowie das histologische Bild einer Hodgkin-ähnlichen Erkrankung in einigen Mäusen, initiierte die Untersuchung des NF $\kappa$ B-Signalwegs. Der NF $\kappa$ B-Signalweg ist für seine wesentliche Beteiligung in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms im humanen System bekannt. Abschließend erhielten wir in Kollaboration mit Prof. M. Wabl die Vorabinformation bezüglich der tumorigenen Rolle von einigen Genen, die auf Chromosom 16 lokalisiert sind. Diese Gene wurden durch ihr frühes Auftreten von T- oder B-Zell-Lymphomen in einem retroviralen Mutagenese-„Screen“ von AKR-Mäusen als potentielle Onkogene identifiziert (Wang et al.,

2006). AKR-Mäuse sind für ihre natürliche Neigung zu spontan auftretenden T- und B-Zell-Malignitäten in höherem Alter bekannt (Hiai et al., 1999). Diese Kandidatengene wurden auf eine abweichende Expression in gesunden gegenüber malignen Zellen von transgenen Mäusen hin untersucht. Dies sollte den Einfluss eines „long-range“-Effektes durch die Integration des Transgens aufklären. Die wichtigsten Ergebnisse dieser verschiedenen Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten zusammengefasst und ihre Relevanz diskutiert.

#### **4.2. Grundlegende Unterschiede zwischen DR4-P-, (DR4-F1-) und Bl6-Kontrollmäusen**

Der Vergleich von Geburtsgewicht, Wurfgröße, genereller Entwicklung und histologischen Analysen bis zu einem Alter von 6 Monaten zwischen DR4-P-, DR4-F1- und Bl6-Kontrollmäusen ergab keine bedeutenden Unterschiede. Auch die Untersuchungen der Hämatopoiese bzw. der Entwicklung der Stamm- und Vorläuferzellen ergab keine Auffälligkeiten, die prädestiniert für eine Entwicklung der Tumoren wären. Dennoch konnten innerhalb des lymphoiden Kompartiments signifikante Unterschiede detektiert werden.

Die phänotypische FACS-Analyse des peripheren Blutes zeigte sowohl signifikante Verschiebungen in den CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als auch in der DX5<sup>+</sup>-NK-Zellpopulation zwischen DR4-P- und Bl6-Mäusen. Am interessantesten war hierbei die doppelte Anzahl der MHC-Klasse-II-restringierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in DR4-P-Mäusen. Eine massive Erhöhung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation trat sowohl im Blut als auch in den peripheren Lymphknoten, der Milz und dem Thymus von DR4-P-Mäusen auf.

Die Anzahl der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen war im Vergleich zu Bl6-Kontrollmäusen unverändert. Es konnte festgestellt werden, dass die CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation verdoppelt war, die Anzahl der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hingegen in reduzierter Anzahl detektiert wurde. Für das Immunsystem der DR4-P-transgenen Mäuse bedeutet dies, dass etwa die gleiche Anzahl an T-Zellen verfügbar, das CD4/CD8 Verhältnis allerdings massiv in Richtung CD4<sup>+</sup> verschoben war. Der Grund für



diese erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen könnte eine niedrige bis moderate Affinität der chimären MHC-Klasse II-Moleküle darstellen. In der Positiv-Selektion im Thymus werden T-Zellen aussortiert, die zu stark an den MHC-Peptid-Komplex binden. T-Zellen, die entweder zu schwach oder gar nicht binden, werden ebenfalls aus dem System eliminiert. Nur solche T-Zellen können überleben, die mit ihrem Korezeptor in einem moderaten Maß an MHC-Moleküle binden. Vielleicht bietet also der chimäre MHC-II-Peptid-Komplex genau die richtige moderate Signalstärke, so dass hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen selektioniert werden. Ein weiterer Grund hierfür könnte die Kopienzahl der integrierten Konstrukte sein. Das MHC-II-Molekül ist ein Heterodimer aus alpha- und beta-Ketten. Damit das murine MHC-II-Molekül der DR4-P-Mäuse an der Oberfläche exprimiert werden kann, müssen jeweils die alpha- und beta-Konstrukte zusammenfinden. Der limitierende Faktor hierbei ist also das Konstrukt, das am wenigsten oft integriert hatte. Nach der Untersuchung der Kopienzahl ergab das für unseren Fall, dass das beta-Konstrukt mit etwa 4-5 Kopien integriert hatte. Dies bedeutet, dass dieser chimäre MHC-II-Komplex maximal vier bis fünf Mal mehr an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert sein könnte als bei den Kontrollmäusen und somit die Selektion der T-Zellen in Richtung CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen treiben könnte. Experimentelle Untersuchungen zur Bestätigung einer erhöhten MHC-Klasse-II-Expression gegenüber Bl6-Kontrollmäusen wurden zwar durchgeführt, allerdings mussten für diese FACS-Analyse zwei verschiedene Antikörper verwendet werden. In allen untersuchten Organen konnte eine leichte Erhöhung der MHC-Klasse-II-Expression in DR4-Mäusen detektiert werden (keine Daten gezeigt). Da die DR4-P-Mäuse keine IA-Expression aufweisen, wurde hier ein Antikörper gewählt, der das humane DR4-Epitop erkannte. Für die Analyse der Bl6-Mäuse konnte dagegen ein gängiger IA-Antikörper eingesetzt werden. Ein Vergleich der Expressionsstärke der MHC-Klasse-II-Moleküle wäre somit nicht korrekt, da die verschiedenen Antikörper mit Sicherheit Unterschiede in der Bindungsaffinität aufweisen.

Da homöostatische Mechanismen ein striktes Limit in der Gesamtanzahl der Lymphozyten aufrechterhalten, war die starke Erhöhung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von einer entsprechend

niedrigen Frequenz an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen begleitet. Allerdings müsste noch bestimmt werden, ob diese verringerte Anzahl an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder NK-Zellen, aufgrund unzureichender Immunüberwachung, beitragende Faktoren für eine Tumorentwicklung sein könnten (Foss et al., 2002; Di Santo et al., 2006). Darüber hinaus bleibt sowohl die Natur und Funktion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit ihrem ungewöhnlichen und nicht komplett definierten Phänotyp als auch ihr Einfluss auf die Tumorgenese zu bestimmen. Zum Beispiel wäre es sehr wichtig, die Multiparameter-Phänotypisierung mit einer intrazellulären Zytokin-Färbung zu kombinieren. Dadurch könnte bestimmt werden, ob diese Zellen die Produzenten wichtiger Zytokine sind, die beispielsweise die Proliferation oder andere Signal-vermittelten Ereignisse antreiben und somit die zelluläre Transformation anstoßen.

### **4.3. Unterschiede in der Tumorentwicklung von DR4-P- und DR4-F1-Mäusen**

Die homozygoten DR4-P-Mäuse entwickelten mit einer höheren Frequenz Tumoren als die Mäuse der DR4-F1-Generation. Allerdings entstanden die Tumoren der DR4-P-Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt. Die Tumorentstehung in der DR4-F1-Generation gab Hinweise darauf, dass die Integration des Transgens in ein Chromosom ausreichte, um die Entstehung von Tumoren zu begünstigen. Zudem schien ein Allel des Transgens zu genügen, um die Tumorentstehung zu ermöglichen. Das spricht für einen dominanten oder Onkogeneffekt. Wie schon oben beschrieben, erscheinen dennoch zusätzliche genetische Ereignisse nötig zu sein, um eine maligne Transformation zu ermöglichen. Die höhere Frequenz der Tumoren in der DR4-P-Generation ist wahrscheinlich durch die Tatsache zu erklären, dass in diesen Mäusen zwei Allele betroffen sind. Es ist auch denkbar, dass die DR4-P-Mäuse eine leichte Immundefizienz ausbilden, die durch das Fehlen eines murinen MHC-Klasse-II-Allels verursacht wird. Dieser Verlust des murinen MHC-Klasse-II-Allels muss für die Tumorentstehung keine essentielle Rolle spielen, allerdings könnte sie dennoch zu diesem Prozess beitragen. Das frühere Auftreten der Tumoren in der DR4-F1-Generation ist nicht

ohne Spekulationen erklärbar. Eine Möglichkeit wäre, dass die Mäuse in der DR4-F1-Generation öfter und genauer untersucht wurden und die Veränderungen deshalb früher erkannt wurden.

Betrachtet man die Aufteilung der männlichen und weiblichen DR4-F1-Mäuse pro Gruppe, so war tendenziell eine leichte Verschiebung zu mehr erkrankten weiblichen Tieren zu erkennen. Der Grund hierfür war, dass hauptsächlich männliche Mäuse im Alter zwischen 4,5 und 8 Monaten Hautläsionen entwickelten hatten und deshalb schon vor der möglichen Entstehung der Tumoren aus der Studie ausgeschlossen werden mussten. Die Entstehung dieser Hautläsionen wurde bislang nicht erwähnt, da sie für die Fragestellung dieser Arbeit als nicht relevant betrachtet wurde und zudem nicht mehr im Rahmen der Arbeit genauer untersucht werden konnte.

#### **4.4. Untersuchungen der Tumoren aus DR4-P-Mäusen**

##### **4.4.1. Zytokine**

Die Untersuchung der sezernierten Zytokine in den Seren Tumor-tragender DR4-P-Mäuse ergab kein einheitliches Muster, das den entsprechenden Tumoren (LTZL, DLBZL, AML) zuzuordnen gewesen wäre. Aufgrund der Heterogenität der analysierten Zytokine konnten keine prognostischen Entwicklungen der verschiedenen Tumoren vorhergesagt werden. Allerdings ergab die Analyse der Zytokine, dass vor allem in Mäusen, in denen ein DLBZL diagnostiziert wurde, die größten Mengen an sezernierten Zytokinen im Serum detektiert werden konnten. Betrachtete man die Ausschüttung von Zytokinen mit über 400 pg/mL der einzelnen Tumorgruppen (LTZL, DLBZL und AML), so war in LTZL-tragenden Mäusen hauptsächlich sezerniertes Eotaxin nachweisbar. Die DLBZL-diagnostizierten Mäuse sezernierten zusätzlich zu dem Chemokin Eotaxin noch IL-13, IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-10. TNF- $\alpha$  und IFN $\gamma$  sind die so genannten Th<sub>1</sub>-Zytokine, da sie hauptsächlich von Th<sub>1</sub>-Zellen ausgeschüttet werden, wohingegen IL-10 von regulatorischen T<sub>R</sub>1-Zellen und Th<sub>2</sub>-Zellen sezerniert wird. Von IL-10 ist bekannt, dass es Makrophagen-Antworten unterdrücken

kann, die durch Th<sub>1</sub>-Zellen aktiviert werden. IL-13 wird normalerweise von T-Zellen synthetisiert und übt einen starken Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von B-Zellen aus (Kapp et al., 1999; Skinnider et al., 2001). Allerdings wurde schon beschrieben, dass IL-13 und sein Rezeptor (IL-13R) in einem Großteil der HL-Fälle in H/RS-Zellen synthetisiert werden. Der IL-13R wird zudem im H/RS-Tumorzellinfiltrat auf umliegenden Histozyten und Lymphozyten exprimiert (Skinnider et al., 2001). Die von den H/RS-Zellen sezernierten Zytokine IL-13 und IL-13R könnten also die umgebenden B-Zellen beeinflussen und sich zudem autokrin stimulieren. Die fehlende Detektion von H/RS-Zellen in den untersuchten DLBZL-Tumorproben sprach deshalb also eher für die Produktion von IL-13 durch T-Zellen, die in unterschiedlichen Frequenzen in den Tumormischproben enthalten waren.

Die Tatsache, dass keine klassischen Th<sub>2</sub>-Zytokine, wie IL-4 oder IL-5, detektiert werden konnten, welche die Th<sub>1</sub>-Differenzierung inhibieren, stärkte die Annahme, dass es sich bei diesen Tumor-infiltrierenden Zellen also hauptsächlich um Th<sub>1</sub>-Zellen oder regulatorische T-Zellen handelte. Bei den LTZL-tragenden DR4-P-Mäusen konnten weder Th<sub>1</sub>- noch Th<sub>2</sub>-Zytokine in hohen Mengen detektiert werden. Das lieferte demnach keinen Hinweis auf die Anwesenheit bzw. Aktivierung dieser speziellen T-Zellen. Das Chemokin Eotaxin scheint bei allen Tumor-tragenden DR4-P-Mäusen eine besondere Rolle zu spielen, denn es wurde von allen Tumorgruppen in sehr hohen Mengen sezerniert. Das CC-Chemokin Eotaxin spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Anlockung von Eosinophilen zum Ort der Entzündung. Dies wurde hauptsächlich durch die Untersuchung verschiedener Atemwegserkrankungen aber auch bei der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms im humanen System festgestellt (Pinto et al., 1997; Aldinucci et al., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eosinophile Zellen, die Hauptproduzenten des Eotaxins, einen Anti-Tumor-Effekt durch die Infiltration in das Tumorgewebe vermitteln können. Allerdings wird eine verstärkte Einwanderung eosinophiler Zellen hauptsächlich in Verbindung mit Th<sub>2</sub>-Zellen beschrieben. Th<sub>2</sub>-Zellen sezernieren zum Beispiel IL-4 und IL-5, die für die Induktion bzw. Aktivierung

eosinophiler Zellen nötig sind (Rothenberg et al., 2006). Dies widerspricht unseren Ergebnissen. Zwar wurden sehr große Mengen an Eotaxin gefunden, allerdings deutet die Gesamtheit der sezernierten Zytokine eher auf eine Th<sub>1</sub>-Immunantwort hin. So werden zum Beispiel große Mengen an IFN<sub>γ</sub> ausgeschüttet, das die Entwicklung von Th<sub>2</sub>-Zellen unterdrücken kann. Insgesamt ergab die Zytokin-Analyse verschiedener klassifizierter Tumoren ein doch sehr heterogenes Bild der ausgeschütteten Zytokine. Gründe hierfür sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen (Reifegrad) der Tumoren sowie die unterschiedliche Frequenz und Zusammensetzung der enthaltenen Tumorzellen und gesunden Zellen. Für eine genauere Analyse wäre es deshalb nötig, die verschiedenen Tumorzellen aufzureinigen, in Kultur zu nehmen und dann die Überstände zu analysieren. Das Problem hierbei ist allerdings, dass die Tumorzellen nicht sehr lange überleben würden, da sie sehr schnell nekrotisch werden und somit auch keine Zytokine mehr ausschütten (persönliche Korrespondenz).

#### **4.4.2. Transkriptionsfaktoren**

Auch die Untersuchung der Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Tumor-tragenden DR4-P-Mäusen ergab, mit einigen Ausnahmen, keine eindeutigen Kandidaten, die den jeweiligen Tumorgruppen (LTZL, DLBZL, HL) zugeordnet werden konnten.

In der Gruppe der HL-ähnlichen Tumoren waren die beiden Transkriptionsfaktoren SP1 und Egr1 überexprimiert, die beide unter anderem auch an den Promoterbereich des murinen Klasse-II-Lokus (H2-Ea) binden. Auch die Transkriptionsfaktoren Tbet und GATA3 waren hochreguliert, die eine Rolle bei der Th<sub>1</sub> bzw. Th<sub>2</sub> Differenzierung spielen. Mittels *in silico*-Analyse unter Zuhilfenahme der MatInspector- und Gene2Promoter-Software der Firma Genomatix konnten Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SP1 und Egr1 im Promoterbereich des H2-Ea-Lokus bestimmt werden. Sp1 und Egr1 sind regulatorische Transkriptionsfaktoren der Zink-Finger-Familie. Zusammen wurde diesen beiden Transkriptionsfaktoren eine reziproke Rolle in der Expressions-Kontrolle des PTB1B-

Promotors zugeschrieben. SP1 induziert die Promoter-Funktion, wohingegen Egr1 diese unterdrückt. PTB1b ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B), die ein wichtiger Regulator von Protein-Tyrosin-Kinase-abhängigen Signalwegen darstellt. Veränderungen in der Expression und Aktivität von PTP1B wurden deshalb bereits mit verschiedenen humanen Erkrankungen assoziiert (Fukada et al., 2001). Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) und Kinasen (PTKs) regulieren die reversible Phosphorylierung von Tyrosin in Proteinen und kontrollieren somit fundamentale physiologische Prozesse, wie beispielsweise Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration. Störungen in der Balance der PTPs und PTKs können somit ein Grund für Krebserkrankungen sein.

Tbet wird als „Master-Regulator“ der Th<sub>1</sub>-Entwicklung bezeichnet (Glimcher et al. 2000), weil er sowohl den IL-2-Promoter als auch die Produktion von IL-4 und IL-5 unterdrücken kann. GATA3 ist der Schlüsselfaktor für die selektive Differenzierung zu Th<sub>2</sub>-Zellen und wird auch nur von diesen produziert. Darüber hinaus hemmt GATA3 die Th<sub>1</sub>-Entwicklung und kontrolliert die IL-5 Produktion (Zhang et al., 1997). Die Überexpression von GATA3 und Tbet ist ein Hinweis darauf, dass in den Tumormischproben der HL-ähnlichen Fälle T-Zellen beider Subtypen expandiert sein könnten. Dies steht wiederum im Widerspruch zu den Hodgkin-Lymphomen im humanen System. Denn dort wurden hauptsächlich Th<sub>2</sub>-Immunantworten gefunden, die mit der Infiltration eosinophiler Zellen in das Tumorgewebe einhergehen (Poppema et al., 2005).

Die wenigen Ausnahmen, bei denen alle vergrößerten Lymphknoten aus DR4-P-Mäusen ein ähnliches Expressionsmuster aufwiesen, waren CIITA (fast alle Proben mit leicht reduzierten Transkriptmengen) und c-myc (fast alle Proben mit leicht erhöhten Transkriptmengen). Dem Transkriptionsfaktor CIITA wird eine Schlüsselrolle in der Unterdrückung Th<sub>2</sub>-exprimierter Zytokine (IL-4) während der Entwicklung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Richtung der Th<sub>1</sub>-Linie zugeschrieben (Patel et al., 2004). Zudem ist CIITA ein wichtiger Faktor in der Transkriptionsaktivierung und Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (LeibundGut-Landmann et al., 2004). CIITA-defizienten Mäusen fehlt die MHC-Klasse-II-Expression auf

Antigen-präsentierenden Zellen vollständig (Gourley et al., 2002). Die reduzierten Transkriptmengen von CIITA in den vergrößerten Lymphknoten erkrankter DR4-P-Mäuse konnten allerdings nicht mit einer reduzierten MHC-Klasse-II Expression in anderen Tumortragenden Mäusen in Verbindung gebracht werden. Entweder spielt die reduzierte Transkriptmenge keine Rolle, da noch genügend CIITA-Transkripte vorhanden sind, die als Proteine ihre Funktion ausüben können, oder aber die CIITA Transkripte werden aus bisher ungeklärten Gründen herunterreguliert, um die ohnehin erhöhte MHC-Klasse-II-Expression (multiple integrierte Kopien der Transgen-Konstrukte) durch die chimären MHC-Klasse-II-Moleküle in Balance zu halten. C-myc ist ein starkes Proto-Onkogen, das als nukleärer Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Regulierung der Transkription spezifischer Ziel-Gene spielt, über die aber noch wenig bekannt ist. (Lee et al., 2006). Mutationen, Überexpression, Rearrangements und Translokationen von c-myc wurden bereits mit vielen verschiedenen hämatopoietischen Tumoren, Leukämien und Lymphomen im humanen System in Verbindung gebracht (Wade et al., 2006). So wurde zum Beispiel in transgenen Mäusen das c-myc-Gen unter die Kontrolle eines IgH-Enhancers (Emu) gestellt, was hauptsächlich zur Entwicklung von Lymphomen führte (Palomo et al., 1999; Park et al., 2005). Ob die leicht erhöhten Transkriptmengen von c-myc, die in fast allen Lymphknoten festgestellt werden konnten, tatsächlich eine Rolle spielen und ob Mutationen oder Translokationen vorliegen, muss durch weiterführende Experimente geklärt werden.

#### **4.4.3. Überexprimierte und herunterregulierte Gene im NF $\kappa$ B-Array**

Obwohl viele verschiedene Signalwege in der Entwicklung von Lymphomen beteiligt sein können, wurde dem NF $\kappa$ B-Signalweg eine besondere Bedeutung zugeschrieben. Denn es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass das NF $\kappa$ B eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms bei Menschen spielt. Grundlegende Unterschiede zwischen gesunden DR4-P- und Bl6-Kontrollmäusen konnten nur in der CD19<sup>+</sup>-B-Zell-Population festgestellt werden. So war die Anzahl der Transkripte der folgenden Gene in der Fraktion der CD19<sup>+</sup>-B-

Zellen in DR4-P-Mäusen erhöht: IL-1R1, TNFRsf10b, IL-10 und CCL2 (Synonym: MCP1). Das IL-1R1 kodiert für die IL-1Ra Untereinheit des IL1-Rezeptors, woran IL-1 binden kann und zusammen mit seinem Korezeptor inflammatorische Antworten induziert (Lang et al., 1998). Zudem wurde beschrieben, dass die IRAK-Kinase (Interleukin 1R-assozierte Kinase), die eine wichtige Rolle in der NF $\kappa$ B-Aktivierung spielt, an den IL1R1-Komplex binden kann, um phosphoryliert zu werden (Jiang et al., 2002). TNFRsf10b gehört zu der TNF Familie und wird auch als TRAIL-Rezeptor-2 bezeichnet, da er TRAIL bindet und zudem Apoptose induzieren kann (Wu et al., 1999). IL1R1 und TNFRsf10b werden im Zusammenhang mit dem NF $\kappa$ B-Signalweg als involvierte Liganden und Rezeptoren bezeichnet. IL-10 ist ein immunsuppressives Molekül, das von Th<sub>2</sub>-Zellen, B1-Zellen und Keratinozyten produziert wird. Zudem verhindert IL-10 die Produktion anderer Zytokine, wie IL-2, TNF- $\beta$  und IFN $\gamma$ . CCL2 (MCP1) gehört zu der Familie der Chemokine, das hauptsächlich eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten ausübt. IL-10 und CCL2 werden als Moleküle inflammatorischer Antworten in Bezug auf den NF $\kappa$ B-Signalweg genannt. Das Gen IL1R1 ist hierbei besonders interessant, da es im Vergleich der HL-Fälle zu den CD19<sup>+</sup>-Kontrollproben herunterreguliert wurde. Das ist ein Hinweis darauf, dass IRAK vielleicht nicht phosphoryliert wurde und somit keine Aktivierung des NF $\kappa$ B erreicht wurde.

Eine Aktivierung bzw. erhöhte Expression von NF $\kappa$ B konnte in keinem der untersuchten Tumoren festgestellt werden. Die NF $\kappa$ B-Aktivierung ist ein Charakteristikum für das Hodgkin-Lymphom im Menschen und stellt somit einen Unterschied zu den HL-Fällen in den DR4-P-Mäusen dar. Darüber hinaus ist das Gen, das für die Proteinkinase Prkr kodiert, in HL-Fällen gegenüber der CD4<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Kontrollgruppe in einer sehr stark reduzierten Transkriptmenge aufgetreten. Die Proteinkinase Prkr wird durch IFN-Typ I induziert und durch doppelsträngige RNA aktiviert. Sie wird zudem als eukaryontischer Translations-Initiator beschrieben (Eif2ak2) ([www.jax.org](http://www.jax.org)). Darüber hinaus wird der Proteinkinase Prkr die Fähigkeit zugeschrieben, NF $\kappa$ B durch die Interaktion mit dem I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) zu aktivieren (Bonnet et al., 2000). Eine fehlende konstitutive Aktivierung des NF $\kappa$ B in den



HL-Fällen könnte also durchaus als Konsequenz auf die massive Herunterregulierung der Proteinkinase Prkr zurückzuführen sein.

Darüber hinaus konnten bei DLBZL- und HL-Fällen im Vergleich zu den CD19<sup>+</sup>-Kontrollen aus der Bl6-Maus festgestellt werden, dass das Gen für C3 (Komplement-Faktor) überexprimiert war, wohingegen Csf3 (G-CSF) herunterreguliert wurde. C3 und Csf3 sind Gene, die durch NF $\kappa$ B kontrolliert werden und denen zudem eine Rolle in der Akutphasen-Reaktion („acute phase reaction“) auf inflammatorische Prozesse zugeschrieben wird (Noursadeghi et al., 2002), wobei Csf3 während dieser Akutphasen-Reaktion produziert wird. Eine Untersuchung der Akutphasen-Proteine war eigentlich im Rahmen dieser Arbeit geplant, musste aber aus Zeitgründen verschoben werden. In den HL-Mäusen scheinen zudem insgesamt mehr am NF $\kappa$ B-Signalweg involvierte Gene beeinflusst zu werden, als dies bei den DLBZL- oder LTZL-Mäusen der Fall ist. Dies ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit der begleitenden T- und B-Zell-Tumoren zurückzuführen. So sind die folgenden Gene bei HL-Mäusen im Vergleich zu CD19<sup>+</sup>-B-Zellen aus Kontrollmäusen herunterreguliert: Bcl10, Map3k1 und Ripk2. Dies sind allesamt Kinasen, wobei aber nur Bcl10 direkt in der Aktivierung von NF $\kappa$ B involviert ist. Bcl10 ist ein wichtiges Adapter-Molekül, das die Antigen-Rezeptor-Signal-Kaskade mit der NF $\kappa$ B-Aktivierung in Lymphozyten verbindet (Wang et al., 2006). Darüber hinaus konnten in den HL-Fällen folgende, überexprimierte Gene detektiert werden: TLR8, TLR2 und Zap70.

