

Funktionelle Charakterisierung linien-fremder Signalwege für Wachstum, Überleben und Reprogrammierung lymphatischer Zellen

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Björn Lamprecht

geb. am 27.5.1980 in Berlin

Präsident der Humboldt Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Achim Leutz
2. Prof. Dr. Wolfgang Uckert
3. Prof. Dr. Reinhold Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
ZUSAMMENFASSUNG	5
WIDMUNG	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 CYTOKINE.....	9
1.2 INTERLEUKIN-21 UND INTERLEUKIN-21 REZEPTOR.....	10
1.2.1 <i>Struktur des Rezeptors und des Liganden</i>	10
1.2.2 <i>Molekulare Grundlagen für den IL-21 Signalweg</i>	11
1.2.3 <i>Regulation, Expression und Funktion von IL-21 und IL-21R</i>	11
1.2.4 <i>Die Rolle von IL-21 bei Tumoren und Autoimmunkrankheiten</i>	13
1.3 KOLONIE-STIMULIERENDER FAKTOR UND KOLONIE-STIMULIERENDER FAKTOR REZEPTOR	14
1.3.1 <i>Struktur des CSF-1 Cytokins</i>	15
1.3.2 <i>Funktionen von CSF-1</i>	16
1.3.3 <i>Struktur des CSF1R</i>	16
1.3.4 <i>Signalwege des CSF1R</i>	17
1.3.5 <i>Regulation des CSF1R Gens</i>	18
1.4 DIE B-ZELLE	21
1.4.1 <i>Die Entwicklung der B-Zelle</i>	22
1.4.2 <i>Transkriptionsfaktoren in B-Zellen</i>	24
1.5 DAS HODGKIN LYMPHOM.....	26
1.5.1 <i>Die Geschichte des Hodgkin Lymphoms</i>	27
1.5.2 <i>Der zelluläre Ursprung der HRS Zellen</i>	28
1.5.3 <i>Transkriptionsfaktornetzwerke in HRS Zellen</i>	30
1.5.4 <i>Molekulare Defekte in HRS Zellen</i>	31
1.5.5 <i>Deregulierte Signalwege in HRS Zellen</i>	32
1.5.6 <i>Das zelluläre Umfeld der HRS Zellen und die Rolle von Cytokinen im Hodgkin Lymphom</i>	34
1.6 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	35
2 MATERIAL UND METHODEN	36
2.1 MATERIAL	36
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	36
2.1.2 <i>Humane Zelllinien</i>	37
2.1.3 <i>Bakterienstämme</i>	38
2.1.4 <i>Radioaktive Verbindungen</i>	38
2.1.5 <i>Antikörper</i>	38
2.1.6 <i>Enzyme</i>	39
2.1.7 <i>Kits</i>	39
2.1.8 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	40
2.1.9 <i>Plasmide und BAC Klone</i>	40
2.1.10 <i>Oligonukleotide</i>	40
2.1.10.1 <i>PCR</i>	40
2.1.10.2 <i>EMSA</i>	41
2.1.10.3 <i>siRNA</i>	41
2.1.10.4 <i>Bisulfit-Pyrosequenzierung</i>	42
2.1.11 <i>Rekombinante Proteine</i>	42
2.1.12 <i>Puffer</i>	42
2.1.13 <i>Geräte</i>	43
2.1.14 <i>Software</i>	43
2.2 METHODEN.....	44
2.2.1 <i>Zellkultur</i>	44