Die Toll-like-Rezeptoren spielen im angeborenen Immunsystem eine besondere Rolle als erste zu überwindende Front gegen mikrobielle Erreger und der daraus vermittelnden pro-inflammatorischen Signale, die über eine Phosphorylierung der IKK-Gene zu der Aktivierung von NF $\kappa$ B führen. Zudem sind diese Signale essentiell, um die eingedrungenen Pathogene zu eliminieren und das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Darüber hinaus wurde als Interaktionspartner der TLRs die PI3-Kinase beschrieben, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Differenzierung von T- und B-Zellen spielt (Ruse et al., 2006). Zap-70 ist eine Tyrosin-Kinase, die sowohl von T-Zellen als auch von B-Zellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle in den Signalwegen nach Stimulierung des T-Zell- bzw. B-Zell-Rezeptors spielt

(Scielzo et al., 2006). Auch dieser Befund wird durch die Tatsache unterstützt, dass begleitende Tumoren lymphoiden Ursprungs in den HL-Tumorproben enthalten waren.

Insgesamt gesehen ergab auch die Analyse der am NF $\kappa$ B-Signalweg involvierten Gene eine große Datenmenge, die aber auch auf Grund der Heterogenität der Tumormischproben schwierig einzuschätzen war. Manche der beschriebenen Gene (TLRs, Zap-70, Bcl10) sind sowohl in der T- und B-Zell-Aktivierung als auch an der Differenzierung dieser Zellen beteiligt. Diese Gruppe der Gene erscheinen am interessantesten, da sie im Hinblick auf die lymphoide Tumorgenese eine Rolle spielen könnten. Weiterführende Experimente müssen auch hier folgen, um die Beteiligung dieser Gene zu bestätigen bzw. zu eliminieren. Diese müssten sich zunächst auf die Isolierung einzelner Tumorzellen bzw. Anreicherung der verschiedenen Tumorzellen richten, um in nachfolgenden Experimenten die „Kontamination“ mit anderen Zellen auszuschließen.

#### **4.4.4. Mutationen in IKK-Komplex-Genen**

Zusammenfassend ergab die Untersuchung der IKK-Komplex-Gene (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , NEMO) keine Hinweise auf Mutationen in den Sequenzen der kodierenden Bereiche. Allerdings wurden bei allen untersuchten Genen reduzierte Transkriptmengen festgestellt. Diese Herunterregulierung ist bei NEMO besonders stark in männlichen Tieren und hier vor allem in der DR4-F1-Generation aufgetreten. NEMO ist auf dem X-Chromosom annotiert. Die Tatsache, dass NEMO hauptsächlich in männlichen Tiere herunterreguliert war und dies vor allem in der DR4-F1-Generation zum Vorschein kam, führte zu der folgenden Annahme: Durch die Transgen-Integration auf Chromosom 16 wird durch interchromosomale Interaktionen die Transkription des NEMO-Gens gestört. Um diese Annahme zu bestätigen, bzw. zu widerlegen, müssten weitere Versuche mit einer höheren Versuchstierzahl folgen. Darüber hinaus passt die reduzierte Transkriptmenge aller IKK-Komplex-Gene gut zu der fehlenden NF $\kappa$ B Aktivierung. Anscheinend sind nicht genügend Transkripte vorhanden, um

funktionelle Proteine hervorzubringen, die zudem zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B führen könnten.

#### **4.4.5. Onkogen Trat1**

Unter den Kandidatengenenen, die auf Chromosom 16 lokalisiert sind und durch retrovirale Insertion vermittelte Mutagenese experimentell als Onkogene bestätigt wurden, zeigte das Trat1-Gen eine erhöhte Expression in den DR4tg-Mäusen.

Das Wesen der Onkogenaktivierung liegt darin, dass eine Mutation z.B. einen Rezeptor so verändert, dass er immer im angeschalteten Zustand vorliegt und nicht mehr abgeschaltet werden kann. Für die Zelle wird durch die Mutation das Vorhandensein eines Wachstumssignals vorgetäuscht. Die Zelle reagiert darauf mit einer uneingeschränkten Proliferation.

Trat1 ist ein über eine Disulfid-Brücke verbundenes Homodimer und besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne (8 Aminosäuren (AS)), einer 19 AS langen Transmembran-Domäne und einem zytoplasmatischen Schwanz mit einer Länge von 159 Aminosäuren. In der intrazellulären Domäne befinden sich mehrere Tyrosin-Signal-Motive, die in der SH2-Domäne vermittelten Protein-Protein-Interaktion involviert sind. Nach der T-Zell-Aktivierung wird Trat1 sehr schnell phosphoryliert und bindet dann über ein YxxM-Motiv an die 85 kDa große regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (Bruyns et al., 1998). Die PI3-Kinase ist ein allgegenwärtig exprimiertes Signalenzym, das auch eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und Aktivierung von B-Zellen spielt. Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass in p85 $\alpha$ -Knockout-Mäusen die B-Zell-Rezeptor-getriebene Proliferation vollständig blockiert ist (Hess et al., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der PI3-Kinase zu einer Regulierung des CD4/CD8-Verhältnisses im Thymus in Richtung einer erhöhten CD4-Frequenz führt (Rodriguez-Borlado et al., 2003), die auch in DR4tg-Mäusen detektierbar war. Eine Überexpression von Trat1 könnte also durchaus Auswirkungen auf die T- und B-Zellentwicklung haben. Um dies zu belegen, müssten

Versuche folgen, die die Genexpression von *Trat1* und PI3K vor allem im Thymus aufklären könnten.

Der Vergleich von Milzgewebe gesunder DR4-P-Mäuse mit dem von Bl6-Kontrollmäusen ergab eine starke Überexpression von *Trat1* in den DR4-P-Mäusen. Wobei hier die Frage auftaucht: Werden die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch die *Trat1*-Aktivierung zur Proliferation getrieben oder ist die Überexpression von *Trat1* die Folge der massiven Anzahl an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die bislang die einzigen bekannten Produzenten von *Trat1* sind? Ein schönes Beispiel hierfür ist die mit der Frequenz der T-Zellen proportional einhergehende Überexpression von *Trat1* in den HL-Tumoren. Je mehr T-Zellen in der Tumormischprobe enthalten waren, desto höher war die Überexpression von *Trat1*.

In den angereicherten CD4<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>- Fraktionen gesunder Mäuse zeigten die DR4-P-Mäuse nur in der CD19<sup>+</sup>-Fraktion eine starke Überexpression von *Trat1* gegenüber den Bl6-Kontrollfraktionen. Dies steht im Widerspruch zu Literaturangaben, in denen beschrieben wurde, dass B-Zellen kein *Trat1* exprimieren können (Kirchgessner et al., 2001). Allerdings konnte aufgrund des unspezifischen *Trat1*-Antikörpers nicht bestimmt werden, ob die *Trat1*-Transkripte der CD19<sup>+</sup>-Fraktionen tatsächlich als Proteine an der Oberfläche exprimiert wurden oder ob dies den geringen „kontaminierenden“ T-Zellen in den angereicherten Fraktionen zuzuordnen war. Dieses Problem könnte möglicherweise durch Experimente gelöst werden, in denen nach T- und B-Zell-Fraktionen bzw. nach naiven und aktivierten T- und B-Zellen sortiert wird. Vorausgesetzt ein *Trat1*-Antikörper wäre verfügbar, könnten weitere Experimente Aufschluss über die Expression von *Trat1* auf verschiedenen Zelltypen geben.

Eine Untersuchung der verschiedenen Tumormischproben aus DLBZL, LTZL und HL zeigte eine meist moderate bis sehr starke Überexpression von *Trat1* gegenüber den Bl6-Kontrollen. Diese ist wahrscheinlich ebenso abhängig von der Frequenz der enthaltenen T-Zellen, wie schon oben für die HL-Tumoren beschrieben wurde.

Angenommen das Trat1-Onkogen spielt eine Rolle in der Begünstigung der Tumorentstehung, dann müsste nach dem Knudson'schen-Modell des zweiten Hits noch eine andere Mutation aufgetreten sein, um den Prozess der hämatopoietischen Tumorentstehung voranzutreiben. Möglicherweise ist Trat1 in der Lage, die fehlende konstitutive NF $\kappa$ B-Aktivierung in den DR4tg-Mäusen zu ersetzen. Eine nähere Untersuchung des PI3K-Signalwegs sowie die Interaktion von Trat1 mit anderen Adapterproteinen könnten weitere Hinweise liefern, um diese Annahme zu unterstützen.

## **4.5. Klonalität der Tumoren**

### **4.5.1. Lymphoblastoide T-Zell-Lymphome**

Die Tumorentstehung wird als mehrstufiger Prozess verstanden. Er beginnt mit der unkontrollierten Proliferation von Zellen und führt über klonale Selektion und Immortalisierung zur Entwicklung einer invasiven und metastasierenden Neoplasie. Die Umlagerung der VDJ-Gensegmente ist die spezifische „Visitenkarte“ des Zellklons, die auch bei einer neoplastischen Entartung erhalten bleibt. Die Untersuchungen der TZR-Umlagerungen der LTZLs ergaben, dass mehr als die Hälfte (58,3%) der untersuchten T-Zell-Tumoren monoklonalen Ursprungs war. Da niemals mehr als zwei V $\beta$ -Ketten amplifiziert werden konnten, diese aber nicht mit Bestimmtheit einer monoklonalen Population mit zwei TZR oder zwei einzelnen monoklonalen Populationen zugeordnet werden konnten, wurden die übrigen 41,7% als Tumoren monoklonalen/biklonalen Ursprungs bestimmt. Zusätzlich konnte aufgrund der N<sub>1</sub>DN<sub>2</sub>-Sequenzen eine engere Verwandtschaft der biklonalen Tumoren ausgeschlossen werden. Das bedeutet, dass die Tumoren aus maximal zwei verschiedenen Ursprungszellen entstanden sind, die nicht miteinander verwandt waren. Eine weitere Auffälligkeit der LTZLs bestand in der Tatsache, dass hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von der Entartung zu Tumorzellen betroffen waren (89%). Diese aber von frühen unreifen doppelt negativen über doppelt positive bis hin zu reifen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in allen Entwicklungsstufen enthalten waren. Durch die massiv erhöhte Frequenz der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist auch die

Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es in diesen Zellen zu fehlgeleiteten Signalen kommt, die wiederum die Entstehung von Tumoren begünstigen könnten. Darüber hinaus spricht das Auftreten der Tumoren in allen Entwicklungsstufen der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für andere somatische Ereignisse, die anscheinend in jedem dieser Stadien auf die sich entwickelnden T-Zellen einwirken können.

#### **4.5.2. Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome**

Die Untersuchung der Klonalität der klassifizierten DLBZL-Mäuse beschränkte sich aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials auf vier Tumorproben. Die Verteilung der Klonalität in diesen untersuchten Tumoren ist daher für die Gesamtheit der diagnostizierten DLBZL nicht vollständig übertragbar. Deshalb wurden zusätzlich IgH-Umlagerungen von nicht-klassifizierten Tumorproben durchgeführt. Diese ergaben, dass auch in den DLBZL über die Hälfte der Tumoren (55,6%) monoklonalen Ursprungs waren. Bei den DLBZL war es allerdings nicht möglich die Anzahl der Ursprungszellen der oligoklonalen Tumoren zu bestimmen. Auch mit Hilfe der anschließenden Sequenzierung konnten keine Rückschlüsse auf die Anzahl der verschiedenen Umlagerungen gezogen werden. Die Entwicklungsstadien der B-Zellen reichte, wie schon bei den T-Zell-Tumoren festgestellt werden konnte, von frühen Pro-B-Zellen bis hin zu B-Zellen eines reifen Phänotyps. Dies spricht auch bei den DLBZL für zusätzliche somatische Ereignisse, die während des gesamten Entwicklungsstadiums der B-Zellen eingetreten sein könnten.

#### **4.5.3. Hodgkin-Lymphome**

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung unter Verwendung eines Anti-CD30-Antikörpers konnte die Expression des CD30-Proteins auf der Membran der morphologisch typischen H/RS-Zellen in der Milz oder den Lymphknoten aller als HL-diagnostizierten Mäuse detektiert werden. Der Beweis, dass die H/RS-Zellen, wie beim Menschen, aus prä-apoptotischen B-Zellen des Keimzentrums entstanden, konnte in den DR4-P-Mäusen noch nicht erbracht

werden. 62,5% (5 von 8) der HL-Tumoren wiesen zusätzlich begleitende Tumoren auf, die durch immunhistologische Methoden als lymphoblastoide Lymphome (LTZL, DLBZL-HA, SMZL) diagnostiziert wurden. Die Analyse der Umlagerungen der IgH-Region bestätigte diese Diagnose. So traten bei den IgH-Amplifikationen sowohl Tumoren monoklonalen (66%) als auch oligoklonalen (33%) Ursprungs auf. Nach der TZR-Analyse der Proben No. 87 und No. 118 konnten weniger deutliche Ergebnisse bestimmt werden. So konnte nicht genau definiert werden, ob die jeweils vier V $\beta$ -Ketten, die nach PCR und Sequenzierung „funktionelle“ TZR-Sequenzen hervorbrachten, auf oligoklonale Tumoren, reaktive T-Zell-Klone oder einer Kombination aus beiden zurückzuführen waren. Nur in einer der mittels TZR-Analyse untersuchten HL-Tumorprobe wurde ein LTZL diagnostiziert. Deshalb wurde für diese Probe angenommen, dass es sich bei den vier TZR-Sequenzen um einen oligoklonalen Tumor handelte. Dies wäre eine weitere Gemeinsamkeit der Hodgkin-ähnlichen Lymphome aus der Maus mit dem humanen System. Denn Roers und Kollegen beschrieben bereits 1998 dieses Phänomen der begleitenden oligoklonalen T-Zell-Tumoren im Hodgkin-Lymphom, die mittels TZR-Repertoire-Analysen der V $\beta$ -Ketten detektiert wurden und ebenfalls hauptsächlich aus CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestanden (Roers et al., 1998). Zudem wurde im humanen System berichtet, dass die reaktiven T-Zellen, die im Infiltrat der HL-Tumoren zu finden waren, ein breit gefächertes (fast uneingeschränktes) Repertoire der TZR-Familien präsentierten (Re et al., 2005). Die Annahme, dass die begleitenden T-Zell-Tumoren aus kleineren Populationen bestehen, wurde durch die Tatsache unterstrichen, dass die Frequenz an T-Zellen in diesen Tumorproben zwischen 13 und 30% lag. Diese geringe Frequenz an T-Zellen könnte zudem dazu geführt haben, dass sie in den pathologischen Untersuchungen der Probe No. 87 (13% T-Zellen) nicht entdeckt wurden. Die vier potentiell funktionellen V $\beta$ -Ketten müssen sich also auf diese geringe Anzahl an T-Zellen verteilen. Dies spricht für ein sehr frühes Entwicklungsstadium dieser T-Zell-Tumoren bzw. reaktiven T-Zell-Klone, da die T-Zellen entweder nicht genügend Zeit zum Expandieren hatten oder die Proliferation durch unbekannte Faktoren behindert wurde. Im Gegensatz zu der geringen Frequenz an

detektierten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen waren allerdings Zellen des CD69<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>TCRab<sup>-</sup>-Phänotyps, also aktivierte Thymozyten, stark expandiert. Die starke Expansion dieser Zellen spricht für eine Transformation, die vermutlich zu der beobachtenden, starken Proliferation der Zellen führte. Diese Zellen sind aller Wahrscheinlichkeit nach den  $\delta\gamma$ -T-Zellen zuzuordnen, da CD90 erst von T-Zellen exprimiert wird, die schon ihren TZR ausgebildet haben und es sich bei dieser Population nachweislich nicht um einen  $\alpha\beta$ -TZR handelte. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die CD90 stark an der Oberfläche exprimieren, produzieren hauptsächlich IFN $\gamma$  (Azuara et al., 1998). Die Involvierung von monoklonalen  $\gamma\delta$ -Umlagerungen in der Pathogenese der humanen Hodgkin-Lymphome wurde schon mehrfach beschrieben (Al Saati et al., 1997; Quintanilla-Martinez et al., 1999). Allerdings ist die Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Tumormilieu noch nicht vollständig geklärt. Diese Zellen werden, wenn sie nachweislich durch IL-2 aktiviert wurden, als LAK-Zellen (Lymphokin aktivierte Killerzellen) bezeichnet. Angestellte Vermutungen zielen hauptsächlich auf die Funktion eines zytotoxischen Vermittlers hin, wobei die Liganden, die an die  $\gamma\delta$ -T-Zellen binden könnten, in den verschiedenen Tumoren noch nicht bekannt sind (Moris et al., 1999).

Diese riesigen H/RS-Zellen waren hauptsächlich von Histiozyten (Gewebsmakrophagen), großen aktivierten T- und B-Lymphozyten und eosinophilen Zellen umgeben, was auch bereits sehr früh bei der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms beschrieben wurde (Pinto et al., 1997). Die Infiltration mit eosinophilen Zellen geht, wie schon vorher beschrieben, mit einer Th<sub>2</sub>-Immunantwort einher. Ob dies auch bei den HL-Tumoren der DR4-P-Mäuse der Fall ist, konnte bislang nicht geklärt werden. Allerdings stellte sich nach dem Nachweis der kleinen oligoklonalen T-Zell-Populationen die „Huhn- oder Ei“-Frage: Was war zuerst da? Die H/RS-Zellen oder die begleitenden Tumoren? Beide Szenarien wären vorstellbar und sollen gedanklich kurz und vereinfacht aufgezeigt werden:

**1.)** H/RS-Zellen entstanden zuerst durch Störungen in der Aktivierung von B-Zellen bzw. fehlgeleiteten Signalen in der B-Zell-Entwicklung, wobei die B-Zellen und die H/RS-Zellen aus



der gleichen Ursprungszelle stammen. Die riesigen H/RS-Zellen tragen verkrüppelte Mutationen und verwerfen alle B-Zell-spezifischen Marker. Zudem sind sie in der Lage, selbst große Mengen an Zytokinen auszuschütten. Dieser regelrechte Zytokin-„boost“ veranlasst die umliegenden aktivierten, infiltrierenden Lymphozyten zur Proliferation und dazu ebenfalls Zytokine auszuschütten. Dies wiederum kann zu Fehlern in deren Entwicklung führen. Zellen entarten und gesellen sich als Begleittumoren zu den H/RS-Zellen.

**2.)** Aufgrund der massiven Erhöhung an  $CD4^+$ -T-Zellen kommt es bei diesen Zellen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit öfter zu Mutationen bzw. Fehlern in deren Entwicklung. Dennoch werden verschiedene Zytokine ausgeschüttet, die zur Aktivierung von B-Zellen führen. Aus noch unbekanntem Gründen entwickeln sich aus diesen Zellen die riesigen H/RS-Zellen. Die umliegenden B-Zellen entarten ebenfalls, tragen aber im Gegensatz zu den H/RS-Zellen noch Marker von B-Zellen auf der Oberfläche. Umliegende Tumoren aus B-Zellen sind mit den H/RS-Zellen verwandt.

Um dieses Gedankenexperiment zu Ende zu bringen, sollen im Folgenden einige Fakten der Ergebnisse mit eingebracht werden:

- A) Die erhöhte Frequenz an  $CD4^+$ -T-Zellen kann bereits in jungen transgenen Mäusen in allen lymphoiden Organen detektiert werden.
- B) Bis zu einem Alter von etwa 6 Monaten gibt es in diesen Mäusen keine Hinweise auf transformierte Zellen.

Dies sind zwei essentielle Hinweise, die eher auf die zweite Hypothese hindeuten, dass nämlich der Ursprung der H/RS-Zellen möglicherweise indirekt der erhöhten Frequenz an  $CD4^+$ -T-Zellen und dadurch einer erhöhten Transformationsrate der  $CD4^+$ -T-Zellen zuzuordnen ist. Diese kann nachweislich in jedem Entwicklungsstadium der T-Zellen auftreten. Vielleicht ist also ein bestimmter Reifegrad und Aktivierungszustand der T-Zellen notwendig, in dem bestimmte Zytokine wie z.B. IL-13 ausgeschüttet werden. Darüber hinaus könnten diese Zellen andere Zellen stimulieren, um ebenfalls Zytokine zu produzieren. IL-13

ist in der Lage H/RS-Zellen in autokriner Form zu stimulieren. Des Weiteren könnten Signale des TZR eine wichtige Rolle spielen, die beispielsweise über eine Trat1-Aktivierung vermittelt werden. Allerdings ergibt sich hier die Frage, wie die Entstehung von B-Zell-Tumoren in diese Theorie passt. Trat1 kann, sofern es phosphoryliert wurde, an die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase binden. Diese Kinase spielt eine wichtige Rolle im PI3K-Signalweg, der in der Signalvermittlung des BZR und TZR und somit bei der Differenzierung von T- und B-Zellen involviert ist (Donahue et al., 2004; Fruman et al., 2004). Vielleicht kann Trat1 auch einen funktionellen BZR imitieren, ebenso wie die latenten EBV-Membranproteine LMP1 und LMP2A in B-Zellen, die nicht in der Lage sind einen funktionellen BZR zu produzieren. Dies könnte die fehlerhaften Zellen davor bewahren in Apoptose zu gehen. Darüber hinaus könnte die verminderte Frequenz an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dazu beitragen, dass die erforderliche Anti-Tumorantwort ausbleibt. Durch die Masse an Zytokinen, die von H/RS-Zellen sezerniert werden, könnte es dann aufgrund fehlerhafter proliferativer Ereignisse zur Entstehung weiterer Tumoren kommen. Somit könnten beide angestellten Hypothesen miteinander verbunden werden. Die Tatsache, dass nur eine geringe Anzahl an Mäusen HL-Tumoren entwickelten, diese aber häufig von anderen Tumoren begleitet wurden, sprach für akkumulierende Ereignisse, die aber nicht immer zwangsläufig zu dieser speziellen Tumorgenese führen müssen. Dies könnte davon abhängig sein, ob bestimmte Ereignisse zu speziellen Zeitpunkten eintreten oder nicht. Demzufolge entstehen dann entweder T-Zell-, B-Zell-, HL-Tumoren, andere oder keine Tumoren.

## 5. Ausblick

Die diagnostizierten Hodgkin-Lymphome in den DR4-transgenen Mäusen sind mit Sicherheit das „Highlight“ dieser Arbeit, da diese Erkrankung bei Mäusen noch nicht beschrieben wurde. Im Unterschied zum Hodgkin-Lymphom beim Menschen, das bei 40% der Patienten EBV-positiv getestet wird, ist bei den DR4-P-Mäusen kein gamma-Herpesvirus involviert. Der Mechanismus der HL-Entstehung im Menschen ist bei den restlichen 60% der EBV-negativen Patienten noch nicht aufgeklärt worden. Allerdings vermuten Kollegen, die an der Erforschung dieses Mechanismus arbeiten, eine Involvierung eines Onko- oder Suppressorgens (Vortrag von Prof. Ralf Küppers, Oktober 2006 in München), das bislang aber noch nicht bestimmt werden konnte.

Um den genauen Mechanismus aufzuklären, der unter der Beteiligung von *Trat1* zu einer Begünstigung der Entstehung hämatopoietischer Tumoren führen könnte, müssen also noch weiterführende Experimente folgen. Hier sind mehrere Richtungen denkbar:

Trotz fehlender Beweise, dass „long-range“-Effekte weiter reichen können als 1 MB, sollte die Möglichkeit des Einflusses der Transgen-Integration auf das 8,7 MB entfernte *Trat1*-Gen untersucht werden. Beispielsweise könnte man in einem geeigneten Vektor das *Trat1*-Gen unter die Kontrolle eines murinen MHC-Klasse-II-Promotors oder unter einen stark konstitutiv aktiven Promotor stellen, wie zum Beispiel den Zytomegalie-Virus-Promotor (CMV). Dieser Vektor könnte durch retrovirale Infektion von Bl6-Stammzellen in diese Mäuse transferiert werden. Würden die Bl6-Mäuse dann auch Tumoren entwickeln, so würde das unsere Theorie bestätigen, dass die Integration des DR4-Transgens durch einen „long-range“-Effekt auf *Trat1* tatsächlich in enger Verbindung mit der Tumorentstehung steht. Die Vergleiche mit den verschiedenen Promotoren könnte klären, ob eine transgene Klasse-II-Transkription benötigt wird, oder ob die Integration multipler DR4tg Kopien zu bedeutenden chromosomalen Veränderungen führte, so dass „long-range“-Effekte die Transkription weit entfernter Gene beeinflussen könnten. Darüber hinaus sollten Experimente folgen, die die

Interaktionen von Trat1 mit anderen Adapter-Proteinen aufklären können. Ein wichtiger Faktor wäre zudem die Oberflächenexpression von Trat1 auf verschiedenen Zelltypen zu testen. Nachdem nur ein Trat1-Antikörper auf dem Markt erhältlich ist, der in unserem Labor aber keine spezifischen Signale lieferte, könnte die Antikörper-Service-Einheit in der GSF (IMI) unter der Leitung von Dr. Elisabeth Kremmer einen Trat1-spezifischen Antikörper produzieren, um so nachfolgende Untersuchungen zu ermöglichen.

Zudem sollten weitere Untersuchungen in der DR4-F1-Generation folgen, die Aufschluss über die Frequenz von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in diesen heterozygoten Mäusen geben können. Außerdem sollte geklärt werden, ob die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen hauptsächlich den Th<sub>1</sub>- oder Th<sub>2</sub>-Zellen zuordnen sind.

Auch die Zucht einer DR4-F2-Generation könnte Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp der entstehenden Tumoren liefern.

Ein wichtiger Leitfaden für zukünftige Experimente ist zudem die Aufklärung der Umstände, die zu der Entstehung der Hodgkin-Lymphome bei den DR4-P-Mäusen führen. Die Aufklärung dieser Mechanismen ist deshalb so wichtig, da sie Hinweise für die Entstehung des Hodgkin-Lymphoms in den 60% der Patienten liefern könnten, die als EBV-negativ gelten. Vielleicht spielt das Onkogen Trat1 hier eine tragende Rolle (siehe Abschnitt zu HL). Zudem sollten Untersuchungen auf Einzelzell-Ebene folgen, die bestätigen, dass die HLs wie beim Menschen aus prä-apoptotischen Keimzentrums-B-Zellen mit „verkrüppelten“ („crippled mutations“) Mutationen entstanden sind. Hierfür muss eine Technologie etabliert werden, die es ermöglicht, aus in Paraffin eingebetteten Geweben Produkte mit einer Größe von über 350 bp zum Beispiel fragmentarisch zu amplifizieren. Es sollen auch umliegende Zellen der riesigen H/RS-Zellen in dieser Weise untersucht werden, um Verwandtschaftsgrade zwischen diesen Zellen bestimmen zu können.

Da es für das Hodgkin-Lymphom noch kein Tiermodell gibt, wäre das längerfristige Ziel die Informationen, die durch die Analysen der DR4-P-Maus herausgefunden wurden, zu

benutzen, um das erste HL-Mausmodell zu etablieren. Da diese HL-Tumoren in nur wenigen Mäusen detektiert werden konnten, wird es notwendig sein, biologische Marker zu finden, die eine Erkennung der Tumoren in frühen Entwicklungsstadien ermöglichen. Damit könnte bestimmt werden, ob die meisten Mäuse die Lymphome ausbilden auch H/RS-Zellen besitzen. Dies würde es der DR4tg-Maus erlauben unmittelbar als Mausmodell für das Hodgkin-Lymphom zu dienen. Ersatzweise könnte die Generation einer neuen Maus-Linie, in der *Trat1* konstitutiv aktiviert ist, Hinweise darauf liefern, ob das *Trat1*-Gen ein kritisches Onkogen in der Entstehung der Hodgkin-Lymphome in DR4tg-Mäusen ist und würde somit ein direkteres Modell für dieses wichtige Lymphom darstellen.

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Probenaufbereitung der Maus-Organen

Aus den Organen (Milz, Lymphknoten, Thymus, Leber usw.) und dem Blut und Knochenmark der abgetöteten Mäuse wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, um anschließend die DNA oder RNA zu isolieren. Dabei wurden die Organe kleingeschnitten und durch ein feines Sieb gedrückt. Die Einzelzellsuspensionen wurden dann als Ausgangsmaterial für die Isolierung von DNA/RNA verwendet oder für andere weiterführende Versuche (FACS, magnetische Sortierung, usw.).

Eine RNA-Isolierung mit Tri-Reagent wurde nur durchgeführt, wenn die Mengen des Ausgangsmaterials sehr gering ( $>1 \times 10^6$ ) waren.

### 6.2. RNA Isolierung (Tri-Reagent )

#### Reagenzien:

Tri-Reagent; Sigma

Chloroform; Sigma

Isopropanol, Merck

75% Ethanol, Merck

HPLC-Wasser, Merck

#### Homogenisation

- 200  $\mu$ L Tri-Reagent pro  $1 \times 10^6$  Zellen auf Zellpellet geben und durch Auf- und Abpipettieren gut vermischen.
- 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen lassen.

#### Phasentrennung

- 40  $\mu$ L Chloroform (bzw. 1/5 Volumen) zum Homogenisat zugeben (RNA-Extraktion).
- 15 Sekunden vortexen und anschließend 10 Minuten bei RT stehen lassen.
- Die Suspension für 15 Minuten bei 4°C und 12000 UpM abzentrifugieren.
- Obere farblose wässrige Phase (RNA) in neues Eppendorfgefäß überführen (ca. 60% des Volumens).

*[DNA in der Interphase + Proteine in der unteren roten organischen Phenol-Chloroformphase, eventuell bei 4°C für DNA-/Proteinisolierung aufheben]*

**RNA-Präzipitation**

- 100 µL Isopropanol (bzw. 1 Volumenanteil) zugeben und vortexen.
- 10 Minuten bei RT stehen lassen.
- 12 Minuten bei 4°C und 12000 UpM abzentrifugieren.

**Waschen der RNA**

- Überstand verwerfen.
- Pellet mit 500 µL 75% Ethanol (in DEPC-H<sub>2</sub>O) waschen und vortexen.
- 8 Minuten bei 4°C und 12000 UpM abzentrifugieren.

**Lösen der RNA**

- Überstand verwerfen und RNA-Pellet 3-5 Minuten lufttrocknen lassen.
- Pellet zum Lösen in 20 µL HPLC-Wasser mindestens 30 Sekunden lang Auf- und Abpipettieren.
- RNA bei 55°C 10 Minuten inkubieren um Sekundärstrukturen zu zerstören.
- Konzentration bestimmen und RNA bei -20°C für ein paar Wochen oder für längere Zeit bei -70°C lagern.

**6.3. RNA-Isolierung mit dem RNeasy-Kit der Firma QIAgen**

Die Isolierung von RNA aus Einzelzellsuspensionen wurde hauptsächlich mit Hilfe von Säulchen und dem RNeasy-Kit von QIAgen durchgeführt.

Die Isolierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Einzige abweichende Schritte waren die Aufnahme des Eluats in HPLC-Wasser und der erst anschließende DNase-Verdau der Proben.

**6.4. DNase-Verdau (Promega)**

Um Verunreinigungen mit DNA auszuschließen, wurden die gereinigten RNA-Proben einem DNase-Verdau mit Reagenzien von Promega unterzogen.

**Reagenzien:**

10 x Reaktions-Puffer, Promega

DNase I, Promega

Stop-Lösung, Promega

- Volumen der RNA-Probe ermitteln.

- 10x Reaktionspuffer (1/10 des RNA-Volumens) und DNase I (1/20 des RNA-Volumens) zugeben und gut mischen.
- 12 Minuten bei 37°C inkubieren.
- Stop-Lösung (1/20 des Ausgangs-Volumens) hinzufügen und gut mischen.
- Bestimmung der RNA-Konzentration oder Lagerung bei -20°C bzw. -80°C.

### 6.5. DNA Isolierung aus Einzelzellsuspensionen (QIAgen-Kit)

Die Isolierung von DNA aus Einzelzellsuspensionen wurde über Säulchen mit dem DNA-Isolierungs-Kit von QIAgen erreicht.

Die Isolierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Einziger abweichender Schritt war die Aufnahme des Eluats in HPLC-Wasser.

### 6.6. Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration

Zur quantitativen Konzentrationsbestimmung der RNA- und DNA-Lösungen wurde mit dem Spektralphotometer die Absorption (OD=optische Dichte) bei 260nm bestimmt. Dazu wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O meist 1:50 verdünnt, so dass die Extinktionswerte etwa in dem Bereich von 0.1-1 zu erwarten waren. Die Konzentration der Probe lässt sich durch folgende Formel ermitteln:

$$c \text{ (}\mu\text{g/mL)} = \text{OD}_{260} \text{ (DNA)} \times 50 \times \text{Verdünnung}$$

$$c \text{ (}\mu\text{g/mL)} = \text{OD}_{260} \text{ (RNA)} \times 40 \times \text{Verdünnung}$$

Zur Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren wurde das Verhältnis  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  gebildet. Für eine ausreichend reine RNA/DNA sollte dieses Verhältnis  $2.0 \pm 0.2$  ergeben (Mühlhardt et al., 2002). Kleinere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigung mit Substanzen, die bei 280 nm absorbieren (z.B. Proteine, Phenol).

### 6.7. cDNA-Synthese mit dem AMV-Kit der Firma Roche

Die Synthese einzelsträngiger cDNA aus RNA wurde hauptsächlich mit dem AMV-cDNA-Synthese-Kit der Firma Roche durchgeführt.

Endkonzentration (x1)	Ansatz
Template RNA	variabel 1 µg (max. 11,2 µL)
10x Reaktions-Puffer	2 µL (1x)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µL (5 mM)
dNTPs	2 µL (1 mM)
Oligo-p(dT) <sub>15</sub> Primer	2 µL (1,6 µg)



RNase Inhibitor	1 µL (50 units)
AMV reverse Transkriptase	0,8 µL (20 units)
H <sub>2</sub> O <sub>HPLC</sub>	variabel ad 20 µL
Gesamtvolumen 20 µL	

cDNA-Synthese-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Annealing	25°C	10 Minuten
2. Reverse Transkription	42°C	60 Minuten
3. AMV Denaturierung	99°C	5 Minuten
4. Kühlen	4°C	Pause
Dauer: 1h 17 Minuten		

Die cDNA anschließend auf Eis stellen und mit einer RT-PCR fortfahren oder die cDNA bei -20°C lagern.

Für die Versuche des RT2Profiler™ PCR Array (NFκb-Array) wurde die cDNA unter Verwendung des Superarray-Kits synthetisiert.

## 6.8. cDNA-Synthese mit Superarray-Kit

Präparation des Annealing-Mix:

Annealing Mix (1x)	Ansatz
Total RNA	1,6 µg
Puffer P	1 µL
RNase-freies H <sub>2</sub> O	variabel ad 10 µL
Gesamtvolumen	10 µL

- 1 µL Gesamt-RNA als Kontrolle aufheben.
- Ansatz gut mischen und kurz abzentrifugieren.
- Im Thermo-Cycler 3 Minuten bei 70°C inkubieren, anschließend auf 37°C abkühlen und 10 Minuten inkubieren.
- In der Zwischenzeit den RT-Cocktail vorbereiten.

Herstellung des RT-Cocktails:

RT-Cocktail (1x)	Ansatz
Puffer BC (5x RT-Puffer)	4 µL
RNase-freies H <sub>2</sub> O	4 µL
RI (RNase Inhibitor)	1 µL
RE (Reverse Transkriptase)	1 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	10 µL

- RT-Cocktail 1 Minute bei 37°C vorwärmen.

#### **cDNA-Synthese:**

- 10 µL des RT Cocktails dem 10 µL Annealing-Mix zugeben und gut vermischen.
- Im Thermo-Cycler bei 37°C 60 Minuten inkubieren. Auf 95 °C aufheizen und weitere 5 Minuten inkubieren, um die RNA zu degradieren und die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.
- 80 µL ddH<sub>2</sub>O zu jedem 20 µL cDNA-Synthese-Ansatz zugeben und gut mischen.
- Die cDNA auf Eis stellen oder bei -20°C lagern.

#### **6.9. Primerdesign und Arbeitslösung**

Die verwendeten Primer wurden entweder aus Datenbanken bzw. Publikationen übernommen oder selbst ausgewählt. Hierfür wurde die Software „Primer3“ zu Hilfe genommen, wobei die folgenden Bedingungen für eine Auswahl zutreffen sollten:

- Der GC-Gehalt der Primer sollte zwischen 40-60% betragen und die Annealing-Temperatur eines Primer-Paares (5'-Sense & 3'-Antisense) in einem Bereich zwischen 55-65°C liegen, da eine niedrigere Temperatur das Entstehen von Primer-Dimeren begünstigt.
- Die Länge der Oligonukleotide sollte zwischen 18-25 Nukleotiden liegen.
- Die Primer sollten nicht komplementär zueinander sein, um Primer-Dimer-Bildung zu verhindern.

Alle Primer wurden von der Firma MWG bezogen. Die gelieferten lyophilisierten Primer wurden entsprechend in HPLC-Wasser gelöst, um eine Stocklösung von 100 pmol/µL zu erhalten. Die Arbeitslösungen wurden durch eine 1:10 Verdünnung erhalten, so dass diese 10 pmol/µL enthielten. Die Sequenzen der Primer sind dem Anhang zu entnehmen.

### 6.10. NF $\kappa$ B-Array mit dem RT2-Profiler-Kit der Firma Superarray

Der RT2-Profiler-Assay basiert auf einer quantitativen PCR in einem 96-Well-Format. Die Platten, in denen die Primer bereits vorpipettiert sind, werden bei -20°C gelagert.

- Platte kurz auftauen und abzentrifugieren, auf Eis stellen.

Proben-Vorbereitung:

**Cocktail #1** für die Wells A1 bis H5:

Folgende Komponenten in ein Multi-Channel-Reservoir pipettieren:	
2x SuperArray PCR Mastermix	1225 $\mu$ L
verdünnter cDNA-Synthese-Ansatz	98 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	1127 $\mu$ L
Gesamtvolumen	2450 $\mu$ L

**Cocktail#2** für die Wells H6 bis H12:

- 100  $\mu$ L des 2xSuperArray-PCR-Mastermix und 100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O vermischen um den 1xPCR-Mastermix zu erhalten.

Ansatz der **Cocktail#2**-Kontrollen in einem 8-Well-Streifen:

- In den ersten fünf Wells des Streifens eine 10-fache, serielle Verdünnungen des Cocktails#1 ansetzen. Dafür 3  $\mu$ L des Cocktails#1 mit 27  $\mu$ L des Cocktails-2 vermischen. Diesen Vorgang vier Mal wiederholen:

Für die Wells	H6	H7	H8	H9	H10
Cocktail-2 vorlegen	27 $\mu$ L	27 $\mu$ L	27 $\mu$ L	27 $\mu$ L	27 $\mu$ L
Aus dem Well davor zugeben	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L

- Im sechsten Well des Streifens 1  $\mu$ L einer 1:100 Verdünnung der original Total-RNA mit 24  $\mu$ L des Cocktail#2 vermischen. Dieser Ansatz dient als "No Reverse Trankription-Kontrolle" (NRT) im Well H11.
- In das siebten Well des Streifens ein 25  $\mu$ L-Aliquot des Cocktail#2 zugeben. Dieser Ansatz dient als "No-Template-Kontrolle" (NTC) im Well H12.

Die vorbereitete Platte anschließend im ABI7300-Taqman-Gerät unter der Verwendung des folgenden Programms analysieren:

ABI7300-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	95°C	10 Minuten
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden
3. Annealing	60°C	1 Minute
4. Schmelzkurvenanalyse	95°C	15 Sekunden
	60°C	30 Sekunden
	95°C	15 Sekunden
Schritte 2-3 : 40 Zyklen		

### Auswertung

Die Analysen wurden mit Hilfe der SDSshell-Software von Applied Biosystems ausgewertet. Hierbei wurde die Ergebnisse anhand der Standardkurven berechnet. Hierfür wurde ein Excel-Formular verwendet, das von Superarray zu diesem Zweck online zur Verfügung steht ([www.superarray.com](http://www.superarray.com)).

### 6.11. PCR mit anschließender Fragmentanalyse

Fragmente des IgH-Lokus wurden mit folgenden Primern von MWG nach dem Protokoll von Kawamoto et al. (2000) amplifiziert. Der verwendete Antisense-Primer wurde am 5' Ende mit 6-FAM markiert und die Amplifikate mit HPLC-Wasser verdünnt.

#### Reagenzien und Geräte:

Größenstandard LIZ in HI-DI-Formamid 1:500 verdünnt, Applera

Verdünnte PCR-Produkte

Gummi-Septum, Applera

Genetic Analyzer ABI Prism 3730

- 12 µL der LIZ-HI-DI-Formamid-Mischung pro Probe in einer 96-Well-Platte vorgelegen.
- 1 µL der verdünnten (1:100) PCR-Produkte hinzufügen.
- Die Platte mit einem Gummi-Septum (Applera) verschliessen und bei 95°C 2 Minuten denaturieren. Danach sofort auf Eis stellen, um Renaturierung zu verhindern.
- Kurz abzentrifugieren und in das Analysegerät stellen

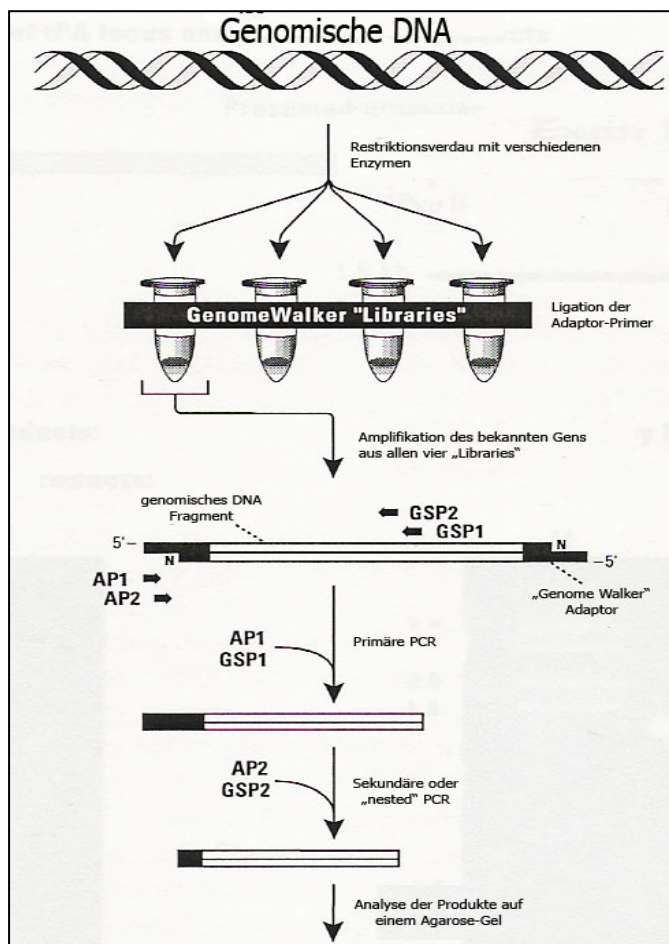
### Auswertung

Für die Auswertung der Elektropherogramme wurde das Programm GeneMapper, Version 3.5

(Applera), verwendet. Signale mit einer Fluoreszenzintensität unter 150 und über 10.000 "relative fluorescence units" (rfu) wurden als zu schwach bzw. als zu stark interpretiert und nicht ausgewertet. Eine Gaußsche Verteilungskurve wurde als polyklonale Zellpopulation interpretiert. Vor einem oligoklonalen Hintergrund musste ein Gipfel mindestens zwei- bis dreimal so intensiv fluoreszieren, damit die Zellpopulation als kleine monoklonale Population identifiziert wurde. Große monoklonale Populationen stellten sich als ein einzelner, deutlicher Gipfel dar oder waren in ihrer Fluoreszenz mindestens dreimal so intensiv wie die oligoklonale Hintergrundpopulation.

### 6.12. Genome Walking auf DNA Ebene

Die Bestimmung der exakten Integrationsstelle wurde mit Hilfe des Genome-Walker-Kits der



Firma Clontech durchgeführt. Diese Methode verbindet einen Restriktionsverdau der DR4tg-DNA mit einer Ligation spezieller Adaptoren, die die Bindestelle für die in dem Kit enthaltenen Primer ergeben. Durch Verwendung Zielgen-spezifischer Primer können so in einer ersten PCR-Runde spezifische Produkte für den ausgewählten Bereich amplifiziert werden. Diese werden als Template in die anschließende Nested-PCR eingesetzt. Die erhaltenen Amplifikate müssen dann nur noch sequenziert werden, um die Position der Zielsequenz im Genom zu bestimmen. Alle involvierten Versuche wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 6.13. Analyse des TZR-V $\beta$ -Repertoires

Das TZR-V $\beta$ -Repertoire wurde mittels RT-PCR und Sequenzierung untersucht. Die 21 5'-Primer (V-Region spezifisch) für die PCR wurden aus der Veröffentlichung von Pannetier et al. (1993) übernommen. Der 3' GC -Primer (C-Region spezifisch) wurde von der Arbeitsgruppe Mocikat übernommen. Am 5'-Ende des 3'-Primers befindet sich eine 40bp

lange GC-Klammer, durch die ein Einsatz der PCR-Produkte in der DGGE (denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese) ermöglicht wird.

Die Analyse des TZR-V $\beta$ -Repertoires wurde für eine Anwendung in einem „Speed-Cycler“ der Fima Analytik Jena in einem geringeren Volumen etabliert. So war es möglich, eine PCR in der Hälfte der Zeit (1,5h) durchzuführen.

Die 5'-Primer repräsentieren die 18 Familien der variablen (V-) Region der TZR- $\beta$ -Kette der C57BL6-Maus. Die Familien V $\beta$ 3, V $\beta$ 5 und V $\beta$ 8 sind in Unterfamilien aufgeteilt.

In jeder PCR gab es 22 Parallelansätze, die in einer speziellen 36-Well-Platte auf Eis angesetzt wurden. In jedem Ansatz wurde ein anderer 5'-Primer mit dem 3'-Primer eingesetzt. Ein Parallelansatz diente als Negativkontrolle und enthielt keine cDNA.

Endkonzentration (x1)	Pro Ansatz	Pro Platte (x22)
Template cDNA (Milz DR4tg-Tumor- Maus)	>1 $\mu$ L	20 $\mu$ L (ca. 1 $\mu$ g)
10x Puffer (Pharmacia)	2 $\mu$ L	44 $\mu$ L
dNTPs (Fermentas)	0,4 $\mu$ L	8,8 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (Roche)	0,4 $\mu$ L	8,8 $\mu$ L
5' V $\beta$ x	1,2 $\mu$ L	1,2 $\mu$ L
3' LiGC	1,4 $\mu$ L	30,8 $\mu$ L
Taq Polymerase (Pharmacia)	0,2 $\mu$ L	4,4 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O HPLC (Merck)	13,4 $\mu$ L	294,8 $\mu$ L
Gesamtvolumen 20 $\mu$ L		

Speed-Cycler-PCR-Programm für TZR-V $\beta$ -PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	94°C	2 Minuten
2. Denaturierung	94°C	15 Sekunden
3. Annealing	60°C	25 Sekunden
4. Elongation	72°C	30 Sekunden
5. Finale Elongation	72°C	5 Minuten
Schritte 2-4 : 40 Zyklen		

Die so amplifizierten Produkte hatten eine Länge von 188 bis 265 bp. Diese wurden mittels Gelelektrophorese zur Kontrolle auf ein 2% Agarosegel aufgetragen.

#### 6.14. PCR für IgH-Umlagerungen

Die Primer sowie das Protokoll und die PCR-Bedingungen wurden aus der Veröffentlichung von Kutemayer et al. (1992) übernommen. Die Primer wurden von Prof. Ralph Mocikat zur Verfügung gestellt.

#### 6.15. Quantitative PCR - Genexpressionsanalyse

Die quantitative „real-time-PCR“ mit Hilfe des LightCycler™ -Systems (Roche) ist eine hochsensitive Methode, um die Ausgangsmenge an mRNA einer Probe quantitativ zu bestimmen. Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass die Zyklenzahl, nach der die PCR-Reaktion in den linear-logarithmischen Bereich eintritt (d.h. näherungsweise Verdopplung der Amplifikatmenge nach jedem Zyklus), abhängig ist von der eingesetzten Transkriptmenge. Je größer die Ausgangsmenge, desto früher geht die PCR-Reaktion in den logarithmisch-linearen Bereich über. In dem Master-Mix für die qRT-PCR ist unter anderem der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green enthalten. SYBR-Green ist in der Lage, sich in doppelsträngige Nukleinsäuren einzubauen, was mit jedem Zyklus der Amplifikation zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität der Produkte führt. Diese Eigenschaft ermöglicht es, anhand der Fluoreszenz die quantitativen Mengen zwischen zwei Vergleichsproben zu ermitteln. Um die Ausgangsmengen an cDNA in den verschiedenen Proben relativ zueinander zu vergleichen, wird mit Hilfe der so genannten Kreuzungslinie („crossing-line“) ein bestimmter Fluoreszenzwert festgelegt. Die Kreuzungslinie sollte bei allen Experimenten den linear-logarithmischen Bereich der Kurve schneiden und auf der gleichen Höhe liegen, um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten. Diese wurde bei allen Versuchen auf den Fluoreszenzwert 0,000 gelegt. Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz der Amplifikate diesen Wert erreicht, entspricht dem Kreuzungspunkt (CP). Je höher die Zyklenzahl, desto niedriger die Menge an Ausgangs-cDNA.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, aber auch andere Gene im Hinblick auf Ihre Expression analysiert. Als Kontrolle wurde immer das Haushaltsgen 18S rRNA mitgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie deren spezifische Annealing-Temperatur sind dem Anhang zu entnehmen.

Endkonzentration (x1)	Ansatz
Template cDNA	2 µL
SYBR Green Mastermix (Roche)	4 µL
5' – Primer (10pmol/µL)	1 µL
3' – Primer (10pmol/µL)	1 µL
H <sub>2</sub> O (Roche)	12 µL
Gesamtvolumen 20 µL	

## LC-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	95°C	10 Minuten
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden
3. Annealing	55-67°C (siehe Anhang)	10Sekunden
4. Elongation	72°C	25 Sekunden
5. Kühlen	40°C	30 Sekunden
6. Schmelzkurvenanalyse	95°C	0 Sekunden
	65°C (0,1°C/s bis 99°C)	10 Sekunden
	99°C	0 Sekunden
Schritte 2-4 : 30-35 Zyklen		

Die Spezifität der PCR-Reaktion lässt sich über eine Analyse des Schmelzpunktes erkennen. Der Schmelzpunkt einer Nukleinsäure ist als die Temperatur definiert, bei der 50% der DNA als Einzelstrang vorliegt. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes wird der Thermoblock von 65°C auf 99°C mit 0,1°C/s aufgeheizt. Dabei wird kontinuierlich die Fluoreszenz der Proben gemessen. Durch Erhitzen wird die dsDNA denaturiert, wodurch das gebundene SYBR-Green frei wird und die Fluoreszenzintensität abnimmt.