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.1	Zellkulturbedingungen	44
2.2.1.2	Aufreinigung primärer Zellen	44
2.2.1.3	Transiente Transfektion von Zellen	44
2.2.1.4	Generierung stabiler Klone	45
2.2.2	DNA	46
2.2.2.1	Molekulare Klonierungen	46
2.2.2.2	Sequenzierung von DNA	47
2.2.2.3	Mutagenese von Promotorkonstrukten	47
2.2.2.4	PCR Techniken	48
2.2.2.4.1	Reverse Transkriptase-PCR	48
2.2.2.4.2	Quantitative Real-Time PCR	48
2.2.2.4.3	5'-RLM-RACE PCR	48
2.2.2.5	Methylierungsexperimente	49
2.2.3	RNA	49
2.2.3.1	RNA Präparation	49
2.2.3.2	cDNA Synthese	49
2.2.3.3	Northern Blot	50
2.2.4	Protein	51
2.2.4.1	Präparation von Gesamtprotein	51
2.2.4.2	Western Blot und Immunoblotdetektion	52
2.2.4.3	EMSA	52
2.2.4.4	Stimulation mit rekombinanten Proteinen, Rezeptor :Fc Konstrukten und agonistischen Antikörpern	53
2.2.4.5	Immunopräzipitation von CSF1R	54
2.2.4.6	ELISA	54
2.2.4.7	Durchflusscytometrie	55
2.2.5	Immunhistologie	55
2.2.5.1	Immunhistochemische Färbung	56
2.2.5.2	In situ Hybridisierung	56
2.2.6	Behandlung von Zellen mit agonistischen Antikörpern gegen CD95 oder CSF1R inhibierenden Molekülen	56
2.2.6.1	CD95 Stimulation	56
2.2.6.2	Stimulation von Zellen mit CSF1R inhibierenden Molekülen	57
2.2.7	Messung der Apoptoserate mit Annexin-FITC/PI Färbung	57
2.2.8	Messung der DNA Syntheserate durch ³ [H]-Thymidin Einbau	58
2.2.9	Experimente zur Migration von Zellen	58
2.2.10	Reportergenstudien	59
2.2.11	Behandlung von Zellen mit 5-Aza-dC und/oder TSA	59
3	ERGEBNISSE	60
3.1	IL-21/ IL-21R	60
3.1.1	Expression von IL-21 und IL-21R in HRS Zellen	60
3.1.2	IL-21 führt zur Aktivierung von STAT3 Proteinen in HRS Zellen	63
3.1.3	IL-21 aktiviert STAT3 Zielgene in HRS Zellen	67
3.1.4	IL-21 führt zur Resistenz von HRS Zellen gegenüber CD95 induzierter Apoptose	70
3.1.5	IL-21 ist an der Regulation des Chemotaxis induzierenden Proteins MIP-3α beteiligt	73
3.1.6	MIP-3α induziert Chemotaxis von regulatorischen T-Zellen	75
3.1.7	IL-21 und MIP-3α Expression in primären Lymphomen	78
3.2	CSF-1/CSF1R	80
3.2.1	Expression von CSF-1 und CSF1R in HRS Zellen	80
3.2.2	Funktionelle Charakterisierung von CSF-1 und CSF1R in HRS Zellen	85
3.2.3	Stabile ektope Expression von CSF1R in Non-Hodgkin B- und T-Zelllinien	90
3.2.4	Regulation der CSF-1 Expression in HRS Zellen	92
3.2.5	Regulation der CSF1R Expression in HRS Zellen	94
3.2.5.1	Der klassische CSF1R Promotor ist nicht aktiv in HRS Zelllinien	95
3.2.5.2	Das CSF1R Transkript in HRS Zellen unterscheidet sich von dem in myeloiden Zellen	97
3.2.5.3	Das CSF1R Transkript im Hodgkin Lymphom initiiert -6.5 kb stromaufwärts des myeloiden Promotors	99
3.2.5.4	Die Expression des nicht-kanonischen CSF1R Transkripts wird von einer LTR Region reguliert	104
3.2.5.5	Epigenetische Modifikationen führen zu einer Aktivierung des LTR getriebenen CSF1R Transkripts in Non-Hodgkin Zelllinien	109
3.2.6	Der Verlust der CBFA2T3 Expression ist verantwortlich für die De-Repression des THE1B LTR Elements und die Expression von CSF1R im Hodgkin Lymphom	111

Inhaltsverzeichnis

4 DISKUSSION	117
4.1 PATHOLOGISCHE KONSEQUENZEN LINIEN-FREMDER SIGNALWEGE IM HODGKIN LYMPHOM	117
4.1.1 <i>IL-21/IL-21R</i>	117
4.1.2 <i>CSF-1/CSF1R</i>	120
4.2 REGULATION DER EXPRESSION LINIEN-FREMDER PROTEINE IM HODGKIN LYMPHOM	122
ANHANG	128
DANKSAGUNG	128
ERKLÄRUNG	129
PUBLIKATIONEN	130
QUELLENVERZEICHNIS	131