**Auswertung:**

Sowohl die Schmelzkurvenanalysen, als auch die Festlegung der Kreuzungslinie und somit der Cp-Werte wurden mit Hilfe der Light-CyclerSoftware-v4.05 durchgeführt. Anschließend wurden die Cp-Werte mit Hilfe des Haushaltsges 18S RNA normalisiert und mit den jeweiligen Kontrollen, die auf den Wert 1 gesetzt wurden verglichen. Die Unterschiede wurden als x-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct-Wertes ( $\Delta\Delta Ct$ ) angegeben.

**Versuche zur MHV-Infektion**

Die Immunperoxidase Färbung in den Mausseren sowie die Koinkubation der Tumorzellen mit der Zelllinie BHK21 und den Mausseren mit NIH3T3-Zellen wurden von Dr. Heiko Adler IMI-GSF durchgeführt. Die Immunperoxidase-Färbung beruht auf dem Prinzip eines ELISA. Hierfür wurden die Seren verdünnt und auf MHV-68 infizierte NIH3T3-Fibroblasten gegeben. Die Antikörper im Serum der Tumormäuse sollten als Primäantikörper dienen, die an die vorhandenen Virus-Antigene binden. Als Sekundär-Antikörper wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes anti-Maus-IgG dazugegeben, welches wiederum spezifisch an vorhandene Maus-Immunglobulin-IgG binden könnte. Durch Zugabe eines Substrats, das Wasserstoffperoxid enthält, wird das enthaltene Chromogen, bei Anwesenheit von



Virusantigenen (anti-Virus-Ig + Detektions-IgG-Komplex) durch einen Farbumschlag sichtbar. Sind keine MHV-68 oder anderen Virus-Antikörper in der Kultur, so bleibt der Farbumschlag aus.

### 6.16. PCR für die Detektion von $\gamma$ -Herpesviren-DNA

Mit dieser PCR sollten potentiell vorhandene Transkripte generell von  $\gamma$ -Herpesviren (ORF50) und im speziellen von MHV-68 (M6) in den DR4tg-Mäusen amplifiziert werden. Die Primer für die kodierende Sequenz des ORF50 und des M6 (MHV-68-spezifisch) sowie die Positivkontrollen stellte uns Dr. Heiko Adler (IMI-GSF) zur Verfügung. Als Positivkontrolle für das ORF50 diente ein mit HindIII geschnittenes Plasmid, das den ORF50 aus dem humanen Herpesvirus 8 (HHV8) enthält. Als Positivkontrolle für das M6 diente sowohl ein Plasmid mit dem M6 als Insert als auch ein Bac-Klon, welcher das gesamte MHV-68 beinhaltet. Die Primer-Sequenzen sind im Anhang zu finden. Folgende Ansätze wurden pipettiert:

Endkonzentration (x1)	Pro Ansatz
Template Tumor-DNA o. Kontrollen	2 $\mu$ L
10x Puffer (Pharmacia)	4 $\mu$ L
dNTPs (Fermentas)	1 $\mu$ L
5' ORF50 o. M6 (5pmol/ $\mu$ L)	3 $\mu$ L
3' ORF50 o. M6 (5pmol/ $\mu$ L)	3 $\mu$ L
Taq Polymerase (Pharmacia)	0,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>HPLC</sub> (Merck)	26,5 $\mu$ L
Gesamtvolumen: 40 $\mu$ L	

PCR-Programm- $\gamma$ -Herpesviren:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	94°C	2 Minuten
2. Denaturierung	94°C	1 Minute
3. Annealing	60°C	1 Minute
4. Elongation	72°C	1 Minute
5. Finale Elongation	72°C	10 Minuten
Schritte 2-4 : 30 Zyklen		

### 6.17. Klonierung

Für die Bestimmung der Anzahl der integrierten Kopien mussten die spezifischen Exon-2 enthaltenden Bereiche der beiden Konstrukte in Vektoren kloniert werden (IE $\alpha$  in pcDNA3.1 und IE $\beta$  in pUC19). Hierfür mussten zunächst die leeren Plasmid-Vektoren amplifiziert werden.

### 6.18. Plasmid-Amplifikation

#### Transformation der Bakterien

Die Plasmid-Vektoren wurden alle in kompetente DH5 $\alpha$ -Bakterien (E.coli) transfiziert.

#### Reagenzien und Material:

25  $\mu$ L DH5 $\alpha$ -Bakterien pro Transformation, Invitrogen

100 ng Plasmid, Arbeitsgruppe Falk

LB-Medium (40 g LB Broth (Roth) in 2L H<sub>2</sub>O)

Agar-Platten mit 100  $\mu$ g/mL Ampicilin (10 g LB + 7,5 g Agar (Roth)/500 mL H<sub>2</sub>O), Invitrogen

- 100 ng der Plasmid-DNA zu 25  $\mu$ L DH5 $\alpha$ -Bakterien geben und gut mischen.
- 10 Minuten auf Eis inkubieren.
- 2 Minuten bei 37°C inkubieren.
- 50  $\mu$ L vorgewärmtes LB-Medium zugeben.
- Plasmid-Bakterien-Mix auf vorgewärmte Agar-Platte auftragen und gleichmäßig verteilen.
- Bei 37°C über Nacht inkubieren.
- Einzelne Kolonien picken und in 5 mL LB-Medium, das 100  $\mu$ g/mL Ampicilin enthält, 150 UpM bei 37°C 3 Stunden schütteln.
- Starterkultur in 60 mL LB-Medium übertragen und bei 37°C über Nacht mit 150 UpM schütteln.

#### Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde für die Klonierung mit dem Jetstar-Kit (2.0 Plasmid Maxi-Kit) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 6.19. Enzym-Restriktionsverdau

Anschließend wurden die folgenden Inserts (Sonden und Konstrukte) mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, die alle von NEB (New England Biolabs) bezogen wurden:

Plasmid-Vektor	Sonde/ Insert	Verdaut mit RE von NEB	Größe in bp	Versuch
T537	Env	SmaI	330	Retrovirale Insertion - Southern Blot
pcDNA3.1	IEa	EcoRI und KpnI		Bestimmung der integrierten Kopienanzahl – Multiplex PCR
pUC19	IEb	BamHI und PstI		

Sowohl die Konstrukte (IEa und IEβ) als auch die Vektoren (pcDNA3.1 und pUC19) wurden mit den gleichen Enzymen verdaut und anschließend über Nacht bei 16°C in die entsprechenden Vektoren ligiert.

Diese wurden anschließend in DH5α-Bakterien transformiert und die Prozedur bis zum Restriktionsverdau wiederholt. Nur die env-Sonde wurde mit SmaI aus dem Plasmid präpariert.

## 6.20. Kolonien-PCR („Kolonie“-PCR)

Zur Kontrolle, dass die Plasmide die Inserts (IEa und IEβ) aufgenommen hatten, wurde eine Kolonien-PCR durchgeführt. Hierbei wurden mehrere einzelne Kolonien gepickt und in den vorbereiteten 25 µL PCR-Ansatz übertragen.

Endkonzentration (x1)	Ansatz
Template	gepickte Kolonie
10x Puffer (Pharmacia)	2,5 µL
dNTPs (Fermentas)	1 µL
5' hEx2a Sense-Primer bzw. hEx2b	1 µL
3' hEx2a Antisense-Primer bzw. hEx2b	1 µL
Taq Polymerase (Pharmacia)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O <sub>HPLC</sub> (Merck)	19 µL
Gesamtvolumen 25 µL	

PCR-Programm (Kolonien-PCR):

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	94°C	5 Minuten
2. Denaturierung	94°C	30 Sekunden
3. Annealing	55°C	30 Sekunden
4. Elongation	72°C	30 Sekunden
5. Finale Elongation	72°C	10 Minuten
Schritte 2-4 : 34 Zyklen		

Alle positiven Klone konnten für eine weitere Plasmid-Amplifikation verwendet werden.

### 6.21. Multiplex-PCR zur Bestimmung der Anzahl der integrierten Konstrukte

Eine Multiplex-PCR ist eine Variante der PCR, die eine simultane Amplifikation mehrerer Zielgene, unter der Verwendung von mehr als einem Primer-Paar in einer Reaktion ermöglicht (Chamberlain et al., 1988). Diese Methode wurde für die Bestimmung der Anzahl der integrierten Transgen-Konstrukte verwendet. Dafür wurden zunächst Abschnitte der jeweiligen Exon-2-Sequenzen in verschiedene Vektoren kloniert: ein Teil der Exon-2-Sequenz des DR4-IE $\alpha$ -Konstruktes in den pcDNA3.1-Vektor und ein Teil der Exon-2-Sequenz des DR4-IE $\beta$ -Konstruktes in den pUC19-Vektor. Anhand einer speziellen Formel wurde dann ein Kopienstandard errechnet (siehe 3.2.4), der ebenfalls mittels Multiplex-PCR amplifiziert wurde.

Endkonzentration (x1)	Ansatz Kopienstandard	Ansatz Kopienbestimmung
Template DNA	Variabel: pcDNA3.1 (2,5-50 Kopien) Variabel: pUC19 (2-40 Kopien)	DR4tg DNA 1 $\mu$ L (100ng)
10x Puffer (Pharmacia)	5 $\mu$ L	4 $\mu$ L
dNTPs (Fermentas)	2 $\mu$ L	1,6 $\mu$ L
5' hEx2a und 5' hEx2b	2 $\mu$ L (je 1 $\mu$ L)	2 $\mu$ L (je 1 $\mu$ L)
3' hEx2a und 3' hEx2b	2 $\mu$ L (je 1 $\mu$ L)	2 $\mu$ L (je 1 $\mu$ L)
Taq Polymerase (Pharmacia)	1 $\mu$ L	0,8 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>HPLC</sub> (Merck)	variabel	28,6 $\mu$ L
Gesamtvolumen 50 $\mu$ L		Gesamtvolumen: 40 $\mu$ L

PCR-Programm (Multiplex-PCR):

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	94°C	2 Minuten
2. Denaturierung	94°C	30 Sekunden
3. Annealing	55°C	30 Sekunden
4. Elongation	72°C	30 Sekunden
5. Finale Elongation	72°C	10 Minuten
Schritte 2-4 : 31 Zyklen		

Der Vergleich zwischen den Kopienstandards und den integrierten Kopien wurde anhand optischer Analyse und der Gel-Illuminator Software (Gene Tool) berechnet.

## 6.22. Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten

Die amplifizierten Produkte wurden nach der Amplifikation, wenn nicht anders erwähnt, auf ein 1,2 % Agarose-Gel mit Ethidium-bromid (8  $\mu$ L/ 120 mL) aufgetragen und mittels Gelelektrophorese die Amplifikate der Größe nach aufgetrennt. Für die Größenkontrolle der Produkte wurde ein 1kb-plus Marker (Invitrogen) verwendet. Nach einer Laufzeit von 40-50 Minuten in einer Horizontal-Gelapparatur in 1xTAE bei einer Spannung von 120V wurden die Produktbanden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert. Ausgewählte Produkte wurden für nachfolgende Sequenzierungen aus dem Gel geschnitten und eluiert.

## 6.23. Gel Extraktion von PCR-Amplifikaten

Die Produkte der jeweiligen Amplifikate wurden mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract-II-Kit von Macherey-Nagel über Säulen aus dem Gel eluiert. Die Prozedur wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Ausnahme war die Aufnahme der aufgereinigten Amplifikate in H<sub>2</sub>O-HPLC.

## 6.24. Sequenzierung

Die Sequenzierung der eluierten Produkte wurde kommerziell von der Firma Sequiserve durchgeführt. Diese Sequenzen konnten anschließend für weiterführende „*in silico*-Analysen“ verwendet werden.

## 6.25. FISH-ANALYSE

### Chromosomenpräparation in der Metaphase

Die Herstellung von Metaphase-Chromosomenpräparaten aus den Maus-Lymphozyten der Mäuse DR4tg-529 und DR4tg-599 erfolgte aus Einzelzellsuspensionen der Milz. Alle weiteren Arbeitsschritte geschahen in Zusammenarbeit mit der Humangenetik-Gruppe von Dr. Michael Speicher an der Technischen Universität München (TUM).

Chromosomen sind nur erkennbar, wenn sie maximal kontrahiert, wie sie z.B. während der Zellteilung (Mitose) vorliegen. In der Metaphase sind die einzelnen Chromosomen am wenigsten kompakt. Das Colcemid behindert die Bildung der Spindelfasern und somit auch das Auseinanderweichen der Schwester-Chromatiden. Die Salzkonzentration der Kaliumchlorid-Lösung [KCl] außerhalb der Zellen ist niedriger als in der Zelle selbst. Durch den Effekt der Osmose erhöht sich das Zellvolumen, da durch die Zellmembran Wasser ins Innere der Zelle gelangt, um den unterschiedlichen Salzgehalt von Zelle und Umgebung auszugleichen. Ein größeres Zellvolumen bedeutet für die Chromosomen, dass sie mehr Platz

haben und sich deshalb besser ausbreiten können. Zudem ist das Chromatin aufgequollen und dadurch besser sichtbar. Die optimale Spreizung der Chromosomen kann durch das Auftropfen der Chromosomenlösung auf erwärmte Objektträger erreicht werden, so dass sie weit genug voneinander entfernt waren und sich nicht überlagerten

#### Reagenzien:

Chromosomenpräparations-Medium 50mL:

RPMI 1640 Medium + 10% Fetales Kälberserum (FCS), Invitrogen

1 mL MEM, GIBCO

1 mL HEPES, GIBCO

1 mL Natrium Pyruvat, GIBCO

60 µL β-Mercaptoethanol (50mM), Sigma

Pro 10 mL Chromosomenpräparations-Medium folgende Zusätze hinzugeben:

25 µg/mL Lipopolysaccharid (LPS), Sigma

6 µg/mL Concanavalin A (con A), Sigma

andere Reagenzien:

Colchicin (10 µg/mL) = Colcemid, Sigma

Kaliumchlorid (KCl) (75 mM) bei 37°C vorgewärmt, Merck

Fixativ (Methanol/Eisessig, 3:1) bei -20°C gekühlt, Merck

- Einzelzellsuspensionen 5 Minuten bei 1800 UpM abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Pellet in PBS lösen und Zellzahl bestimmen.
- $4 \times 10^6$  Zellen in 10 mL des vorgewärmten Chromosomenpräparations-Mediums aufnehmen und in eine kleine Kulturflasche transferieren
- Für 48 Stunden bei 37°C inkubieren.

#### Colcemid-Behandlung

- 0,1 µg/mL Colcemid zugeben und bei 37°C für 40 Minuten inkubieren.
- 10 Minuten bei 1000 UpM in einem Zentrifugenröhrchen abzentrifugieren und in 500 µL des Überstandes resuspendieren.

#### Fixierung

- Tropfenweise etwa 5 mL vorgewärmtes KCl zugeben und 24 Minuten bei 37°C inkubieren
- 1 mL frisch angesetztes, gekühltes Fixativ begeben, durchmischen und 10 Minuten bei 1000 UpM zentrifugieren.

- Fixativ bis auf etwa 500  $\mu\text{L}$  absaugen und Pellet erneut resuspendieren.
- Mit frischem Fixativ auf 10 mL auffüllen und Vorgang einige Male wiederholen, bis das Pellet weiß ist.
- Beim letzten Waschschrift bis auf 1 mL absaugen, Pellet vorsichtig resuspendieren und bis zum Auftropfen auf Eis lagern.

### **Auftropfen und Lagerung**

- Objektträger („Super Frost“) über Nacht in 100% Ethanol waschen und am nächsten Tag in Aqua bidest. (ddH<sub>2</sub>O) auf Eis oder im Kühlschrank lagern.
- Das Zell-Fixativ-Gemisch auf den feuchten angewärmten Objektträger auftropfen, überschüssige Flüssigkeit auf einem Tuch kurz abrinnen lassen.
- Objektträger auf einer 37°C Wärmeplatte, die mit einem feuchten Tuch ausgelegt ist, 1-2 Tage lufttrocknen lassen.

Die Chromosomenpräparate sollten vor der Hybridisierung altern. Hierfür kann man sie für etwa drei bis vier Tage bei Raumtemperatur lagern und stellt sie dann in 70% Ethanol bei 4°C in den Kühlschrank. Bei längerer Lagerung sollten die Präparate mit Silikagel bei - 80°C eingefroren werden.

### **Vorbehandlung der Präparate**

Um eine optimale Hybridisierung zu erreichen, muss störende RNA und überschüssiges Zytoplasma auf den Präparaten entfernt werden. Der Nachweis der Chromosomen weisen ohne Vorbehandlung ein inhomogenes Hybridisierungsmuster sowie viel Hintergrund (unspezifische Bindungen) auf. Eine Vorbehandlung setzte sich aus einem RNase – und Pepsin-Verdau zusammen.

### **RNase-Verdau**

#### **Reagenzien:**

2xSSC, Sigma

RNase, Invitrogen

- Die Objektträger kurz in 2xSSC äquilibrieren.
- 10  $\mu\text{L}$  RNase (1:100 von 10mg/mL) in 1mL 2xSSC zugeben und gut mischen.
- Auf die getrocknetenen Objektträger zwischen 200-250  $\mu\text{L}$  der RNA-Lösung pipettieren, mit Deckgläsern abdecken und eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubieren
- Deckgläser entfernen und 3x5 Minuten mit 2xSSC waschen (schütteln).

## **Pepsin-Verdau**

### **Reagenzien:**

1x PBS, Invitrogen

Pepsin, Stocklösung 10% (100mg/mL), Sigma

0,01 M HCl-Lösung, Merck

aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%), Merck

- Das Präparat 1x5 Minuten in 1xPBS äquilibrieren.
- Das Präparat in 50 mL 0,01 M HCl-Lösung, in die 15 µL der 10% Pepsin-Stocklösung zugegeben wurde, für 9 Minuten im 37°C Wasserbad inkubieren.
- Nach 1x5 Minuten Waschen mit 1xPBS im Schüttler das Präparat je 3 Minuten durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) ziehen, anschließend lufttrocknen lassen.
- Im Mikroskop kontrollieren, ob das Zytoplasma vollständig entfernt wurde. Falls nicht neue Alkoholserie ansetzen und Vorgang wiederholen.

## **Denaturierung der Objektträger**

### **Reagenzien:**

Denaturierungslösung für einen 50 mL-Ansatz:

35 mL Formamid reinst; Merck

15 mL 2x SSC, Sigma

pH 7,0 mit 1 M HCl, Merck

- Präparat für 2 Minuten bei 72°C in einer Küvette mit 70% Formamid/2xSSC pH 7,0 denaturieren.
- Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100% eiskaltes Ethanol) das Präparat dehydrieren.
- Anschließend Präparat lufttrocknen

## **Sonden-Präparation**

### **Amplifikation der transgen-spezifischen IE $\alpha$ - und IE $\beta$ -Sonden mittels PCR**

Um eine ausreichende DNA-Menge der Sonden, die spezifisch an das humane Exon-2 binden, zu erhalten, wurden die jeweiligen Proben in einem Ansatz sechs Mal amplifiziert.

Reagenzien pro Ansatz:



Endkonzentration (x1)	Ansatz
Template DNA (Milz DR4tg Maus)	2 µL (ca. 250ng)
10x Puffer (Pharmacia)	4 µL
dNTPs (Fermentas)	1 µL
5' hDR4a Sense-Primer bzw. hDR4b	1 µL
3' hDR4a Antisense-Primer bzw. hDR4b	1 µL
Taq Polymerase (Pharmacia)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O <sub>HPLC</sub> (Merck)	30,5 µL
Gesamtvolumen 40 µL	

PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	94°C	2 Minuten
2. Denaturierung	94°C	30 Sekunden
3. Annealing	60°C	45 Sekunden
4. Elongation	72°C	30 Sekunden
5. Finale Elongation	72°C	10 Minuten
Schritte 2-4 : 32 Zyklen		

Die Produkte der jeweiligen Amplifikate wurden vereint und mit dem NucleoSpin® Extract-II-Kit von Macherey-Nagel über Säulen aufgereinigt. Die Prozedur wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Ausnahme war die Aufnahme der aufgereinigten Amplifikate in H<sub>2</sub>O<sub>HPLC</sub>. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung im Spektralphotometer ermittelt.

### Markierung der Sonden mit Biotin

#### Reagenzien:

Je 1 µg der DNA-Sonden

Biotin-Chem-Link-Kit (Roche):

Lösung 1 (Biotin-Markierung)

Lösung 2 (Stop-Lösung)

- Zu 1 µg DNA-Sonde 1 µL von Lösung 1 pipettieren
- 30 Minuten bei 85 °C inkubieren.
- 5 µL der Lösung 2 dazu pipettieren
- Bei -20°C lagern oder mit Salz-Ethanol-Fällung fortfahren

### Salz-Ethanol-Fällung

Für eine in-situ-Hybridisierung muss die DNA der Sonden zunächst gefällt werden.

#### Reagenzien:

1 µg der Biotin-markierten DNA-Sonden (hDR4α und hDR4β)

3 M NaOAc (pH 5,2), Sigma

Ethanol absolut, eiskalt, Merck

- Zu den Sonden 10% des Volumens an NaOAc zugeben (bei 35 µL 3,5 µL NaOAc)
- Das 2,5-fache Volumen eiskaltes 100% Ethanol zugeben
- Bei -20°C über Nacht präzipitieren lassen

#### Vorbehandlung der gefällten Probe

Lachsspermien-DNA sättigt unspezifische DNA-Bindungsstellen ab (Supprimierung unspezifischer Wechselwirkungen) und dient zudem als „Carrier-DNA“ bei sehr geringen Probenkonzentrationen.

Cot-1-DNA besteht aus nicht-markierten repetitiven Sequenzen und sättigt durch Zugabe im Überschuss repetitive DNA-Sequenzen der Sonden-DNA ab (Cremer et al., 1988; Lichter et al., 1988).

#### Reagenzien:

70% Ethanol

70% deionisiertes Formamid (pH 7,0), Sigma

Maus Cot-1 DNA, 10 mg/mL, Roche

Lachsspermien-DNA (Salmon testis), 9,7 mg/mL, Sigma

40% Dextransulfat in 2xSSC, Sigma

ddH<sub>2</sub>O

- Den gefällten Ansatz bei 13000 UpM in einer Kühlzentrifuge 30 Minuten bei 4°C zentrifugieren.
- Nach Verwerfen des Überstandes 400 µL 70% Ethanol zum Waschen dazupipettieren und für 10 Minuten bei 13000 UpM nochmals zentrifugieren.
- Überstand wieder verwerfen, das Präzipitat bei 37°C etwa 2-3 Minuten im Heizblock lufttrocknen.
- Präzipitat in 10 µL ddH<sub>2</sub>O aufnehmen
- 5 µL Lachsspermien-DNA und 10 µL Maus Cot1-DNA zugeben

- Sonden für 25 Minuten bei 42°C in einer SpeedVac-Zentrifuge verdampfen lassen
- Pellet in 7 µL (3,5 µL pro Objektträger) resuspendieren und 30 Minuten bei 42°C inkubieren (schütteln)
- Das gleiche Volumen an 40% Dextran zugeben und 7 Minuten bei 77°C denaturieren
- Die denaturierte DNA 20 Minuten bei 42°C (ohne Schütteln) vorhybridisieren.

### **Hybridisierung (FISH)**

#### **Reagenzien und Material:**

Fixogum (Rubber cement), Marabu

15x15 mm Deckglas

denaturierte und vorhybridisierte DNA-Probe

vorbehandeltes und denaturiertes Chromosomen-Präparat (Objektträger)

- Nach dem Vorhybridisieren je 7 µL pro DNA-Probe vorsichtig auf das vorbehandelte und denaturierte Präparat luftblasenfrei pipettieren.
- Nach Auflegen eines 15x15 mm Deckglases das Deckglas mit Fixogum versiegeln, damit die darunterliegende, zu hybridisierende DNA nicht austrocknen kann.
- Das Präparat in einer Metallbox bei 37°C über mindestens 2 Nächte inkubieren.

### **Nachweis der hybridisierten Proben**

#### **Reagenzien:**

4x SSC/0,2% Tween-20 (42°C), Sigma

1x SSC (60°C), Sigma

Block-Lösung: 3% BSA in 4x SSC/0,2% Tween-20, Invitrogen

Antikörper für den Nachweis von Biotin :

Avidin Cy3.5, 1:300 verdünnt in 1% BSA; Amersham Biosciences

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol-2 HCl); Serva

Antifade: 15 mL p-Phenylendiamindihydrochlorid-Lösung, Serva

- Das Fixogum mit Hilfe einer Pinzette vom Präparat entfernen.
- Präparat 3x5 Minuten mit 42°C warmem 4xSSC/0,2% Tween-20 waschen (schütteln). Hierbei sollten die Deckgläschen von alleine abfallen.
- Anschließend 3x5 Minuten mit 60°C warmem 1x SSC waschen (schütteln).
- Nach kurzem Spülen in 4x SSC/0,2% Tween-20, das Präparat mit 1 mL 3% BSA 30 Minuten blocken (37°C, feuchte Kammer).

- Nach dem Blocken das Präparat wieder kurz mit 4x SSC/0,2% Tween-20 spülen (Entfernung der überschüssigen Block-Lösung).
- Antikörper-Stocklösung vor der Verdünnung für 2 Minuten bei 13000 UpM zentrifugieren, um Komplexbildungen zu vermeiden.
- 200 µL verdünnte Avidin-Cy3.5 Antikörper-Lösung (1:200 in 1% BSA) auf den Objektträger pipettieren.
- Das Präparat mit einem Deckglas bedecken und 45 Minuten bei 37°C (feuchte Kammer) inkubieren.
- Das Präparat 3x5 Minuten abgedunkelt mit 42°C warmem 4xSSC/0,2% Tween-20 waschen.
- Durch Aufbringen von 1 mL DAPI-Lösung auf das Präparat (0,5 µL DAPI in 15 mL 4xSSC/0,2% Tween-20) werden alle Chromosomen angefärbt. 2 Minuten stehenlassen.
- Nach Abspülen mit destilliertem Wasser das Präparat in Dunkelheit lufttrocknen und mit 35 µL Antifade eindeckeln (verhindert das Ausbleichen der Fluorochrome).

## **Auswertung**

### **Zeiss Axioplan Imaging II**

Dieses Mikroskop ist in X-, Y- und Z-Richtung motorisiert justierbar und erlaubt so die automatisierte Aufnahme eines Objektes in alle drei Ebenen. Über eine Axiocam-MRm CCD-Kamera werden die Fluorochrome als skalierbare zweidimensionale Grauwertbilder aufgenommen. Die Metaphasen wurden mit einem 63x Objektiv aufgenommen. Für die Bildaufnahmen wurde eine gekühlte Sensys-CCD (*charge coupled device*)-Kamera (Photometrics, Kodak KAF 1400 Chip) verwendet. Als Lichtquelle diente eine 100W-Quecksilberdampfampe. Die durch die DAPI-Färbung auftretende Spontanbänderung der Chromosomen diente zur Identifizierung der Chromosomen. Die Bilder wurden mit dem Computerprogramm Isis/V3.4.0 der Firma Metasystems aufgenommen und mit einer integrierten Software ausgewertet.

### **6.26. Southern-Blot nach Southern- Nachweis endogener Retroviren**

Durch die von Southern entwickelte Methode ist es möglich, die durch ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte DNA auf eine Membran zu transferieren. Durch das anschließende Hybridisieren der fixierten DNA auf der Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde können spezifische DNA-Fragmente als Banden auf der Membran detektiert werden. Dabei ist die Spezifität des Nachweises von der Spezifität der Sonde abhängig, die zu einem Teil der nachzuweisenden Region komplementär ist. Die Sonde wurde uns in Form eines Plasmidkonstruktes von Prof. Jörg Schmidt (AVM-GSF) zur Verfügung gestellt und hat als aufgereinigtes Insert eine Länge von 330 bp.

**Reagenzien:**

Ladepuffer, Fermentas

Verdaute DNA

1kb DNA-Marker, Invitrogen

0,25 M HCl, Merck

alkalischer Transferpuffer (0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl), Merck

2xSSC, Sigma

Southern-Blot-Komponenten

Die mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und BamHI verdaute Tumor-DNA der DR4tg- und Bl6-Mäuse wurde nach Zugabe von 1/10 Ladepuffer auf ein Ethidiumbromid-enthaltendes 1 % Agarosegel aufgetragen. Um später die Größe der detektierten Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen (1 kb DNA-Leiter). Nach der Auftrennung der DNA im Gel wurde dieses zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert.

- Das Gel für 20 Minuten in 0,25 M HCl auf Schüttler schwenken.
- Kurz mit Wasser spülen und 40 Minuten bei Raumtemperatur in alkalischem Transferpuffer (0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl) inkubieren.
- Blot aufbauen und 16 Stunden stehen lassen (über Nacht)
- Blot abbauen, Position der Geltaschen markieren und die Membran kurz in 2xSSC schwenken.
- Membran 2 Stunden bei 80 °C backen damit die DNA darauf fixiert wird.

Danach konnte der Blot für die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde vorbereitet werden.

**Hybridisierung der Southern-Blot Membran**

Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Membranen vorhybridisiert:

Den Blot in 2xSSC (0,3M NaCl; 0,03M NaCitrat) anfeuchten und in einem Glaszylinder in vorgewärmter Hybridisierungslösung (1M NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 10% Dextransulfat, 1% SDS, 250 µg/ml sonifizierte Lachssperma DNA) für mindestens 3 Stunden bei 64 °C im Hybridisierungsofen inkubieren.

**Markierung der Sonde**

Es wurden jeweils 50-100 ng Sonden-DNA mit 50 µCi α<sup>32</sup>-dATP mit Hilfe des „Random Prime Labeling Kit“ (Amersham Bioscience; Freiburg) nach Herstellerangaben markiert.

Anschließend wurde die markierte Sonde mit Hilfe einer G50-Sephadex-Säule (Amersham Bioscience; Freiburg) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

- Die Sonde 5 Minuten bei 100°C denaturieren und der Hybridisierungslösung beimischen.
- Die Membran 16 Stunden bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubieren
- Mit vorgewärmtem Waschpuffer bei 60°C waschen.

Die markierten Banden auf der Membran ließen sich im Anschluss mit einem fotosensitiven Film (Biomax MS PE Applied Biosystems 35x43 cm, KODAK Film) nachweisen.

### **6.27. Histologie**

Die Organproben wurden in 4%igem, gepuffertem Formalin (pH 7,4) fixiert und anschließend in die Pathologie der GSF geschickt. Dort wurden die Organe in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom (Microm, Walldorf) wurden 2-4 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Standardfärbung war Hämalaun-Eosin, die nach Romeis et al. (1989) erfolgte.

### **6.28. Immunhistochemie**

Immunhistochemische Färbungen wurden ebenfalls von der Pathologie der GSF durchgeführt und erfolgten maschinell mit einem NexEs-Färbeautomaten (Ventana Medical Systems, Tucson, AR, USA).

#### **Reagenzien:**

Xylol zum Entparaffinieren, Merck

Absteigende Alkoholreihe und aufsteigende Alkoholreihe, Merck

10 mM Zitratpuffer (pH 6, versetzt mit 0,1% TWEEN 20), Sigma

3% Ziegen Serum, Serotec

biotinylierter Primärantikörper CD30, Chemicon

Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen IgG, DAKO

3% Hydrogenperoxid-Lösung und 0,04%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma

Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex, DAB-Diaminbenzidin, Sigma

Hämalaun, Kupfersulfat-Lösung, Eukitt zum Eindeckeln

Zunächst wurden 1 bis 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach der Entparaffinierung mit Xylol wurden die Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und gründlich unter fließendem Leitungswasser gespült. Zur Antigendemaskierung erfolgte eine Hitzevorbehandlung.

- Die Schnitte in einen mit 10 mM Zitratpuffer gefüllten Mikrowellendampfdruck-Kochtopf stellen und 30 Minuten bei 1000W erhitzen (Antigendemaskierung).
- Präparate 20 Minuten in 3%igem Ziegenserum inkubieren, um unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers zu blockieren.
- 100 µL des verdünnten Primärantikörpers CD30 (1:50) bei 37 °C für 30 Minuten in der Maschine überschichten. Anschließend mehrmals spülen.
- Präparate 4 Minuten mit 3%iger Hydrogenperoxid-Lösung inkubieren, um endogene Peroxidase zu blockieren. Spülen.
- Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (200 µg/ml) für 8 Minuten. Spülen.
- Nochmals 8 Minuten mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (300 µg/ml) inkubieren und anschließend spülen.
- Das Chromogen [DAB (2 g/L)] und das Substrat (0,04%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 8 Minuten einwirken lassen
- 4 Minuten in einer gepufferten Kupersulfat-Lösung inkubieren.
- Gegenfärbung mit Häkalaun
- Präparate gründlich spülen

Anschließend erfolgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol. Als Eindeckmedium wurde Eukitt verwendet.

### **6.29. Mausstämme**

DR4-IE transgener Stamm (Ito et al., 1996)

C57BL6 (Taconic, Dänemark, Germantown): Wurden zur Verpaarung der DR4-F1 transgenen Mäusen verwendet, um einen heterozygoten Stamm bezüglich des DR4-Allels zu halten.

### **6.30. Präparation von Blutserum aus Mäuseblut**

Für die Gewinnung von Seren aus lebendigen Mäusen wurde das Blut aus der Schwanzvene abgenommen, wohingegen bei der Präparation der Mäuse das Blut direkt dem Herzen entnommen wurde. Anschließend wurde das Blut bei 2000 UpM abzentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Serum wurde vorsichtig in ein frisches Eppendorfggefäß übertragen und bei -20°C gelagert.

### **6.31. Luminex-System zur Bestimmung von Zytokinen aus Seren**

Für die Serumgewinnung wurde Herzblut aus Tieren entnommen und anschließend zentrifugiert (siehe Serumgewinnung). Das Serum wurde abgenommen und wie die

Kulturüberstände bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Zytokinanalyse aufbewahrt. Es wurde das BioPlex23-System der Firma Bio-Rad benutzt, mit dem 23 unterschiedliche Zytokine detektiert und quantifiziert werden konnten.

Das Luminex-System ermöglicht eine simultane Messung (Multiplex-Messung) mehrerer Zytokine im Serum oder Überstand einer Zellsuspension. Das System benutzt Polystyren-Kügelchen. Die Kügelchen können in verschiedenen Verhältnissen mit zwei Fluorophoren beladen werden. Es stehen jeweils 10 Farbabstufungen pro Fluorophor zur Verfügung, so dass es 102 mögliche Farbkodierungen für die Kügelchen gibt, theoretisch also 100 verschiedene Zytokine gleichzeitig in dem Kulturüberstand oder Serum gemessen werden können. Im ersten Schritt der Reaktion bindet ein monoklonaler Antikörper, der an ein  $5,5\ \mu\text{m}$  großes Kügelchen (mit bestimmter Eigenfluoreszenz kovalent) gebunden ist, an ein bestimmtes Zytokin. In einem weiteren Schritt bindet ein Biotin-markierter Antikörper an ein anderes Epitop des Zytokins. Diese Bindung wird wiederum über Phycoerythrin-(PE)-gekoppeltes Streptavidin quantifiziert. Die Messung erfolgt nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie: Durch Anregung der fluoreszenzmarkierten Beads ( $635\text{nm}$ ) kann das Zytokin klassifiziert (qualitativ) und durch die Anregung der PE-Moleküle ( $532\text{nm}$ ) kann die Menge der Zytokine (quantitativ) definiert werden. Im Reagenziensatz enthaltene Standardkonzentrationen der Zytokine ermöglichen eine Quantifizierung jedes Analyten über seine Standardkurve.

Die Vorbereitung und Messung der Tests folgte dem Herstellerprotokoll. Die Seren der Mäuse wurden 1:1 mit Serumverdünnungs-Lösung ("*Serum Diluent*", Bio-Rad) verdünnt, die auch als Negativkontrolle diente. Die Proben wurden zusammen mit den Standards und der entsprechenden Verdünnungsreihe auf einer 96-Well-Analysenplatte gemessen.

Der Kalibrierungsbereich für alle Zytokine lag zwischen  $32.000$  und  $1,95\ \text{pg/ml}$ . Die Konzentrationen der Analyten wurden automatisch von der Bio-Plex-Software berechnet.

### **6.32. Magnetische Anreicherung von T- und B-Zellen**

Die Zellen wurden mit Hilfe magnetischer Kügelchen separiert. Das Prinzip beruht auf der Inkubation der Zellsuspension mit Antikörpern, welche an super-paramagnetische Partikel gekoppelt sind, und anschließende Trennung der gebundenen von nicht gebundenen Zellen am Magneten. Dazu wurde das MACS-System von Miltenyi nach Angaben des Herstellers verwendet. Die angereicherten Fraktionen wurden anschließend im FACS auf Reinheit kontrolliert.



### 6.33. Durchflusszytometrie (FACS)

Im FACS kann man Zellen auf unterschiedliche intra- und extrazellulär vorhandene Strukturen durchflusszytometrisch untersuchen. Dabei werden die zu untersuchenden Molekülstrukturen von Antikörpern gebunden, an die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsspektren können diese verschiedenen Farbstoffe später im FACS voneinander getrennt werden. Die markierten Zellen werden durch eine Kapillare in das Durchflusszytometer eingesaugt und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488\text{nm}$  bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts ist dann jeweils von dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an die Detektoren weitergeleitet. Über die Software CellQuest oder FlowJo werden diese Informationen sichtbar und auswertbar gemacht. So können Aussagen über die Größe (Vorwärtsstreuung, FSC), die Granulation (Seitwärtsstreuung, SSC) und die Fluoreszenz (FL) der Zellen getroffen werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Antikörperkombinationen und FACS-Geräte verwendet:

FACS-Gerät	Standort	Versuch
FACS-CYAN	GMC-GSF	Immunophänotypisierung von peripherem Blut von DR4-P- und Bl6-Mäusen
FACS-Aria	ISF-GSF	Immunophänotypisierung von Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von DR4-P, DR4-F1- und Bl6-Mäusen
FACS-LSR2	IMI-GSF	Immunophänotypisierung von Blut, Lymphknoten, Milz und Thymus von DR4-P- und Bl6-Mäusen
FACS-CYAN	IMI-GSF	TZR-Analyse
FACS-CYAN	IMI-GSF	Überprüfung der mittels magnetischer Separation (CD4/CD19) angereicherter Zellen

Die Analyse der Knochenmarkszellen wurde in Zusammenarbeit mit der Hämatopoiesegruppe des Instituts für Stammzellenforschung unter der Leitung von Dr. Timm Schröder an der GSF etabliert (ISF-GSF).

In der Mauslinik der GSF (GMC-GSF) wurde unter der Anleitung von Dr. Svetoslav Kalaydjiev die verschiedenen Zellpopulationen im peripheren Blut (300 $\mu\text{L}$ ) auf die Expression von definierten Oberflächenantigenen hin analysiert. Die verwendeten Antikörper (ausgenommen der Antikörper, die im GMC verwendet wurden) sind dem Anhang zu entnehmen.

Für die verschiedenen Analysen wurden zwischen  $2,5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet.

**Reagenzien:**

PBS

10xEry-Lyse-Puffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 100 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA/TITRIPLEX), Sigma

FACS-Puffer (HBSS+2% FCS+ 0,1% NaAzid), Biochrom

Blocking-Puffer (FACS-Puffer mit FcgR)

Propidiumiodid, ICN

Antikörper (siehe Anhang)

- Definierte Anzahl an Zellen 5 Minuten bei 1700 UpM zentrifugieren und Überstand verwerfen.
- Optional: 5mL 1xEry-Lyse-Puffer auf resuspendiertes Zellpellet geben und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Ausnahmen: Stammzell-FACS, Proben aus Lymphknoten und Thymus.
- 5 Minuten bei 1700 UpM abzentrifugieren und in PBS waschen, Überstand verwerfen.
- Zellen in 50 µL FACS-Puffer aufnehmen und vorlegen.
- Antikörper oder Antikörper-Kombinationen in 50 µL Blocking-Puffer aufnehmen zu den jeweiligen Proben geben und 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubieren. Ausnahme waren Färbungen mit einem Fcγ-Rezeptor-Antikörper.
- PBS zugeben und 5 Minuten bei 1700 UpM abzentrifugieren. Überstand verwerfen und nochmals waschen.
- Optional: bei der Verwendung von biotinylierten Primärantikörpern, müssen hier die Sekundärantikörper zugegeben werden, für 30 Minuten inkubieren und waschen.
- Pellet in 1mL FACS-Puffer mit 100 µg/mL Propidium-Jodid aufnehmen und 5 Minuten stehen lassen.
- PBS zugeben und 5 Minuten bei 1700 UpM abzentrifugieren. Überstand verwerfen und in 200-300 µL FACS-Puffer aufnehmen.
- Proben auf Eis stellen und analysieren.

Anschließend wurden die analysierten Daten mit der CellQuest (BD) oder FloJo-Software ausgewertet.

**6.34. Colony-Forming Unit (CFU)-Assay (Kolonie-Assay)**

Das Methylzellulose-Medium der Firma StemCell Technologies (100mL), das bereits die nötigen Zytokine für die Differenzierung in die jeweiligen Linien (myeloid und lymphoid) enthielt, wurde in Portionen zu 3 ml eingefroren. Nach Bedarf wurden die Röhren aufgetaut (pro Maus ein Röhren) und mit einer definierten Anzahl von Zellen versetzt.

**Reagenzien:**

MDM-Medium mit 2% FCS, Invitrogen

2 Petrischalen pro Maus, Falcon

Knochenmarkzellen ohne Ery-Lyse

Methocult 3630 (Prä-B-Zellen), StemCell Technologies

Methocult 3434 (myeloide Linie), StemCell Technologies

- Für den Ansatz der myeloiden Linie:  $6 \times 10^4$  Zellen in 300  $\mu$ L MDM + 2% FCS aufnehmen
- Für den Prä-B-Zell-Ansatz:  $3 \times 10^5$  Zellen in 300  $\mu$ L MDM + 2% FCS aufnehmen.
- Die 300  $\mu$ L der Zellsuspension auf das Methylzellulose-Medium geben und gut vortexen.
- 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, bis die Blasen verschwunden sind.
- 2,2 mL der Mixtur langsam und ohne Blasen in eine 2 mL-Pipette aufsaugen.
- Je 1,1 mL in eine kleine Petrischale geben und gleichmäßig verteilen.
- Bei 37 °C inkubieren

Der Kolonie-Assay der Prä-B-Zellen kann bereits nach 8 Tagen unter dem Auflichtmikroskop ausgezählt werden, wohingegen der Kolonie-Assay der myeloiden Linie erst an Tag 11-14 ausgezählt werden sollte. Pro Maus wurden jeweils 2 Petrischalen angesetzt, von denen nach der Auszählung der Durchschnitt ermittelt wurde.

## Literaturverzeichnis

- Aigner, B., M. Fleischmann, et al. (1999). "Stable long-term germ-line transmission of transgene integration sites in mice." Transgenic Res 8(1): 1-8.
- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature 404(6774): 193-7.
- Al Saati, T., S. Galoin, et al. (1997). "IgH and TcR-gamma gene rearrangements identified in Hodgkin's disease by PCR demonstrate lack of correlation between genotype, phenotype, and Epstein-Barr virus status." J Pathol 181(4): 387-93.
- Aldinucci, D., D. Lorenzon, et al. (2004). "Interactions between tissue fibroblasts in lymph nodes and Hodgkin/Reed-Sternberg cells." Leuk Lymphoma 45(9): 1731-9.
- Armbinder, R.F., L.M. Weiss, et al. (1999). "Association of Epstein-Barr virus with Hodgkin's disease." In: *Hodgkin's Disease*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 79-98.
- Armstrong, A. A., L. Shield, et al. (1998). "Lack of involvement of known oncogenic DNA viruses in Epstein-Barr virus-negative Hodgkin's disease." Br J Cancer 77(7): 1045-7.
- Azuara, V., M. P. Lembezat, et al. (1998). "The homogeneity of the TCRdelta repertoire expressed by the Thy-1dull gammadelta T cell population is due to cellular selection." Eur J Immunol 28(11): 3456-67.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." Nat Rev Cancer 4(7): 540-50.
- Bargou, R. C., F. Emmerich, et al. (1997). "Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells." J Clin Invest 100(12): 2961-9.
- Belteki, G., J. Haigh, et al. (2005). "Conditional and inducible transgene expression in mice through the combinatorial use of Cre-mediated recombination and tetracycline induction." Nucleic Acids Res 33(5): e51.
- Benharroch, D., Y. Shemer-Avni, et al. (2003). "New candidate virus in association with Hodgkin's disease." Leuk Lymphoma 44(4): 605-10.
- Blaskovic, D., M. Stancekova, et al. (1980). "Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents." Acta Virol 24(6): 468.
- Bonnet, M. C., R. Weil, et al. (2000). "PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex." Mol Cell Biol 20(13): 4532-42.
- Branda, M. and J. R. Wands (2006). "Signal transduction cascades and hepatitis B and C related hepatocellular carcinoma." Hepatology 43(5): 891-902.
- Bruyns, E., A. Marie-Cardine, et al. (1998). "T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane." J Exp Med 188(3): 561-75.
- Cabannes, E., G. Khan, et al. (1999). "Mutations in the Ikba gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha." Oncogene 18(20): 3063-70.
- Caldwell, R. G., R. C. Brown, et al. (2000). "Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice." J Virol 74(3): 1101-13.

- Carbone, A. and A. Gloghini (2006). "HHV-8-Associated Lymphoma: State-of-the-Art Review." Acta Haematol 117(3): 129-131.
- Cepek, K. L., S. K. Shaw, et al. (1994). "Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin." Nature 372(6502): 190-3.
- Chamberlain, J. S., R. A. Gibbs, et al. (1988). "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification." Nucleic Acids Res 16(23): 11141-56.
- Chute, J. P. (2006). "Stem cell homing." Curr Opin Hematol 13(6): 399-406.
- Cohen, J. I. (2000). "Epstein-Barr virus infection." N Engl J Med 343(7): 481-92.
- Corthay, A., K. S. Nandakumar, et al. (2001). "Evaluation of the percentage of peripheral T cells with two different T cell receptor alpha-chains and of their potential role in autoimmunity." J Autoimmun 16(4): 423-9.
- Costantini, F. and E. Lacy (1981). Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. Nature. 294: 92-4.
- Cremer, T., P. Lichter, et al. (1988). "Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes." Hum Genet 80(3): 235-46.
- de Guzman, C. G., A. J. Warren, et al. (2002). Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. Mol Cell Biol. 22: 5506-17.
- Delabie, J., W. C. Chan, et al. (1995). "The antigen-presenting cell function of Reed-Sternberg cells." Leuk Lymphoma 18(1-2): 35-40.
- Diehl, V. (2002). In: "Therapiefortschritte beim Hodgkin-Lymphom." Uni-Med-Verlag, Bremen
- Di Santo, J. P. (2006). "Natural killer cell developmental pathways: a question of balance." Annu Rev Immunol 24: 257-86.
- DiMaio, D. and J. B. Liao (2006). "Human papillomaviruses and cervical cancer." Adv Virus Res 66: 125-59.
- Donahue, A. C. and D. A. Fruman (2004). "PI3K signaling controls cell fate at many points in B lymphocyte development and activation." Semin Cell Dev Biol 15(2): 183-97.
- Drexler, H. G. (1993). "Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines." Leuk Lymphoma 9(1-2): 1-25.
- Drynan, L. F., R. Pannell, et al. (2005). "Mll fusions generated by Cre-loxP-mediated de novo translocations can induce lineage reassignment in tumorigenesis." Embo J 24(17): 3136-46.
- Elgui de Oliveira, D. (2006). "DNA viruses in human cancer: An integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis." Cancer Lett.
- Elliott, J. I. (1998). "Selection of dual Valpha T cells." Eur J Immunol 28(7): 2115-23.
- Emmerich, F., M. Meiser, et al. (1999). "Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells." Blood 94(9): 3129-34.

- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell 61(5): 759-67.
- Fiumara, P., V. Snell, et al. (2001). "Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines." Blood 98(9): 2784-90.
- Flano, E., D. L. Woodland, et al. (2002). "A mouse model for infectious mononucleosis." Immunol Res 25(3): 201-17.
- Foss, F. M. (2002). "Immunologic mechanisms of antitumor activity." Semin Oncol 29(3 Suppl 7): 5-11.
- Fruman, D. A. (2004). "Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling." Curr Opin Immunol 16(3): 314-20.
- Fukada, T. and N. K. Tonks (2001). "The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase." J Biol Chem 276(27): 25512-9.
- Giudicelli, V., D. Chaume, et al. (2004). "IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis." Nucleic Acids Res 32(Web Server issue): W435-40.
- Glimcher, L. H. and K. M. Murphy (2000). "Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up." Genes Dev 14(14): 1693-711.
- Gordon, J. W., G. A. Scangos, et al. (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." Proc Natl Acad Sci U S A 77(12): 7380-4.
- Gourley, T. S., D. R. Patel, et al. (2002). "Aberrant expression of Fas ligand in mice deficient for the MHC class II transactivator." J Immunol 168(9): 4414-9.
- Gruss, H. J., A. Pinto, et al. (1997). "Hodgkin's disease: a tumor with disturbed immunological pathways." Immunol Today 18(4): 156-63.
- Hanel, P., M. Hummel, et al. (2001). "Analysis of single EBV-positive and negative tumour cells in EBV-harboring B-cell non-Hodgkin lymphomas." J Pathol. 195: 355-60.
- Hansmann, M.-L., L. M. Weiss, et al. (1999). In: "Pathology of lymphocyte."
- Harbers, K., D. Jahner, et al. (1981). "Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal." Nature. 293: 540-2.
- Harris, N. L. (1999). "Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis and grading." Semin Hematol 36: 220-232.
- Heard, E. and C. M. Disteche (2006). "Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome." Genes Dev 20(14): 1848-67.
- Herbst, H., H. D. Foss, et al. (1996). "Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease." Blood 87(7): 2918-29.
- Hess, K. L., A. C. Donahue, et al. (2004). "Frontline: The p85alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase is essential for a subset of B cell receptor-initiated signaling responses." Eur J Immunol 34(11): 2968-76.
- Hiai, H. (1996). "Genetic predisposition to lymphomas in mice." Pathol Int 46(10): 707-18.
- Hinz, M., P. Loser, et al. (2001). "Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells." Blood 97(9): 2798-807.