Zusammenfassung

Cytokine steuern die Kommunikation von verschiedenen Zelltypen untereinander und regulieren deren Überleben, Differenzierung und Wachstum. Sie steuern dabei Immunantworten bei Pathogenbefall und koordinieren zwischen den Antworten des adaptiven und des angeborenen Immunsystems. Kommt es zu einer Deregulation der Expression von Cytokinen oder deren Rezeptoren, kann es zu autoimmunen oder malignen Erkrankungen kommen. Ein besonderes Beispiel der aberranten Cytokinexpression ist das klassische Hodgkin Lymphom. Die malignen Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) Zellen des Hodgkin Lymphoms stammen ursprünglich aus Keimzentrum B-Zellen, haben aber ihren B-Zell Phänotyp verloren. Sie exprimieren eine Vielzahl von verschiedenen Cytokinen und Cytokinrezeptoren, die ursprünglich nicht in einem Genexpressionsprogramm von B-Zellen vorkommen. In dieser Arbeit wurden zwei dieser Cytokin-Rezeptorsysteme (IL-21/IL-21R und CSF-1/CSF1R) hinsichtlich ihrer Funktionen für die HRS Zellen des Hodgkin Lymphoms charakterisiert.

Das hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen exprimierte Cytokin IL-21 ist in den untersuchten HRS Zelllinien und in HRS Zellen von Gefrierschnitten betroffener Lymphknoten von Hodgkin Patienten exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die gleichzeitige Expression des IL-21R in den HRS Zellen eine autokrine Stimulation stattfindet. IL-21 aktiviert STAT3 Proteine in den HRS Zelllinien, reguliert STAT3 Zielgene und konnte in einer Zelllinie vor CD95 induzierter Apoptose schützen. Des Weiteren wurde eine Beteiligung von IL-21 an der Expression des CC-Chemokins MIP-3 α demonstriert. In Experimenten mit HRS Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass MIP-3 α in der Lage ist, die Migration von regulatorischen T-Zellen zu stimulieren. MIP-3 α könnte damit zu einem immunsuppressiven Umfeld der HRS Zellen *in vivo* beitragen und einer anti-tumoralen Immunantwort vorbeugen. Zusammen mit der potentiell anti-apoptotischen Wirkung von IL-21 bieten IL-21 und MIP-3 α daher Ansätze für neue spezifischere Therapien für das Hodgkin Lymphom.

Die myeloid-spezifischen Proteine CSF-1 und CSF1R wurden in dieser Arbeit als weiteres B-Zell-fremdes Cytokin-/Rezeptorsystem in HRS Zellen identifiziert. In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die autokrine Stimulation des CSF1R zu einer höheren Überlebens- und Proliferationsrate in den HRS Zellen führt. Um eine Ursache der CSF1R Expression in HRS Zellen zu finden, wurde die Regulation des *CSF1R* Gens in dieser Arbeit untersucht. Überraschenderweise konnte eine klassische Regulation von *CSF1R*, wie sie in myeloiden Zellen bekannt ist, ausgeschlossen werden. Statt dessen konnte ein nicht-kanonisches Transkript identifiziert werden, das 6.5 kb stromaufwärts

Zusammenfassung

des klassischen Promotors von einer LTR Region initiiert wird. LTR Regionen haben Promotoreigenschaften, sind aber durch verschiedene Mechanismen transkriptionell inaktiviert. Die in dieser Arbeit identifizierte LTR Region der MaLR Familie THE1B wird in Non-Hodgkin Zelllinien von dem epigenetischen Co-Repressor CBFA2T3 an der Initiation der Transkription gehindert. CBFA2T3 ist in den HRS Zellen nicht exprimiert und die Herunterregulation von CBFA2T3 in Non-Hodgkin Zellen führt zur Induktion des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts.

Die außergewöhnliche Regulation des *CSF1R* Gens stellt ein neues Beispiel für die Aktivierung von potentiellen Onkogenen dar. Das nicht-kanonische *CSF1R* Transkript könnte für die Diagnostik bei der Identifizierung von symptomatisch ähnlichen Tumorentitäten genutzt werden.