- Hjalgrim, H., J. Askling, et al. (2000). "Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis." J Natl Cancer Inst 92(18): 1522-8.
- Hoag, W. G. (1963). "Spontaneous Cancer in Mice." Ann N Y Acad Sci 108: 805-31.
- Huang, G., Q. Yan, et al. (2002). "Human cytomegalovirus in neoplastic cells of Epstein-Barr virus negative Hodgkin's disease." Int J Oncol 21(1): 31-6.
- Irsch, J., S. Nitsch, et al. (1998). "Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues." Proc Natl Acad Sci U S A 95(17): 10117-22.
- Ito, K., H. J. Bian, et al. (1996). HLA-DR4-IE chimeric class II transgenic, murine class II-deficient mice are susceptible to experimental allergic encephalomyelitis. J Exp Med. 183: 2635-44.
- Jarrett, R. F. and J. MacKenzie (1999). "Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease." Semin Hematol 36(3): 260-9.
- Jessop, S. (2006). "HIV-associated Kaposi's sarcoma." Dermatol Clin 24(4): 509-20, vii.
- Jiang, Z., J. Ninomiya-Tsuji, et al. (2002). "Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol." Mol Cell Biol 22(20): 7158-67.
- Jost, P. J. and J. Ruland (2006). "Aberrant NF- $\kappa$ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications." Blood Nov 21; [Epub ahead of print].
- Jundt, F., I. Anagnostopoulos, et al. (1999). "Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils." Blood 94(6): 2065-71.
- Jungnickel, B., A. Staratschek-Jox, et al. (2000). "Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma." J Exp Med 191(2): 395-402.
- Kanzler, H., R. Kuppers, et al. (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. J Exp Med. 184: 1495-505.
- Kapp, U., J. Wolf, et al. (1993). "Hodgkin's lymphoma-derived tissue serially transplanted into severe combined immunodeficient mice." Blood 82(4): 1247-56.
- Kapp, U., W. C. Yeh, et al. (1999). "Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells." J Exp Med 189(12): 1939-46.
- Kataoka, S., Y. Konishi, et al. (2004). "Antitumor activity of eosinophils activated by IL-5 and eotaxin against hepatocellular carcinoma." DNA Cell Biol 23(9): 549-60.
- Kawamoto, H., T. Ikawa, et al. (2000). "T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver." Immunity 12(4): 441-50.
- Khan, G., E. M. Miyashita, et al. (1996). "Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis?" Immunity 5(2): 173-9.
- Kirchgessner, H., J. Dietrich, et al. (2001). "The transmembrane adaptor protein TRIM regulates T cell receptor (TCR) expression and TCR-mediated signaling via an association with the TCR zeta chain." J Exp Med 193(11): 1269-84.

- Kleinjan, D. A. and V. van Heyningen (2005). "Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease." Am J Hum Genet 76(1): 8-32.
- Knight, S. J., S. W. Horsley, et al. (1997). "Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres." Eur J Hum Genet 5(1): 1-8.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A 68(4): 820-3.
- Kogan, S. C., J. M. Ward, et al. (2002). "Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice." Blood 100(1): 238-45.
- Kolsch, U., B. Arndt, et al. (2006). "Normal T-cell development and immune functions in TRIM-deficient mice." Mol Cell Biol 26(9): 3639-48.
- Kondo, M., I. L. Weissman, et al. (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell 91(5): 661-72.
- Kuby, T., T. J. Kindt, et al. (2007). In: „Immunology 6.Auflage“. W.H. Freeman and Company. New York.
- Kuhn, R. and R. M. Torres (2002). Cre/loxP recombination system and gene targeting. Methods Mol Biol. 180: 175-204.
- Kuppers, R. (2002). "Molecular biology of Hodgkin's lymphoma." Adv Cancer Res 84: 277-312.
- Kuppers, R., U. Klein, et al. (2003). "Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling." J Clin Invest 111(4): 529-37.
- Kuppers, R. and K. Rajewsky (1998). "The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease." Annu Rev Immunol 16: 471-93.
- Kuppers, R., I. Schwing, et al. (2002). "Biology of Hodgkin's lymphoma." Ann Oncol 13 Suppl 1: 11-8.
- Kutemeier, G., C. Harloff, et al. (1992). "Rapid isolation of immunoglobulin variable genes from cell lysates of rat hybridomas by polymerase chain reaction." Hybridoma 11(1): 23-32.
- Lam, K. P., R. Kuhn, et al. (1997). "In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death." Cell 90(6): 1073-83.
- Lang, D., J. Knop, et al. (1998). "The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness." J Immunol 161(12): 6871-7.
- Lee, L. A. and C. V. Dang (2006). "Myc target transcriptomes." Curr Top Microbiol Immunol 302: 145-67.
- Lefranc, M. P. (2001). "IMGT, the international ImMunoGeneTics database." Nucleic Acids Res 29(1): 207-9.
- LeibundGut-Landmann, S., J. M. Waldburger, et al. (2004). "Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes." Eur J Immunol 34(6): 1513-25.



- Lichter, P., T. Cremer, et al. (1988). "Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries." Hum Genet 80(3): 224-34.
- Maeda, N., T. Kasukawa, et al. (2006). "Transcript annotation in FANTOM3: mouse gene catalog based on physical cDNAs." PLoS Genet 2(4): e62.
- Maggio, E., A. van den Berg, et al. (2002). "Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues." Ann Oncol 13 Suppl 1: 52-6.
- Maggio, E. M., E. Stekelenburg, et al. (2001). "TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus." Int J Cancer 94(1): 60-6.
- Maggio, E. M., A. Van Den Berg, et al. (2003). "Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma." Am J Pathol 162(1): 29-35.
- Makalowska, I., R. Sood, et al. (2002). "Identification of six novel genes by experimental validation of GeneMachine predicted genes." Gene 284(1-2): 203-13.
- Martinez-Delgado, B., M. Cuadros, et al. (2005). "Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas." Leukemia 19(12): 2254-63.
- Mathas, S., K. Johrens, et al. (2005). "Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas." Blood 106(13): 4287-93.
- Meggetto, F., C. Muller, et al. (1996). "Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferations in severe combined immunodeficient mice transplanted with Hodgkin's disease lymph nodes: implications of EBV-positive bystander B lymphocytes rather than EBV-infected Reed-Sternberg cells." Blood 87(6): 2435-42.
- Miyamoto, T., H. Iwasaki, et al. (2002). "Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment." Dev Cell 3(1): 137-47.
- Montesinos-Rongen, M., A. Roers, et al. (1999). "Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease." Blood 94(5): 1755-60.
- Moris, A., S. Rothenfusser, et al. (1999). "Role of gammadelta T cells in tumor immunity and their control by NK receptors." Microbes Infect 1(3): 227-34.
- Morse, H. C., 3rd, M. R. Anver, et al. (2002). "Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice." Blood 100(1): 246-58.
- Muller-Hilke, B. and N. A. Mitchison (2006). "The role of HLA promoters in autoimmunity." Curr Pharm Des 12(29): 3743-52.
- Mühlhardt, C. (2002). In: "Molekularbiologie/Genomics." 3.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg.
- Munro, J. M., A. S. Freedman, et al. (1994). "In vivo expression of the B7 costimulatory molecule by subsets of antigen-presenting cells and the malignant cells of Hodgkin's disease." Blood 83(3): 793-8.
- Muschen, M., D. Re, et al. (2000). "Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells." Cancer Res 60(20): 5640-3.
- Nishikori, M. and T. Uchiyama (2006). "Molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma." Int J Hematol 83(5): 398-403.

- Noursadeghi, M., M. C. Bickerstaff, et al. (2002). "Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection." J Immunol 169(2): 913-9.
- Padovan, E., C. Giachino, et al. (1995). "Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion." J Exp Med 181(4): 1587-91.
- Palomo, C., X. Zou, et al. (1999). "B-cell tumorigenesis in mice carrying a yeast artificial chromosome-based immunoglobulin heavy/c-myc translocus is independent of the heavy chain intron enhancer (Emu)." Cancer Res 59(21): 5625-8.
- Pannetier, C., M. Cochet, et al. (1993). "The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments." Proc Natl Acad Sci U S A 90(9): 4319-23.
- Park, S. S., A. L. Shaffer, et al. (2005). "Insertion of Myc into Igh accelerates peritoneal plasmacytomas in mice." Cancer Res 65(17): 7644-52.
- Pascolo, S. (2005). "HLA class I transgenic mice: development, utilisation and improvement." Expert Opin Biol Ther 5(7): 919-38.
- Patel, D.R., M. H. Kaplan, et al. (2004). "Altered Th1 cell differentiation programming by CIITA deficiency." J Immunol 173(9): 5501-8.
- Pattle, S. B. and P. J. Farrell (2006). "The role of Epstein-Barr virus in cancer." Expert Opin Biol Ther 6(11): 1193-205.
- Pinto, A., D. Aldinucci, et al. (1997). "The role of eosinophils in the pathobiology of Hodgkin's disease." Ann Oncol 8 Suppl 2: 89-96.
- Poppema, S. (2005). "Immunobiology and pathophysiology of hodgkin lymphomas." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 231-8.
- Poppema, S. and A. van den Berg (2000). "Interaction between host T cells and Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas." Semin Cancer Biol 10(5): 345-50.
- Quintanilla-Martinez, L., F. Fend, et al. (1999). "Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection." Am J Surg Pathol 23(10): 1233-40.
- Rammensee, H. G., K. Falk, et al. (1993). "MHC molecules as peptide receptors." Curr Opin Immunol 5(1): 35-44.
- Re, D., M. Muschen, et al. (2001). "Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells." Cancer Res 61(5): 2080-4.
- Re, D., R. Kuppers, et al. (2005). "Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma." J Clin Oncol 23(26): 6379-86.
- Reya, T. (2003). "Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal." Recent Prog Horm Res 58: 283-95.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature 414(6859): 105-11.
- Rodriguez-Borlado, L., D. F. Barber, et al. (2003). "Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the CD4/CD8 T cell differentiation ratio." J Immunol 170(9): 4475-82.

- Roers, A., M. Montesinos-Rongen, et al. (1998). "Amplification of TCRbeta gene rearrangements from micromanipulated single cells: T cells rosetting around Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease are polyclonal." Eur J Immunol 28(8): 2424-31.
- Romeis, B. (1989). In: "Mikroskopische Technik." ed. Urban & Schwarzenberg, München.
- Rothenberg, M. E. and S. P. Hogan (2006). "The eosinophil." Annu Rev Immunol 24: 147-74.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol 132: 365-86.
- Ruse, M. and U. G. Knaus (2006). "New players in TLR-mediated innate immunity: PI3K and small Rho GTPases." Immunol Res 34(1): 33-48.
- Schwering, I., A. Brauninger, et al. (2003). "Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma." Blood 101(4): 1505-12.
- Scielzo, C., A. Camporeale, et al. (2006). "ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage." Leukemia 20(4): 689-95.
- Seyffert, W. (2003). In: "Lehrbuch der Genetik." 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Silver, L. M. (1995). In: "Mouse Genetics." Oxford University Press.
- Simas, J. P. and S. Efstathiou (1998). "Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis." Trends Microbiol 6(7): 276-82.
- Sinn, E., W. Muller, et al. (1987). "Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo." Cell 49(4): 465-75.
- Skinnider, B. F., A. J. Elia, et al. (2001). "Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma." Blood 97(1): 250-5.
- Skinnider, B. F., U. Kapp, et al. (2002). "The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma." Leuk Lymphoma 43(6): 1203-10.
- Skinnider, B. F. and T. W. Mak (2002). "The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma." Blood 99(12): 4283-97.
- Sonderstrup, G., A. P. Cope, et al. (1999). "HLA class II transgenic mice: models of the human CD4+ T-cell immune response." Immunol Rev 172: 335-43.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." Nat Genet 21(1): 70-1.
- Stein, H., V. Diehl, et al. (1999). In: "Hodgkin's disease." ed. (Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins), pp. 121-138.
- Stein, H., T. Marafioti, et al. (2001). "Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription." Blood 97(2): 496-501.
- Tan, B. T., C. Y. Park, et al. (2006). "The cancer stem cell hypothesis: a work in progress." Lab Invest 86(12): 1203-7.
- Thornburg, N. J., W. Kulwichit, et al. (2006). "LMP1 signaling and activation of NF-kappaB in LMP1 transgenic mice." Oncogene 25(2): 288-97.

- Trumper, L., M. Pfreundschuh, et al. (1996). "N-ras genes are not mutated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single cell polymerase chain-reaction examinations." Leukemia 10(4): 727-30.
- van den Berg, A., L. Visser, et al. (1999). "High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma." Am J Pathol 154(6): 1685-91.
- Virgin, H. W. t., R. M. Presti, et al. (1999). "Three distinct regions of the murine gammaherpesvirus 68 genome are transcriptionally active in latently infected mice." J Virol 73(3): 2321-32.
- von Kalle, C., J. Wolf, et al. (1992). "Growth of Hodgkin cell lines in severely combined immunodeficient mice." Int J Cancer 52(6): 887-91.
- Wade, M. and G. M. Wahl (2006). "c-Myc, genome instability, and tumorigenesis: the devil is in the details." Curr Top Microbiol Immunol 302: 169-203.
- Wagner, E. F., T. A. Stewart, et al. (1981). "The human beta-globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice." Proc Natl Acad Sci U S A 78(8): 5016-20.
- Wagner, T. E., P. C. Hoppe, et al. (1981). "Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring." Proc Natl Acad Sci U S A 78(10): 6376-80.
- Wang, C. L., B. B. Wang, et al. (2006). "Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus integration." Proc Natl Acad Sci U S A 103(49): 18680-4.
- Wang, E., M. C. Panelli, et al. (2004). "A global approach to tumor immunology." Cell Mol Immunol 1(4): 256-65.
- Wang, H., H. Han, et al. (2006). "Targeting loss-of-function mutations in tumor-suppressor genes as a strategy for development of cancer therapeutic agents." Semin Oncol 33(4): 513-20.
- Watanabe, K., Y. Yamashita, et al. (2000). "Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease." Histopathology 36(4): 353-61.
- Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, et al. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." Nature 420(6915): 520-62.
- Weiss, L. M., J. K. C. Chan, et al. (1999). In: "Hodgkin's disease." ed. (Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins), pp. 101-120.
- Wilson, R. K., E. Lai, et al. (1988). "Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families." Immunol Rev 101: 149-72.
- Wolf, J., U. Kapp, et al. (1996). "Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells." Blood 87(8): 3418-28.
- Woychik, R. P. and K. Alagramam (1998). "Insertional mutagenesis in transgenic mice generated by the pronuclear microinjection procedure." Int J Dev Biol 42(7): 1009-17.
- Wu, G. S., T. F. Burns, et al. (1999). "Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest." Oncogene 18(47): 6411-8.

- Xiao, G., A. B. Rabson, et al. (2006). "Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease." Cytokine Growth Factor Rev 17(4): 281-93.
- Yu, H. M., B. Liu, et al. (2005). "Development of a unique system for spatiotemporal and lineage-specific gene expression in mice." Proc Natl Acad Sci U S A 102(24): 8615-20.
- Zhang, D. H., L. Cohn, et al. (1997). "Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene." J Biol Chem 272(34): 21597-603.

## Danksagung

An dieser Stelle, möchte ich mich bei allen bedanken, die in irgendeiner Form dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit verwirklicht werden konnte. Mein besonderer Dank gilt deshalb:

- Prof. Judy Johnson, die der Arbeit dank ihrer kritischen Betrachtung der Daten den letzten Schliff gegeben hat.
- Prof. Dolores Schendel, die mich immer unterstützte und sich sehr viel Zeit für wissenschaftliche Diskussionen und meine Anliegen nahm.
- Prof. Jörg Schmidt für die Bereitstellung der env-Sonde und Prof. Christine Leib-Mösch für die Interpretation der Southern Blot-Ergebnisse.
- Dem gesamten Tierstall-Team, das sich so liebevoll und zuverlässig um die Tiere kümmerte: Barbara Lukas und Julika Jasny, Michael Hagemann und Albert Geishauser sowie Sabine, Danny und Martina.
- Josef Mysliwietz, Sandra Kunder, Leticia Quintanilla-Fend und Gabriele Hölzlwimmer, die durch phänotypische FACS-Analysen und histopathologische sowie immunhistologische Untersuchungen eine immense Vorarbeit geleistet hatten.
- Svetoslav Kalaydijev (GMC), Michael Rieger und Timm Schröder (ISF-GSF) für die Unterstützung der phänotypischen FACS-Analysen und dem CFU-Assay.
- Isabell Jentsch und Jochen Geigl für die Unterstützung bei der FISH-Analyse
- Cornelia Hömig, die mir beim Southern Blot zur Hand ging.
- Heiko Adler, der die Primer und Kontrollen für das MHV-68 zur Verfügung stellte.
- Sylvia Donhauser, die mich in die Verwaltungsvorgänge der GSF einführte und sich immer um alles kümmerte.
- Bernhard Frankenberger, der das „Vergnügen“ hatte diese Arbeit Korrektur zu lesen.
- Dominik ter Meer, mit dem ich in den Inkubationspausen immer vor die Tür ging, um wichtige technische Probleme zu besprechen.
- Adam Slusarski, meinem Laborkollegen, der dafür sorgte, dass alles vorrätig vorhanden war und immer eine Lösung parat hatte, wenn es um Computerprobleme ging.
- Elfriede Nößner und Ralph Mocikat für viele wissenschaftliche Fragestellungen und Diskussionen.
- Meiner Freundin Angie, die mir eine akute Kommaschwäche diagnostizierte und sich durch die Arbeit kämpfte, auch wenn das alles „Böhmische Dörfer“ für sie waren. Und Angies Eltern, die mich in der Zeit des Schreibens ertragen mussten.
- Meinen Eltern, die all meine Entscheidungen unterstützten und immer für mich da sind.
- Allen anderen, die ich in der Auflistung oben vergessen haben sollte.

**A) Primerliste** (alle Primer wurden in 5'-3'-Richtung angegeben)

<b>GEN</b>	<b>NM_Transcript</b>	<b>5' Sequence</b>	<b>3' Sequence</b>	<b>Tm</b>
18S RNA	NR_003278	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	58°C
A1 (Bcl2)	NM_009742	TTTGCAGTCTTTGCCTCCTT	TTCTGCCGTATCCATTCTCC	56°C
AID	NM_009645	TTCAAAAATGTCCGCTGGG	AGCCCTTCCCAGGCTTTGA	57°C
AP1	NM_010591	AGCAACTTTCCTGACCCAGA	CGTTTCCATCTTTGCAGTCA	57°C
Bcl-6	NM_009744	CCTGAGGGAAGGCAATATCA	AAATGCAGGGCAATCTCATC	58°C
BLIMP1	NM_007548	GCCAACCAGGAAGCTTCTTGTGT	AGGATAAACCCAGGAGGT	60°C
CBFB	NM_022309	GCAAGGTATACTTGAAGGCT	TGAGATCATCACCGCCACCT	57°C
CD19	NM_009844	ACAGGACTGGAAGAAGAAG	ACTGAATTGAGTGGAGCTG	55°C
CEBP $\alpha$	NM_007678	AAGAAGTCGGTGGACAAGAACAG	GTTGCGTTGTTGGCTTTATCTC	60°C
CEBP $\beta$	NM_009883	AGAAGACGGTGGACAAGCTG	ATTGCATCAAGTCCCGAAAC	58°C
c-Fos	NM_010234	ATGGGCTCTCCTGTCAACAC	TGCAACGCAGACTTCTCATC	58°C
CIITA	NM_007575	GCTAGAACAGGGCACAGAGG	CCCAGCACATACACATCTGG	61°C
c-myc	NM_010849	GGGCCAGCCCTGAGCCCTAGTGC	ATGGAGA&GAGCCCGACTCCGACC	62°C
COUP	NM_010151	GGCCAGTATGCACTCACAAA	GCTCGATGACAGAGGAGGAC	60°C
DNA_PK	NM_011159	TTGGAGACAGACACCTGAA	TGAATCCATGATCCTCCTT	55°C
E2A	NM_011548	CATCCATGTCCTGCGAAGCCA	TTCTTGTCTCTTCGGCGTC	62°C
EBF	NM_007897	TCCCAGCCCTTGCTAACAC	CTTGCAGGCTGTTCCCGTT	59°C
Egr1	NM_007913	CCACAACAACAGGGAGACCT	TCTTGCJTTCATCACTCCTG	58°C
EVI	NM_007963	CCAGATGTCACATGACAGTGGAAA GCACTA	CCGGGTTGGCATGACTCATATTAA CCATGG	62°C
FOG	NM_009569	CCACCCTGTGCAGGAACCAGT	GGGTTTCTCTCCGTCGCCG	62°C
GATA1	NM_008089	ATGCCTGTAATCCCAGCACT	TCATGGTGGTAGCTGGTAGC	58°C
GATA3	NM_008091	ACGTCTCACTCTCGAGGCAGCATG	GAAGTCCTCCAGCGCGTCATGCAC	60°C
$\alpha$ GSP1	NM_019111	GGAGACCTCATCTTCTTCAGTTTCC AG	GTAATACGACTCACTCACTATAGG GCACTATAGGGCACGCGTGGT (AP1)	67°C
$\alpha$ GSP2	NM_010381	GTTTTTGTGCCTGAGCCAGTTCTT GGT	ACTATAGGGCACGCGTGGT (AP2)	67°C
hEx2a	NM_019111	GGGAAGCAGGGGGACTATGAC	CATTGGTGTATCGAGTATAGTTG	58°C
hEx2b	HLA00685 * DRB1*040101	TGAAAGCGGTGCGTGCTGTTTAA	CACTGTGAAGCTCTCACCAAC	58°C
ID-3	NM_008321	TGTGCTGCCTGTCCGAACG	ACAAGTCCGGAGTGAGCT	58°C

IgH <sub>RM</sub>	Ralph Mocikat	AGGTC/GA/CAA/GCTGCAGC/GAG TCATGG	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC CTTGGCCCC	65°C
IgH <sub>FA</sub>	Kawamoto et al., 2000	AGGGATCCTTGTGAAGGGATCTAC TACTGTG	(FAM)AAAGACCTGCAGAGGCCAT TCTTACC	61°C
Ikba	NM_007700	CGCACAGCCATGTTTCAG	TAGGGCAGCTCATCCTCTGT	58°C
Ikb $\beta$	NM_010546	TGGGGAAAACCTGCGGATG	CGCATCACACTTCGGCTCT	58°C
Ikb $\epsilon$ 1	NM_010907	GCCCTGCAACTGAGATAGGAG	GAAAAGACGTGGATGACCGT	59°C
Ikb $\epsilon$ 2	NM_010907	ACGGTCATCCACGTCTTTTC	TACAAAGCTCCTGCATGTGG	57°C
IKK1_1	NM_010908	CAGAGAGGGGGACCTATTGA	TGTTACTGAGGGCCACTTCC	59°C
IKK1_1	NM_010908	GGTTTCGGGAACGTCAATG	TCAATAGTCCCCCTCTCTG	59°C
IKK2_1	NM_008690	CAGAGTTAGCAGGGCATCG	ACTGCGTTTGCACTTTGGCT	57°C
IKK2_2	NM_008690	CCAGAATCCAGGAAGACACG	AGCTCCTGGTCTGTCTCCAG	60°C
Jak3	NM_010589	ATGCCCCGGAGTCCCTATCTGACA A	GGCGTCGGCCCTCTGCCAGCAGCT	62°C
KU70	AB_010282	TGAAGTGCTCTGGGTCTGTG	TTCTCCAGCACAATCTGACG	58°C
KU86	NM_009533	AGTGTGCAGACACCTGATGC	GCGTCCACAACCTACCCAACCT	60°C
M6	Adler	AATATAAACTCGAGGCGGCAAGG	AAGCTCGTGAAAGCTTTTATATCA GAATAA	60°C
NF1	NM_010906	GCGAGGACTTTGTGCTAACC	GTGTGAAATACGGGCTCGAC	59°C
NEMO	NM_178590	TGCATCTGCTGCTCCTACTC	GCTGCCTGGAAGAGAATCAA	58°C
Nfic	NM_008688	TGGACCTGTACCTGGCCTAC	CTCCGTCTAATCCCACAAA	62°C
NFkb- p50	NM_008689	CATGAAGCAGCTGACAGAAG	TTCAATAGGTCTTCTCTGCC	57°C
Oct-1	NM_011137	CACTTCCACAGAGCCAGTCA	CCAAACAGAAATCCCACAAA	58°C
Oct-2	NM_011138	TGGCCATGGGCAAGCTCTA	TCTGAGGTAGGCTTCTGGT	58°C
ORF50	Adler	AACTGGAACCTTCTGTGGC	GGCCGCAGACATTTAATG	60°C
Pax-5	NM_00872	AACTTGCCCATCAAGGTGTC	CTGCTGCTGTGTGAACAGGT	58°C
PI3KR1	NM_011085	TTCCTCACCTTCAAGCCACCCAAG	AGGTTAGAAACGTCTGGTCATCCA AC	62°C
PTEN	NM_008960	ATATCAAGAGGATGGATTTCG	GCAGTTAAATTTGGCGGTTGT	62°C
Pu.1	NM_011355	TGGAAGGGTTTTCCCTCACC	TGCTGTCCTTCATGTCGCCG	60°C
Runx1	NM_009281	CTTCTCTGCTCCGTGCTAC	GACGGTGATGGTCAGAGTGA	60°C
SCL	NM_011527	ATGGAGATTTCTGATGGTCCTCAC	AAGTGTGCTTGGGTGTTGGCTC	62°C
Sp1	NM_013672	GGTACCCCTACCTCAAAGG	AGTCCCTGATGAACCACTGC	60°C
Spi-B	NM_019866	CCGGTGCCTTTTATTCTTGA	GCTCTGGGTTCTGATTCTGC	58°C
Stat-6	NM_009284	CACTATAAGCCCGAACAGAT	CTACCATAGTCACATCTGA	55°C



syk	NM_011518	GGCAGCTAGTGGAACATTA	TTCACAGTCCCGAAGTTAC	55°C
Tbet	NM_019507	CTAAGCAAGGACGGCGAATGT	GGCTGGGAACAGGATACTGG7	56°C
TCF1	NM_009237	GCACACCCATGAAGACACAG	TAGCGAGGCCATGATAAGGT	59°C
TRAT1	NM_198297	AATCCCAGAACCACTGGATG	CGGATCAACCCAAACAGTCT	57°C
XBP1	NM_013842	TATCCTTTTGGGCATTCTGG	TCCCAGGAGTGGTCTGTACC	58°C
Vβ1	Pannetier et al. 1993	CTGAATGCCAGACAGCTCCAAGC		60°C
Vβ2	Pannetier et al. 1993	TCACTGATACGGAGCTGAGGC		60°C
Vβ3.1	Pannetier et al. 1993	CCTTGCAGCCTAGAAATTCAGT		60°C
Vβ4	Pannetier et al. 1993	GCCTCAAGTCGCTTCCAACCTC		60°C
Vβ5.1	Pannetier et al. 1993	CATTATGATAAAATGGAGAGAGAT		60°C
Vβ5.2	Pannetier et al. 1993	AAGGTGGAGAGAGACAAAGGATTC		60°C
Vβ6	Pannetier et al. 1993	CTCTCACTGTGACATCTGCCC		60°C
Vβ7	Pannetier et al. 1993	TACAGGGTCTCACGGAAGAAGC		60°C
Vβ8.1	Pannetier et al. 1993	CATTACTCATATGTCGCTGAC		60°C
Vβ8.2	Pannetier et al. 1993	CATTATTCATATGGTGCTGGC		60°C
Vβ8.3	Pannetier et al. 1993	TGCTGGCAACCTTCGAATAGGA		60°C
Vβ9	Pannetier et al. 1993	TCTCTCTACATTGGCTCTGCAGGC		60°C
Vβ10	Pannetier et al. 1993	ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGGA		60°C
Vβ11	Pannetier et al. 1993	GCACTCAACTCTGAAGATCCAGAG C		60°C
Vβ12	Pannetier et al. 1993	GATGGTGGGGCTTTCAAGGATC		60°C
Vβ13	Pannetier et al. 1993	AGGCCTAAAGGAACTAACTCCAC		60°C
Vβ14	Pannetier et al. 1993	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC		60°C
Vβ15	Pannetier et al. 1993	CCCATCAGTCATCCCACTTATCC		60°C
Vβ16	Pannetier et al. 1993	CACTCTGAAAATCCAACCCAC		60°C
Vβ18	Pannetier et al. 1993	CAGCCGGCCAAACCTAACATTCTC		60°C
Vβ20	Pannetier et al. 1993	TCTGCAGCCTGGGAATCAGAA		60°C
LiGC	Mocikat		CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTC CCGCCCGCCCGCGGCTTGGGT GGAGTCACATTTCTC	60°C
YY1	NM_009537	TGAGAAAGCATCTGCACACC	CTCCTGTTGGGACCACACTT	58°C