Widmung

Widmung

Für Andreas

Far away
This ship is taking me far away
Far away from the memories
Of the people who care if I live or die

(Starlight, Muse)

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza-dC	5-Aza-2'-Deoxycytidin	kDa	Kilodalton
µg	Mikrogramm	LPS	Lipopolysaccharid
µl	Mikroliter	LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
µM	Mikromolar	M	Molar
µm	Mikrometer	MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
Abb.	Abbildung	mg	Milligramm
APS	Ammoniumperoxidisulfat	min	Minuten
AS	Aminosäure	MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>	ml	Milliliter
bp	Basenpaare	mM	Millimolar
BSA	Bovines Serumalbumin	MOPS	3-(N-Morpholino)- Propansulfonsäure
BZR	B-Zell-Rezeptor	MPP	Multipotenter Progenitor
CD	Differenzierungscluster	mRNA	<i>Messenger RNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor	ng	Nanogramm
DC	Dendritische Zellen	n.s.	Nicht-spezifisch
DHS	DNase Hypersensibilität	NS	Nicht-signifikant
DMSO	Dimethylsulfoxid	ORF	Offener Leserahmen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
EBV	Epstein-Barr Virus	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	pH	<i>potentia hydrogenii</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)- tetraacetat	PI	Propidiumiodid
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	pTyr	Phospho-Tyrosin
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
FACS	<i>Fluorescence associated cell sorting</i>	rh	Rekombinant human
FCS	Fötales Kälberserum	RNA	Ribonukleinsäure
FIRE	<i>Fms-intronic regulatory Element</i>	rpm	Umdrehungen pro Minute
h	Stunde	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
HDAC	Histon-Deacetylasen	SDS	Sodiumdodecylsulfat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure	STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
HL	Hodgkin Lymphom	T_{Reg}	Regulatorische T-Zellen
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>	TSA	Trichostatin A
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle	TSS	Transkriptionsstartstelle
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen	TZR	T-Zell-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	WB	Western Blot
Ig	Immunglobulin	XSCID	<i>X-linked severe combined Immunodeficiency</i>
IK	Isotypkontrolle		
IKK	IκB Kinase		
IL	Interleukin		
IP	Immunopräzipitation		
Jak	Janus assoziierte Tyrosinkinase		

1 Einleitung

Das menschliche Immunsystem reagiert mit zwei unterschiedlichen Antworten auf die Infektion durch ein Pathogen. Die erste, unspezifische Reaktion ist die angeborene Immunantwort, welche körperfremde Antigene erkennt und Krankheitserreger unspezifisch beseitigt. Die zweite, adaptive bzw. erworbene Immunantwort erfolgt zeitlich verzögert nach dem ersten Kontakt mit einem Antigen und reagiert spezifischer. Sie führt zur Immunität des Wirtes gegen das jeweilige Pathogen [1]. Die verschiedenen Zelltypen des Immunsystems entstehen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) im Knochenmark. HSZ sind für die Bildung aller Zelltypen im Blut des Menschen verantwortlich. Das Immunsystem reagiert in koordinierten Aktionen auf den Befehl von Pathogenen, was eine Kommunikation der einzelnen Zelltypen untereinander erfordert. Die Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen wird durch bestimmte Proteine, den Cytokinen, realisiert. Die funktionelle Charakterisierung von Cytokinen bei der Interaktion von Tumorzellen untereinander und mit ihren umliegenden Stromazellen ist Thema dieser Arbeit. Der Schwerpunkt liegt dabei auf Cytokinen, die in den Ursprungszellen der Tumorart nicht exprimiert werden und im Folgenden als so genannte 'linien-fremde Cytokine' bezeichnet werden. Die Expression von linien-fremden Cytokinen ist eines der charakteristischen Merkmale des klassischen Hodgkin Lymphoms (im Folgenden als Hodgkin Lymphom bezeichnet). Die Funktion dieser linien-fremden Cytokine für die Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms soll hier näher untersucht werden.