\* [ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt/mhc/hla/DRB\\_nuc.fasta](ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt/mhc/hla/DRB_nuc.fasta)

**B) Antikörperliste**

No.	Antikörper	Fluoreszenz	Verdünnung	Klon	Bezugsquelle
1	B220	-PerCp	1/50	RA3-6B2	BD
2	CD117 (cKit)	-PE-Cy7	1/100	2B8	eBiosciences
3	CD117 (cKit)	-APC	1/100	2B8	BD
4	CD11c	-FITC	1/100	HL3	BD
5	CD11c	-PE	1/50	HL3	BD
6	CD122	-PE	1/50	TM-b1	BD
7	CD127	-PE	1/30	SB/199	BD
8	CD14	-APC	1/100	Sa2-8	eBiosciences
9	CD19	-APC	1/100	MB19-1	eBiosciences
10	CD19	-APC-CY7	1/100	1D3	BD
11	CD25	-PE-Cy7	1/30	PC61	BD
12	CD3	-FITC	1/100	17A2	eigener
13	CD3	-PB	1/100	500A2	BD
14	CD34	-FITC	1/20	RAM 34	eBiosciences
15	CD4	-Alexa700	1/100	RM4-5	BD
16	CD41	-PE	1/100	MWReg30	BD
17	CD45	-APC	1/100	30-F11	eBiosciences
18	CD45	-Bio	1/100	/	Schröder, GSF
19	CD49b (DX5)	-APC	1/100	HMa2	BD
20	CD5	-APC	1/50	53-7.3	BD
21	CD5	-PerCP	1/50	53-7.3	BD
22	CD62L	-FITC	1/100	MEL-14	Biozol
23	CD8	-APC-Cy7	1/200	53-6.7	BD
24	Fc-Block	unmarkiert	100µg/mL	2.4G2	Kremmer, GSF
25	FcγR (CD16/32)	-PE	1/100	2.4G2	BD
26	GR1	-APC-Cy7	1/100	RB6-8C5	BD
27	TIB120	-FITC	1/100	IA <sup>b</sup>	eigener
28	IgD	-FITC	1/1000	/	eigener
29	IgM	-APC	1/200	II/41	BD
30	L243	-Cy5	1/500	huDR4	eigener
31	Lineage	-Bio	1/50	/	eigener

32	MACI (CD11b)	-PE-Cy7	1/100	M1/70	BD
33	Sca1	-PE-Cy5.5	1/100	D7	eBiosciences
34	Streptavidin (IgG)	-PB	1/50	/	Invitrogen
35	TCRgd	-PE	1/50	GL3	BD
36	Ter119	-Bio	1/100	TER119	eBiosciences
37	Ter119	-PE	1/100	TER119	BD
38	TIB120	-Cy5	1/100	/	eigener
39	TCR-V $\beta$ -Screening-Panel	-FITC	1/100	/	BD

**C) Liste der die im Nfkb-Array überexprimierten oder herunterregulierten Gene** (alle Informationen aus [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

Gen	x-fache Expression	Synonym	Funktion	Knockout-Modell
<b>Eif2ak2</b> eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	↓ HD -168x	Pkr; Tik; Prkr	<ul style="list-style-type: none"> <li>- negative regulator of Stat1 and Stat3 with important implications in cell signalling</li> <li>- direct interaction between PKR and Melanoma differentiation-associated gene-7 may be important for PKR activation and apoptosis induction</li> <li>- PKR plays an important role in regulation of gene transcription, as PKR phosphorylates I kappa B alpha</li> </ul>	-mice are physically normal and the induction of type I IFN genes by poly(I).poly(C) (pIC) and virus is unimpaired, the antiviral response induced by IFN-gamma and pIC was diminished
Csf3 <b>colony stimulating factor 3 (granulocyte)</b>	↓ HD --35x ↓ BZT -48x ↑ DR4 (Milz) +114x ↓ ∑ Tumoren - 16,5x	Csfg; G-CSF; MGI-IG	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is the principal cytokine regulating granulopoiesis</li> <li>- Increased production of G-CSF in mice mounting the acute phase response is a key physiological component of host defense.</li> </ul>	-G-CSF receptor-deficient mice (G-CSFR <sup>-/-</sup> ) are neutropenic but have only a modest reduction of committed myeloid progenitors.
Csf2 <b>colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</b>	↑ DR4 (Milz) +7x	Csfgm; Gm-CSf; MGI-IGM; MGC151255; MGC151257	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GM-CSf dna induces specific patterns of cytokines and chemokines in the skin</li> <li>- Intestinal epithelial cells stimulate proliferative and colony-forming activity of hematopoietic stem cells by producing Gm-CSf</li> <li>- role of deficiency in linking inflammation and cancer</li> <li>- regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk activation of NFkappa B and AP-1</li> <li>- GM-CSF expression is independent of IL-4 induction of Th2 immune-inflammatory response</li> <li>- relevance to peripheral myeloid recruitment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- develop normally and show no major perturbation of hematopoiesis up to 12 weeks of age. While most GM-CSF-deficient mice are superficially healthy and fertile, all develop abnormal lungs</li> <li>- extensive peribronchovascular infiltration with lymphocytes, predominantly B cells</li> <li>- Transgenic mice overexpressing GM-CSF, show pathological changes, including enlarged and histologically abnormal livers and spleens, and increases in the number and activation of blood macrophages and granulocytes</li> </ul>
<b>Ltbr lymphotoxin beta receptor</b>	↑ BZT +11x	CD18; Ltar; TNFCR; Tnfbr; TNFRrp; LTbetaR; TNFR-RP; Tnfrsf3; TNFR2-RP; TNF-R-III	<ul style="list-style-type: none"> <li>- role of activation in lymphoid organogenesis and tumor development</li> <li>- double positive thymocytes regulate the differentiation of early thymocyte progenitors and gammadelta cells by a mechanism dependent on the transcription factor RORgt, and the lymphotoxin (LT) beta receptor (LTbetaR)</li> <li>- Data show CD18 is selectively required for T helper 2, but not T helper 1, homing and has a minimal influence on T-effector development</li> <li>- comparison of signal pathways leading to NF-kb induction in response to TNFa and LTbR activation indicates LTbR-induced binding of RelB/p50 requires processing of p100 that is mediated by IKKalpha but is independent of IKKbeta, NEMO/IKKgamma, and RelA</li> </ul>	- LTbetaR <sup>-/-</sup> mice have reduced dendritic cells and reduced BrdU incorporation on dendritic cells

<b>Lta lymphotoxin A</b>	↑ BZT +3,3x ↓ CD19 <sup>+</sup> -3,8x ↓ TZT -16,5x	LT; Ltx; Tnfb; LT[a]; LT-[a]; TNFSF1; Tnfsf1b; LT- alpha; TNF- beta	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contributes to nasal-associated lymphoid tissue development and function through regulation of lymphoid chemokines and adhesion molecules</li> <li>- Lymphotoxin alpha- and lymphotoxin beta receptor-dependent interactions are required to initiate postnatal development of small intestinal lymphoid aggregates</li> <li>- Regulates spleen white pulp structure and function</li> </ul>	-Blockade of the LT signaling pathway exacerbates the development and progression of collagen-induced arthritis, probably by skewing the Th1/Th2 balance that determines the outcome of autoimmune responses
<b>C3 complement component 3</b>	↑ BZT +22x ↑ HD +15x ↑ Σ Tumoren +6x	ASP; Plp	<ul style="list-style-type: none"> <li>- traffic of C3 requires protein kinase C-dependent phosphorylation</li> <li>- complement C3 expression is regulated by the bile acid receptor FXR</li> <li>- C3 regulates the activation and expansion of antigen-specific CD8 T cells during an acute systemic infection</li> <li>- reduction of number and size of germinal centers</li> <li>- increase the amount of stable MHC II molecules at APCs</li> <li>- increases cell to cell interaction, intracellular signalling after binding and intracellular processing of antigens</li> </ul>	-Homozygous C3-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis and display a decreased type II collagen-specific IgG antibody response, which can be boosted by repeated immunization -Production of both T-helper cell type 1 (Th1)and Th2 cytokines in response to two independent routes of exposure are impaired in complement component 3-deficient mice.
<b>Edg2 endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2</b>	↑ DR4 (Milz) +20x	Kdt2; lpa1; vzg-1; Gpcr26; AI326300; MGC29102; 5031439C20	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LPA and angiotensin II were also capable of inducing LPA1 receptor phosphorylation, showing that LPA1 receptor can be subjected to homologous and heterologous desensitization</li> <li>- LPA does not behave as a potent PPARgamma agonist in adipocytes but, conversely, inhibits PPARgamma expression and adipogenesis via LPA(1) receptor activation</li> <li>- LPA stimulation promotes the interaction of the LPA(2) receptor with a focal adhesion molecule, TRIP6</li> <li>-A marked deficit in prepulse inhibition, changes in the levels of brain 5-HT and a craniofacial dysmorphism is seen in LPA1 receptor-deficient mice, defects resembling those found in psychiatric disease.</li> </ul>	- targeted deletion of lp(A1) results in approximately 50% neonatal lethality, impaired suckling in neonatal pups, and loss of LPA responsivity in embryonic cerebral cortical neuroblasts with survivors showing reduced size, craniofacial dysmorphism, and increased apoptosis in sciatic nerve Schwann cells. The suckling defect was responsible for the death among lp(A1)((-/-)) neonates and the stunted growth of survivors
<b>Zap70 zeta-chain (TCR) associated protein kinase</b>	↑ BZT +4,3x ↑ HD +15,3x	Srk; TZK; mur; 70kDa; mrtle; ZAP-70; AI327364	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ZAP-70 plays a distinct role in T cell activation and activation-induced cell death that involves the Fas/Fas ligand, caspase-8 and caspase-3 pathways</li> <li>- ZAP-70 plays a role in the transition of pro-B to pre-B cells in the bone marrow</li> </ul>	- mice lacking ZAP-70 had neither CD4 nor CD8 single-positive T cells - there is an absolute requirement of ZAP-70 for alphabeta T cells and epithelial gammadelta T cells, but not for some gammadelta T cells in peripheral lymphoid tissues
<b>Htr2b 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B</b>	↑ DR4 (Milz) +10x	5-HT2B; AJ012488; AV377389	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5-HT promotes [35S]sulfate incorporation (chondrogenic differentiation) by activation of 5-HT2B receptors, which use the mitogen activated protein kinase (p42 MAPK) signal transduction pathway</li> </ul>	- Loss of the 5-HT2B receptor leads to abnormal fetal heart development and dilated cardiomyopathy in adults. 5-HT2B is implicated in systemic hypertension. It regulates the pathologic vascular proliferation leading to pulmonary hypertension
<b>Ccl2 chemokine (C-C motif) ligand 2</b>	↑ DR4 (Milz) +7x ↑ CD19 <sup>+</sup> +18x	JE; HC11; MCAF; MCP1; MCP-1; Scya2;	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The CC chemokine ligand 2 (CCL2), a member of the CC chemokine family, is a chemoattractant for monocytes and T cells through interaction with its receptor CCR2</li> <li>- MCP-1 as a key determinant in the development of skin fibrosis</li> </ul>	- genetic deletion of MCP-1 significantly impairs sustained monocyte recruitment in response to a chronic polymicrobial infection. The reduction in monocyte recruitment caused by deletion of MCP-1 rendered the

		Sigje; SMC-CF	<p>-IL-18 activated the PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 pathways. Inhibition of either of these pathways attenuated MCP-1 production in macrophages, and inhibition of both signaling pathways resulted in the complete inhibition of MCP-1 production</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- tumor-infiltrating T cells produce high levels of CCL2</li> <li>- MCP-1 secreted by bone marrow epithelial cells induces chemoattraction of 5T multiple myeloma cells and may be involved in the homing of myeloma cells to bone marrow.</li> </ul>	host more susceptible to infections.
TLR8 <b>toll-like receptor 8</b>	↑ HD +23,4x		- TLR8-mediated MEKK3-dependent IKKgamma phosphorylation might play an important role in the activation of IKK complex, leading to IkappaBalpha phosphorylation	
TLR4 <b>toll-like receptor 4</b>	↓ DR4 -4,6x	Lps; Ly87; Ran/M1; Rasl2-8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TLR-4 is a key mediator in the crosstalks between the innate immune system and the endocrine stress response</li> <li>- The toll-like receptor 4 signaling is as a model system to explore mechanisms by which different members of the nuclear-receptor superfamily repress proinflammatory programs of gene expression</li> <li>- TLR4-mediated signalling is regulated by Csk</li> <li>- SHIP1 inhibits TLR4-mediated LPS-induced activation of MAPKs and cytokine production primarily by a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism</li> <li>- RIP is essential for cell survival after TLR4 signaling and links TLR4 to the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway</li> <li>- TLR4 is directly involved in the production of MCP-1 and MIP-2 by peritoneal cells in a NF-kappaB-dependent manner, but the process does not require any MAP kinase activation</li> </ul>	- Macrophages from TLR4 knockout mice consistently produce higher TNF-alpha and IL-6 responses
Map3k1 <b>mitogen activated protein kinase kinase kinase 1</b>	↓ BZT -10x ↓ HD -18,5x	Mekk; MEKK1; MAPKKK1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Serine/Threonine protein kinases</li> <li>- MEKK1 regulates AP-1-dependent gene expression by regulating the expression, activity and degradation of component members of the AP-1 complex</li> <li>- MEKK1 is a downstream target of Bcr-Abl, and that the antiapoptotic effect of Bcr-Abl in chronic myelogenous leukemia cells is mediated via the MEKK1-NF-kappaB pathway</li> <li>- MEKK1 is activated by GSK3beta</li> <li>- plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP-beta-dependent gene expression in response to IFN-gamma</li> </ul>	
Tgfr2 <b>transforming growth factor, beta receptor II</b>	↓ BZT -9x ↓ HD -13,5x	DNIIR; RIIDN;; TbetaRII; TbetaR-II;	<ul style="list-style-type: none"> <li>- plays a central role in the regulation of lymphocyte homeostasis and prevention of autoimmunity</li> <li>- Overexpression of the type II transforming growth factor-beta receptor inhibits fibroblasts proliferation and activates extracellular signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- exhibit defective mammary ductal development, characterized in part by increased ductal epithelial cell turnover associated with an increase in stromal fibroblast abundance</li> <li>- Induced disruption of the transforming growth factor beta type II receptor gene in mice causes a lethal inflammatory disorder.that is transplantable</li> </ul>

<p>Bcl10 <b>B-cell leukemia/ lymphoma 10</b></p>	<p>↓ BZT -5,3x ↓ HD -23x</p>	<p>CLAP; ME10; cE10; CIPER; BCL-10; C81403; CARMEN</p>	<p>- Bcl10 is an essential positive mediator of IgE receptor Fc epsilon RI-dependent mast cell activation that selectively uncouples NF-kappa B-induced proinflammatory cytokine production from degranulation and leukotriene synthesis. - Knockout mice studies show BCL10 is required for the development of follicular, B1 and marginal-zone B cells and Nf-kb signaling in MZ B cells. - Bcl10 is post-translationally modified by Rip2 and has a role in T-cell signalling</p>	<p>- About one-third of homozygous null embryos die exhibiting exencephaly. Surviving mutants display immunological defects including severe immunodeficiency, abnormal B cell development and function, and impaired humoral response to bacterial infection</p>
<p>Il1r1 <b>interleukin 1 receptor, type I</b></p>	<p>↓ HD -26x ↑ CD19<sup>+</sup> +50x</p>	<p>CD121a; CD121b; Il1r- 1; MGC129154</p>	<p>- IL-1-dependent recruitment of IRAK-1 to the IL-1RI and subsequent phosphorylation of IRAK-1 is a prerequisite for nuclear translocation of IRAK-1 - IL-1R1 appears to be important for the recruitment of leukocytes across the blood-brain barrier - IL-1/IL-1Ra system is crucial for auto-antigen-specific T cell induction and contributes to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis</p>	
<p>Fos <b>FBJ osteosarcoma oncogene</b></p>	<p>↑ DR4 +11x</p>	<p>c-fos; D12Rfj1</p>	<p>- Although c-Fos is not essential for B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1) expression, c-Fos/activator protein-1 positively regulates Blimp-1 expression and terminal differentiation of activated B cells - c-Fos induced by a STAT3 signal requires the co-operative MEK/ERK signal for its nuclear translocation - Fos/Jun transcription factor complexes play a role in modulating both myeloid cell survival and differentiation - Maximal induction of Ras-stimulated c-fos serum response element is dependent upon its synergistic activation by C/EBP beta and Elk1</p>	<p>- develop a TNF-dependent arthritis in the absence of osteoclasts</p>
<p>Tnfrsf10b <b>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b</b></p>	<p>↑ CD19<sup>+</sup> +24x</p>	<p>MK; DR5; Ly98; KILLER; TRAILR2; Killer/Dr5</p>	<p>- DR5 has a limited role during embryogenesis and early stages of development but plays an organ-specific role in the response to DNA-damaging stimuli. - binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD</p>	<p>- develop normal lymphocyte populations but possess enhanced innate immune responses. TRAIL-R(-/-) mice exhibited increased clearance of murine cytomegalovirus that correlated with increased levels of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma</p>
<p>Tnfrsf1b <b>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b</b></p>	<p>↑ CD19<sup>+</sup> +7x ↓ HD -6x</p>	<p>p75; TNFBR; Tnfr2; CD120b; TNF- R2; TNFR80; Tnfr-1; TNF- R75; TNF-R-II</p>	<p>- TNFR2 is a primary mediator of fibrogenic actions of TNFalpha acting through ERK1/2 to stimulate proliferation and through STAT3 to stimulate TIMP-1 and inhibit collagen degradation - A novel site located at the carboxy-terminus of TNFR2 binds TNFR-associated factor 2 (TRAF2) indirectly and down-regulates rather than promotes NF-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase by TNFR2 - TRAF2 has a role in distinct and overlapping CD40 and TNF receptor 2/CD120b-mediated B lymphocyte activation</p>	<p>- The TNF-R2(-/-) mice show normal T-cell development and activity, but we find that they have increased resistance to TNF-induced death. Additionally, such mice injected subcutaneously with TNF show a dramatic decrease in tissue necrosis, indicating that this receptor plays a role in the necrotic effects of TNF</p>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF receptor 2 has a role in the phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway</li> <li>- LPS triggers a rapid shedding of CD120b via a protein kinase C- and Src-independent pathway mediated by p38 MAPK, furin, and metalloproteinase</li> <li>- CD120b signaling is required for optimal CD40-induced IgM secretion by B cells</li> </ul>	
IL10 <b>interleukin 10</b>	↑ CD19 <sup>+</sup> +19x	CSIF; IL-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CD8(+) Tregs are rapidly generated in the presence of IL-4 and IL-12 and produce IL-10</li> <li>- Akt plays a critical role in LPS-induced production of IL-10</li> <li>- CD4+CD25+ regulatory T cells can manipulate the adaptive immune response in vivo through the infectious induction of tolerance, specifically by promoting the formation of antigen-specific, IL-10-secreting regulatory T cells</li> <li>- activation of ERK leads to the phosphorylation of serine 10 on histone H3 at the il-10 gene</li> <li>- CIITA negatively regulates expression of IL-10 in dendritic cells (DCs); CIITA may direct DC function in ways that extend beyond control of major histocompatibility complex class II</li> <li>- IL-10 targets IKK activation in immature DCs and suppressing the PI3K pathway in part mediates blockade of the pathway</li> </ul>	- In IL-10-deficient mice, generated by gene targeting, lymphocyte development and antibody responses are normal, but most animals are growth retarded and anemic and suffer from chronic enterocolitis
Ripk2 <b>receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2</b>	↓ BZT -7x ↓ HD -13,5x	CCK; RICK; RIP2; CARD3; CARDIAK; D4Bwg0615e	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CARD6 is a regulator of NF-kappaB activation that modulates the functions of RICK protein</li> <li>- functions as an adaptor molecule, independent of its kinase activity, in transducing signals from immune receptors</li> <li>- RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling have roles in the inflammatory response in a murine model of Crohn disease</li> <li>- Rip-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase (RICK) is a key component of a pathway leading to NF-kappaB induction in inflammatory bowel disease</li> </ul>	- negative Rip2 inhibited NF-kappaB activation mediated by Toll-like receptor 4 and Nod1. In vivo, Rip2-deficient mice were resistant to the lethal effects of LPS-induced endotoxic shock. Furthermore, Rip2 deficiency results in impaired interferon-gamma production in both Th1 and natural killer cells, attributed in part to defective interleukin-12-induced Stat4 activation
Slc20a1 <b>solute carrier family 20 member 1</b>	↓ BZT -6,5x	Glv1; Glvr-1; AI607883	<ul style="list-style-type: none"> <li>- phosphate transport</li> <li>- The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors</li> </ul>	
Il6 <b>interleukin 6</b>	↑ TZT +6x ↑ DR4 (Milz) +5,5x	Il-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- transforming growth factor, beta 1 and IL-6 might play pivotal but opposing roles in the host tumor interaction</li> <li>- necrotic cell death induced by several stimuli coincides with NF-kappaB-and p38MAPK-mediated upregulation and secretion of IL-6;</li> <li>- IL-6 enhances proliferation of lymphoid-committed progenitors, indicating the IL-6 target cells are hematopoietic stem cells or multipotent progenitors</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mice with disruption of the gene encoding IL-6 seem to have a blunted response to lipopolysaccharide</li> <li>- the inflammatory acute-phase response after tissue damage or infection is severely compromised, whereas it is only moderately affected after challenge with lipopolysaccharide</li> </ul>



			<ul style="list-style-type: none"> <li>- transcription factor C/EBPbeta and the MAPK pathway play key roles in the response of the plasminogen gene to IL-6</li> <li>- IL-6 may both replace and mediate the effect of CD40 ligation by ablating the interferon-gamma-induced tolerogenic activity of CD8+ dendritic cells</li> </ul>	
Casp1 <b>caspase 1</b>	↓ DR4 (Milz) -3x	ICE; I11bc	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caspase-1 is required for the secretion of proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1beta and IL-18, and is involved in the control of many bacterial infections</li> <li>- caspase-1 modulates apoptosis of both peripheral blood and inflammatory neutrophils</li> <li>- NALP3 plays a specific role in the caspase-1 activation pathway</li> <li>- Expression of caspase-1 is stimulated by high levels of lipopolysaccharide-induced IL-18 and results in sustained synthesis of IL-18 until the death of the animals</li> </ul>	- caspase-1 -/- mice are functionally protected against endotoxemic acute renal failure
Tnfsf14 <b>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14</b>	↑ HD +10x	LTg; HVEM-L; LIGHT; Ly113; HVEM-L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The expression of LIGHT inside tumors leads to rapid rejection in a natural killer-dependent manner</li> <li>- LIGHT plays a role in negative selection of thymocytes via inducing the apoptosis of thymocytes bearing high affinity T cell receptors</li> <li>- LIGHT, signaling via lymphotoxin beta-specific receptor, in supporting the development and maintenance of the lymphoid microenvironment</li> <li>- LIGHT selectively plays a role in CD8+ T cell activation but is not required for Th cell-dependent humoral responses</li> <li>- forced expression of LIGHT in the tumor environment induces a massive infiltration of naive T lymphocytes that correlates with an upregulation of both chemokine production and expression of adhesion molecules</li> </ul>	- targeted disruption causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis
Tlr2 <b>toll-like receptor 2</b>	↑ HD +16x	Ly105	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tlr2 engagement on T cells lowers the activation threshold for costimulatory signals delivered by antigen-presenting cells</li> <li>- TLR2 controls the function of regulatory T cells (Tregs) and establishes a direct link between TLRs and the control of immune responses through Tregs</li> <li>- TLR2 signaling arrests/retards B lymphocyte maturation, whereas TLR4 favors that process</li> <li>- RIP3 is not an essential modulator of NF-kappa B signaling downstream of several receptor systems, including TLR2</li> <li>- With Tlr4, activates STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages</li> </ul>	- In the absence of TLR2, murine macrophages do not generate calcium fluxes or induce proinflammatory signaling
F2r <b>coagulation factor II (thrombin) receptor</b>	↑ BZT +6,5x ↑ HD +9x	Cf2r; Par1; ThrR;	<ul style="list-style-type: none"> <li>- membrane-bound, G-protein-coupled receptor for the serine protease thrombin. This receptor is expressed in a wide variety of cells and tissues, and elicits a range of physiological responses associated with tissue injury, inflammation, and wound repair</li> </ul>	- homozygous (-/-) for the disrupted allele, indicating a profound effect on embryonic development. Paradoxically, adult ThrR-/- mice appeared to be normal by anatomical and histological analysis, including their platelet number and function

<p>FasL <b>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</b></p>	<p>↑ BZT +9x ↑ HD +6,3x</p>	<p>gld; CD178; CD95L; Fas-L; Tnfsf6; APT1LG1; Fas-Ligand</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- While FasL is a death-inducing ligand for Fas, it also transduces a costimulatory signal through its intracellular domain</li> <li>- critical role for Fas-FasL engagement in embryo stem cell engraftment</li> <li>- FasL induces NF-kappaB activation and IL-8 production by a novel mechanism, distinct from that of TNF-alpha</li> <li>- Inactivation of neutrophils by tumor FasL is an important mechanism by which tumor cells escape immune attack</li> <li>- role for the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in regulating myeloid progenitor cell kinetics.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- germline deletion of the floxed FasL gene results in a dramatic lymphoproliferation leading to an accelerated death of animals</li> <li>- FasL(-/-) mice exhibited an extreme splenomegaly and lymphadenopathy associated with lymphocytic infiltration into multiple organs and autoimmune disease</li> </ul>
<p>Il1a <b>interleukin 1 alpha</b></p>	<p>↑ CD19+ +8x</p>	<p>Il-1a</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis</li> <li>- IKKbeta phosphorylates multiple p65 sites, as well as in an IkappaB-p65 complex, and S468 phosphorylation slightly reduces TNF-alpha- and IL-1beta-induced NF-kappaB activation</li> <li>- IL-1alpha precursor interacts via its N-terminal peptide (IL-1NTP) with histone acetyltransferases</li> <li>- the PI 3-kinase/Akt and ERK signaling pathways in the promotion of osteoclast survival by IL-1alpha.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mice homozygous for disruptions in this gene display an essentially normal phenotype. However, development of Th2 helper cell responses and some antibody responses are compromised</li> </ul>
<p>Rel <b>reticuloendotheliosis oncogene</b></p>	<p>↑ CD19+ +7x</p>	<p>c-Rel</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- regulation of cytokine gene expression in T cells in response to antigen, cytokine and mitogenic stimulation</li> <li>- c-Rel, but not RelA, is essential for the correct pattern of chromatin remodeling and IL-2 gene transcription in CD4+ primary T cells</li> <li>- B cells lacking NF-kappaB1 and c-Rel fail to increase in size upon mitogenic stimulation due to a reduction in induced c-myc expression</li> <li>- c-Rel is essential for Th1 cell differentiation and Th1 cell-mediated autoimmune inflammation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mice with a null mutation in the lymphoid-specific c-Rel gene have normal development of lymphoid tissues and T cell compartment. However, T cells derived from the c-Rel knockout mice have several functional abnormalities. The c-Rel-deficient T lymphocytes fail to respond to activation and proliferation signals mediated by the TCR and mitogens in vitro</li> </ul>
<p>Tnf <b>tumor necrosis factor</b></p>	<p>↑ BZT +7x ↑ HD +4,6x</p>	<p>DIF; Tnfa; TNFSF2; Tnfsf1a; TNFalpha</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF appears to play a critical role in both early and late events involved in inflammation, from localizing the noxious agent and amplifying the cellular and mediator responses at the local site and systemically, to editing (e.g., apoptosis) injured cells or effete immune cells and repairing inflammatory damage</li> <li>- NF-kappaB and AP-1 transcriptional activation and TNF and NO production are induced by polyinosinic acid</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutations at this locus primarily affect the immune system, causing increased susceptibility to infection, failure to form splenic B-cell follicles, increased inflammation and impaired contact hypersensitivity. Homozygotes also may show metabolic defects</li> </ul>
<p>Rela <b>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</b></p>	<p>↓ BZT -5x ↓ HD -7 x</p>	<p>p65</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- key regulator of genes involved in responses to infection, inflammation and stress</li> <li>- RelA has a major regulatory role serving to dampen RelB activity in response to TNF-alpha, an essential step leading to selective NF-kappaB target gene expression</li> <li>- IKKbeta phosphorylates multiple p65 sites, as well as in an IkappaB-p65 complex, and S468 phosphorylation slightly reduces TNF-alpha- and IL-1beta-induced NF-kappaB activation</li> <li>- localization of p65 to the promoter regions of the interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein 1 genes following tumor necrosis factor alpha treatment requires GSK-3beta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mice lacking the RelA subunit of NF-kappaB background born lack lymph nodes, Peyer's patches, and an organized splenic microarchitecture, and have a profound defect in T cell-dependent antigen responses</li> <li>- Disruption of the relA locus leads to embryonic lethality at 15-16 days of gestation, concomitant with a massive degeneration of the liver by programmed cell death or apoptosis</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- control of IkappaBbeta protein by p65 is necessary for the maintenance of cellular homeostasis</li> <li>- Syk induced the tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha, which caused the dissociation, phosphorylation, and nuclear translocation of p65 NFkB</li> </ul>	
<b>TLR3 toll-like receptor 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ HD +6,7x</li> <li>↑ DR4 (Milz) +4,7x</li> </ul>	<b>AI957183</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mammalian TLR3 recognizes dsRNA, and that activation of the receptor induces the activation of NF-kappaB and the production of type I interferons (IFNs)</li> <li>- MyD88 is an adaptor protein that is shared by all the known TLRs</li> <li>- TLR3 has a role in innate and adaptive immune responses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TLR3-deficient (TLR3<sup>-/-</sup>) mice showed reduced responses to polyinosine-polycytidylic acid (poly(I:C)), resistance to the lethal effect of poly(I:C) when sensitized with d-galactosamine (d-GalN), and reduced production of inflammatory cytokines</li> </ul>
<b>Ifng interferon gamma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ DR4 (Milz) +4,4x</li> <li>↑ BZT +3,7x</li> </ul>	<b>Ifg; IFN-g; IFN-gamma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transcriptional competence of the interferon-gamma (IFN-gamma) locus is enhanced as Th1 effectors develop from naive CD4 T lymphocytes.</li> <li>- Interferon-gamma (IFN-gamma) is a pleiotropic cytokine with immunomodulatory effects on a variety of immune cells</li> <li>- required for activation-induced death of T lymphocytes</li> <li>- phosphorylation of STAT4 on both tyrosine and serine residues is important in promoting normal T(H)1 differentiation and IFN-gamma secretion</li> <li>- IL-10 and IL-12 are key functional regulators of LPS-induced IFN-gamma production</li> <li>- MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- These mice developed normally and were healthy in the absence of pathogens. However, mice deficient in IFN-gamma had impaired production of macrophage antimicrobial products and reduced expression of macrophage major histocompatibility complex class II antigens</li> </ul>
<b>TLR6 toll-like receptor 6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ BZT +4,4x</li> <li>↓ CD19<sup>+</sup> -3,2x</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1 is activated by saturated fatty acid and inhibited by polyunsaturated fatty acid</li> <li>- Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors 2 and 6.</li> <li>- TLR6 recognizes MALP-2 cooperatively with TLR2, and appears to discriminate between the N-terminal lipoylated structures of MALP-2 and lipopeptides derived from other bacteria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TLR6-deficient (TLR6<sup>-/-</sup>) cells are unresponsive to MALP-2 but retain their normal responses to lipopeptides of other bacterial origins. Reconstitution experiments in TLR2<sup>-/-</sup> TLR6<sup>-/-</sup> embryonic fibroblasts reveal that co-expression of TLR2 and TLR6 is absolutely required for MALP-2 responsiveness.</li> <li>- TLR6 KO mice were not different from wild-type mice in terms of pulmonary tuberculosis histopathology, mRNA expression and CFU assay</li> </ul>
<b>Gja1 gap junction membrane channel protein alpha 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ DR4 (Milz) +3,8x</li> </ul>	Cx43; Npm1; Cnx43; Gja-1; Cx43alpha1 connexin43	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gap junctions are made up of connexin proteins, which comprise a multigene family in mammals</li> <li>- one of the most prevalent connexin proteins</li> <li>- Large number of genes are statistically altered in mice with decreased expression of Cx43</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mutant embryos died at birth, as a result of a failure in pulmonary gas exchange caused by a swelling and blockage of the right ventricular outflow tract from the heart. This finding suggests that Cx43 plays an essential role in heart development but that there is functional compensation among connexins in other parts of the developing fetus</li> </ul>
<b>Il1b interleukin 1 beta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ CD19<sup>+</sup> +6x</li> </ul>	<b>Il-1b; IL-1beta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GSK-3beta selectively regulates NFkappaB-mediated inflammatory gene expression of IL-1beta and TNF-alpha by controlling the flow of NFkappaB activity between transcription of inflammatory and survival genes</li> <li>- IL-1 beta drives proliferation and cytokine production by CD4+CD25+FoxP3- effector/memory T cells, attenuates</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Homozygous null mutants show impaired contact hypersensitivity and reduced acute-phase inflammatory response. Lung tumors and metastases of B16 melanoma do not occur in null mutant mice, suggesting inability to support tumor invasiveness and angiogenesis</li> </ul>

			<p>CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cell function, and allows escape of CD4+CD25- autoreactive effectors from suppression</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- IKKbeta phosphorylates multiple p65 sites, as well as in an IkappaB-p65 complex, and S468 phosphorylation slightly reduces TNF-alpha and IL-1beta-induced NF-kappaB activation</li> <li>- Gm-Csf induces high levels of IL-1beta</li> </ul>	
<p>Akt1 <b>thymoma viral proto-oncogene 1</b></p>	<p>↑ TZT +3,8x</p>	<p>Akt; Pkb; Pkb/Akt; Pkbalpha</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Akt plays a role in activation of basal and induced non-canonical NF-kappaB activity</li> <li>- Epidermal growth factor receptor-phosphoinositide-3-kinase (PI3K) signaling through Akt and ERK kinases regulates ROS-dependent, hyperoxia-induced Nrf2 activation in pulmonary epithelial cells</li> <li>- activation of PKCdelta and PKCepsilon provide a negative regulation for Akt phosphorylation and kinase activity in mouse keratinocytes and serve as modulators of cell survival pathways in response to external stimuli</li> <li>- PI3 kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death</li> <li>- Akt is localized to the plasma membrane by calmodulin for its activation by PI-3 kinase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Akt1(-/-) mice demonstrated defects in both fetal and postnatal growth, and these persisted into adulthood</li> <li>- Akt1(-/-) mice are viable but smaller when compared to wild-type littermates. In addition, the life span of Akt1(-/-) mice, upon exposure to genotoxic stress, is shorter</li> </ul>
<p>Relb <b>avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B</b></p>	<p>↓ BZT -5x</p>	<p>MGC143683; MGC143684</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF-alpha stimulation causes RelA to associate with RelB in the nucleus, inhibiting RelB's interaction with DNA and Bcl-xL transcription. Ser276 phosphorylation controls RelA's interaction with RelB.</li> <li>- Physiologically mediated shifts in the balance between RelB and Bcl-3 in the nuclei of activated CD4+ T cells might regulate the balance between Th1 and Th2 cell responses</li> <li>- Results identify a novel type of NF-kappaB-binding site in IkappaB kinase alpha-dependent chemokine gene promoters that is preferentially recognized by RelB:p52 dimers</li> <li>- Results show that NF-kappa B-inducing kinase is necessary for RelB activation upon triggering of surface receptors.</li> <li>- Cross-priming of cytotoxic T lymphocytes is under control of relB gene</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dramatic reduction of constitutive kappa B-binding activity in thymus and spleen. Mice homozygous for the disrupted relB locus had phenotypic abnormalities including multifocal, mixed inflammatory cell infiltration in several organs, myeloid hyperplasia, splenomegaly due to extramedullary hematopoiesis, and a reduced population of thymic dendritic cells</li> <li>- RelB plays a decisive role in the hematopoietic system, and its absence cannot be functionally compensated by any other member of the NF-kappa B/Rel family</li> </ul>
<p>Crebbp <b>CREB binding protein</b></p>	<p>↓ BZT -3,6x ↓ HD -7x</p>	<p>CBP; AW558298</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- individually CBP and p300 are partially limiting beyond the pro-B-cell stage and other coactivators in B cells cannot replace their combined loss.</li> <li>- acetylation of PARP-1 by p300/CREB-binding protein plays an important regulatory role in NF-kappaB-dependent gene activation by enhancing its functional interaction with p300 and the Mediator complex</li> <li>- Cbp has a role in Csk localization in lipid rafts but not in T-cell development</li> <li>- has a distinct role in hematopoietic stem cell self-renewal</li> <li>- E2A-PBX1 interacts directly with the KIX domain of CBP/p300 in the induction of proliferation in primary hematopoietic cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Loss of either p300 or CBP led to a decrease in CD4+ CD8+ double-positive thymocytes, but an increase in the percentage of CD8+ single-positive thymocytes seen in CBP mutant mice was not observed in p300 mutants</li> <li>- Deletion of both CBP alleles in the mouse leads to early embryonic lethality</li> </ul>

<p>Tbk1 <b>TANK-binding kinase 1</b></p>	<p>↓ BZT -3,6x</p>	<p>Tbk;NAK; T2K;AI462036 ; AW048562; 1200008B05Ri k</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- interferon-A genes differentially affects virus-induced expression and responsiveness to TBK1 and IKKepsilon</li> <li>- TBK1 plays an important role in the Toll-like receptor-mediated IFN response</li> <li>- T2K has a unique role in the activation of NF-kappaB-directed transcription, apparently independent of I-kappaB degradation and NF-kappaB DNA binding</li> </ul>	<p>- t2k(-/-) animals die at approximately E14.5 of massive liver degeneration and apoptosis</p>
<p>Bcl3 <b>B-cell leukemia/lymphoma 3</b></p>	<p>↓ BZT -3,2x</p>	<p>Bcl-3; AI528691</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bcl-3 acts as a member of a critical survival signaling pathway in activated T-cells.</li> <li>- Bim-independent pathway to activated T cell death</li> <li>- inactivation of TRAF2 controls survival and inflammation, while inhibition of Bcl-3 controls proliferation and tumor growth.</li> <li>- Bcl-3 is inducible by DNA damage and is required for the induction of Hdm2 gene expression and the suppression of persistent p53 activity</li> <li>- Physiologically mediated shifts in the balance between Bcl-3 and RelB in the nuclei of activated CD4+ T cells might regulate the balance between Th1 and Th2 cell responses.</li> <li>- IL-10-induced Bcl-3 inhibited LPS-induced production of TNF-alpha, but not IL-6, in macrophages; nuclear translocation of NF-kappaB p65 was not impaired; DNA binding by NF-kappaB p50/p65 was profoundly inhibited.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bcl 3(-/-) mice appear developmentally normal, but exhibit severe defects in humoral immune responses and protection from in vivo pathogenic challenges</li> <li>- spleens from Bcl-3(-/-) mice are abnormal and void of germinal centers. In contrast, the p50(-/-) mice have normal germinal centers. We propose that in in vivo, Bcl-3 can function independently of p50</li> </ul>
<p>Tnfrsf7 <b>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7</b></p>	<p>↑ HD +6x</p>	<p>Cd27; S152; Tp55</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hematopoiesis is modulated by immune activation through interactions between CD27 and CD70</li> <li>- CD27 is a key marker of the natural (NK) cell lineage, dividing the mature Mac-1high NK cell pool into two functionally distinct subsets</li> <li>- The novel costimulatory CD27-CD70 pathway is critical for CD28-independent effector/memory CD8+ alloreactive T cell activation in vivo</li> <li>- . Signaling through CD27 during B cell priming inhibits primary antibody responses and induces differentiation into the memory lineage</li> <li>- persistent delivery of costimulatory signals via CD27-CD70 interactions, as may occur during chronic active viral infections, can exhaust the T cell pool and is sufficient to induce lethal immunodeficiency</li> </ul>	<p>- Mice homozygous for disruptions in this gene have a normal phenotype. However, T-cell development immune responses are abnormal.</p>
<p>Card10 <b>caspase recruitment domain family, member 10</b></p>	<p>↑ HD +3,9x</p>	<p>Bimp1; CARMA3; AI449026</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- activation of NF-kappaB-inducing kinase</li> <li>- CARD10 is a novel BCL10 interactor that belongs to the membrane-associated guanylate kinase family, a class of proteins that function to organize signaling complexes at plasma membranes. When expressed in cells, CARD10 binds to BCL10 and signals the activation of NF-kappaB through its N-terminal effector CARD domain. We propose that CARD10 functions as a molecular scaffold for the assembly of a BCL10 signaling complex that activates NF-kappaB</li> <li>- Expression of the NEMO-binding region of CARMA3 exerts a dominant negative effect on Bcl10-mediated activation of NFkappaB</li> </ul>	

<p>Nfkb1 <b>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105</b></p>	<p>↓ HD -6,3x</p>	<p>p50; p105; NF-kb1; p50/p105; NF-kappaB; NF-kappaB1</p>	<p>- NF-kappa B, a heterodimeric transcription factor composed of p50 and p65 subunits, can be activated in many cell types and is thought to regulate a wide variety of genes involved in immune function and development -gene transactivation by the transcription factor NF-kappaB is subject to the regulation of a dynamic balance between the coactivators and corepressors in the IkappaB alpha promoter</p>	<p>- Mice lacking the p50 subunit of NF-kappa B show no developmental abnormalities, but exhibit multifocal defects in immune responses involving B lymphocytes and nonspecific responses to infection</p>
<p>Tgfr1 <b>transforming growth factor, beta receptor I</b></p>	<p>↓ HD -7x</p>	<p>ALK5; Alk-5; TbetaRI; AU017191; TbetaR-I</p>	<p>- Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase - TGFBR1 is required for transforming growth factor (TGF)-beta type II-B receptor to bind TGF-beta2 In the absence of type III receptor - sphingosine 1-phosphate receptors and the transforming growth factor beta-type I receptor serine/threonine kinase are essential for activation of Smad3 by lysophospholipids</p>	<p>- Mice lacking TbetaRI die at midgestation, exhibiting severe defects in vascular development of the yolk sac and placenta, and an absence of circulating red blood cells</p>
<p>Tnfrsf1a <b>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a</b></p>	<p>↑ HD +4,5x</p>	<p>FPF; p55; TNF-R; TNFAR; Tnfr1; p55-R; CD120a; TNF-R1; TNFR60; Tnfr-2; TNF-R-I; TNF-R55; TNFRp55</p>	<p>- CpG islands are found within the promoter regions of both human and mouse TNFR1 (TNFRSF1) genes - Role of this receptor in the inflammatory response to intimal injury. - he majority of biologic responses classically attributed to TNF are mediated by p55. In contrast, p75 has been proposed to function as both a TNF antagonist by neutralizing TNF and as a TNF agonist by facilitating the interaction between TNF and p55 at the cell surface</p>	<p>- Homozygotes for targeted null mutations exhibit disrupted splenic architecture, increased adult liver weights, reduced IgG immune response, deficits in some host defense and inflammatory responses, LPS resistance, and reduced graft-vs-host disease - Thymocyte development and lymphocyte populations are unaltered, and clonal deletion of potentially self-reactive T cells is not impaired. However, TNF signaling is largely abolished, as judged by the failure of TNF to induce NF-kappa B in T lymphocytes from TNFRp55-deficient mice</p>

**D) Veröffentlichungen:**

**1.** Su Z, Peluso MV, **Raffegerst SH**, Schendel DJ, Roskrow MA.

Antigen presenting cells transfected with LMP2a RNA induce CD4<sup>+</sup> LMP2a-specific cytotoxic T-lymphocytes which kill via a Fas-independent mechanism.

Leuk Lymphoma. 2002 Aug;43(8):1651-62.

**2.** Su Z, Peluso MV, **Raffegerst SH**, Schendel DJ, Roskrow MA.

The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease.

Eur J Immunol. 2001 Mar;31(3):947-58.

**3.** Regn S, **Raffegerst S**, Chen X, Schendel D, Kolb HJ, Roskrow M.

Ex vivo generation of cytotoxic T lymphocytes specific for one or two distinct viruses for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic bone marrow transplant.

Bone Marrow Transplant. 2001 Jan;27(1):53-64.

**4.** Chen X, Woiciechowsky A, **Raffegerst S**, Schendel D, Kolb HJ, Roskrow M.

Impaired expression of the CD3-zeta chain in peripheral blood T cells of patients with chronic myeloid leukaemia results in an increased susceptibility to apoptosis.

Br J Haematol. 2000 Dec;111(3):817-25.

**5.** Chen X, Regn S, **Raffegerst S**, Kolb HJ, Roskrow M.

Interferon alpha in combination with GM-CSF induces the differentiation of leukaemic antigen-presenting cells that have the capacity to stimulate a specific anti-leukaemic cytotoxic T-cell response from patients with chronic myeloid leukaemia.

Br J Haematol. 2000 Nov;111(2):596-607.

**Abstracts:**

**1.** Zhen Su, Mario Peluso, **Silke Raffegerst**, Dolores Schendel, Marie Roskrow

Dendritic cells transfected with LMP2a RNA induce CD4<sup>+</sup> LMP2a-specific CTLs which kill via a Fas-independent mechanism.

American Society Hematology, Blood 979, 2001.

**2.** Zhen Su, Mario Peluso, **Silke Raffegerst**, Dolores Schendel, Marie Roskrow

LMP2a specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV+ Hodgkin disease.

American Society Hematology, Blood 96(11):1470, 2000.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht als:

**3.** J. Mysliwicz, S. Kunder, **S. Raffegerst**, D.J. Schendel and L. Quintanilla-Martinez

Aged HLA-DR4-IE- transgenic mice develop spontaneous hematological neoplasms.

12<sup>th</sup> International Congress of Immunology and 4<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS. 2004 **E)**

**E) Lebenslauf**

**Name:** Silke Heike Raffegerst

**Geboren am:** 18.04.1975

**Geboren in:** in Coburg, Deutschland

**Familienstand:** ledig

**Nationalität:** deutsch

e-mail: [silke.raffegerst@gsf.de](mailto:silke.raffegerst@gsf.de)

**Abitur:**

1986-1994

Ehrenbürg-Gymnasium Forchheim  
Leistungskurse: Biologie, Französisch  
Facharbeitsthema:  
*„Katalase-eines der wirksamsten Enzyme“*

**FÖJ:**

01.08.94-31.07.95

Freiwilliges ökologisches Jahr bei der  
Deutschen Jugend in Europa  
Landesverband Hessen e.V.  
D-36163 Poppenhausen-Rodholz

**Studium:**

01.10.95-30.09.97

4 Semester Verfahrenstechnik an der  
Georg-Simon-Ohm Fachhochschule Nürnberg

01.10.02-30.08.03

Master of Science in Medizinischer Molekularer Biologie  
an der Westminster-Universität in London  
Diplomarbeit-Thema:  
*„Selection of Human RBP-Jk Specific single chain  
fragments by Phage Display Technology“*

**Praxissemester:**

11.09.96-13.03.97

Fa. UWATEC GmbH,  
91233 Neunkirchen am Sand



**Berufsausbildung:**

13.10.97-28.07.99                      Ausbildung zur Biologisch-Technischen-Assistentin (BTA)  
an der Berufsfachschule der LGA Bayern, 90431 Nürnberg

**Praktikum:**

22.02.99-05.03.99                      Lehrstuhl für Biochemie an der  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

**Berufstätigkeit:**

01.09.99-31.12.00                      BTA in KKG Prof. H.-J. Kolb/AG Dr. M. Roskrow  
Institut für Molekulare Immunologie  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

01.01.01-31.12.01                      BTA in AG Prof. D.J. Schendel  
Institut für Molekulare Immunologie  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

01.01.02-31.08.02                      BTA in KKG Dr. H. Pohla/Prof. D.J. Schendel  
Labor für Tumorummunologie  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

**Promotion:**

01.10.03-31.01.07                      Promotion in Humanbiologie in der AG Prof. D.J. Schendel  
Institut für Molekulare Immunologie  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Thema der Doktorarbeit:  
*„Entstehung hämatologischer Erkrankungen in der DR4-IE  
transgenen Maus. Die Entwicklung eines Hodgkin-like  
Modells in der Maus“*

**Kenntnisse:**

Fremdsprachen: Englisch, Französisch,  
Gute EDV-Kenntnisse