1.1 Cytokine

Die Interaktion zwischen den Zellen des hämatopoetischen Systems bei der Immunantwort findet über verschiedene Signalwege statt, die von Cytokinen aktiviert werden [2]. Zu den Cytokinen zählt man die Familien der Interleukine, Interferone, Kolonie-stimulierende Faktoren und der Chemokine. Die einzelnen Cytokine haben pleiotrope Effekte und entfalten ihre Wirkung je nach Zelltyp und Umgebung. Die Funktionen reichen dabei von Proliferation, Differenzierung, Immunglobulinregulation, Aktivierung von Immunreaktionen, Chemoattraktion bis hin zur Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose). Dabei steuern sie nicht nur die Kommunikation zwischen den einzelnen Zelltypen, sondern koordinieren auch zwischen der adaptiven und der angeborenen Immunantwort [3]. Die Cytokine bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette und kommunizieren mit Ihren Zielzellen über membranständige Rezeptoren.

Einleitung

Cytokine und Rezeptoren weisen dabei je nach Familie eigene Strukturmerkmale auf. Für die in dieser Arbeit betrachteten Beispiele (Interleukin-21 (IL-21) und Kolonie-stimulierender Faktor-1 (CSF-1)) werden die jeweiligen Strukturmerkmale im Folgenden näher beschrieben. Des Weiteren werden, so weit in der Literatur bekannt, Regulation, Funktion und Krankheitsrelevanz dieser beiden Rezeptor-Cytokinsysteme erläutert.

1.2 Interleukin-21 und Interleukin-21 Rezeptor

Interleukin-21 (IL-21) ist ein Mitglied der Typ-I Cytokinfamilie, die sich durch eine Struktur mit 4 α -Helizes auszeichnet [4]. Die dazu korrespondierenden Rezeptoren haben die gemeinsame γ -Kette (γ_c) als charakteristisches Merkmal. Eine Mutation in dieser Kette ist Ursache für die humane Krankheit 'X-linked severe combined immune deficiency' (XSCID), bei der das Immunsystem nicht in der Lage ist T-, NK- sowie funktionelle B-Zellen zu generieren [5]. Zu dieser Gruppe zählen IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21, letzteres ist dabei das jüngste Mitglied [6]. IL-21 wurde gemeinsam mit seinem Rezeptor (IL-21R) im Jahr 2000 identifiziert. Die Expression von IL-21 konnte bislang in CD4⁺ T-Zellen, NKT-Zellen und Th17-Zellen gezeigt werden [4].

Die Expression des IL-21R dagegen ist über ein großes Spektrum an hämatopoetischen Zelltypen verbreitet, wie zum Beispiel CD4⁺ T-, CD8⁺ T-, B-, NK- und dendritischen Zellen, Makrophagen und Keratinozyten.

1.2.1 Struktur des Rezeptors und des Liganden

Der IL-21R ist ähnlich dem IL-2R β und liegt auf dem Chromosom 16 direkt stromabwärts des IL-4R α [7]. Zusammen mit dem IL-21R bildet die gemeinsame γ -Kette die funktionelle Bindungsstelle für IL-21 [8,9]. Das typische Merkmal eines Typ-I Cytokinfamilienrezeptors, wie IL-21R oder IL-2R β , ist die extrazelluläre Domäne mit vier konservierten Cysteinresten und einem WSXWS Motiv. Die cytoplasmatische Domäne besteht aus einem Box 1 Motiv und enthält 6 Tyrosinreste [10]. Die mRNA des humanen *IL-21R* Gens ist 3248 bp lang und codiert für 538 Aminosäuren [7].

Das *IL-21* Gen liegt dagegen auf Chromosom 4 und codiert für das reife Protein mit 131 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 15 kDa. Die Aminosäuresequenz besitzt eine signifikante Ähnlichkeit zu IL-2, IL-4 und IL-15 [6]. Die dreidimensionale Struktur von IL-21 zeigt eine vierfach helikale Bündelstruktur, bei der sich ein Teil der Helix C als besonders stabilisierend für die Rezeptorbindung erwiesen hat [11].

Einleitung

1.2.2 Molekulare Grundlagen für den IL-21 Signalweg

Nach der Bindung von IL-21 an den IL-21R findet die Signalkaskade wie bei den anderen Typ-I Cytokinen über den Jak/STAT Signalweg statt. IL-21 aktiviert dabei vorrangig die Familienmitglieder der 'Janus assoziierten Tyrosinkinase' (Jak)1 und Jak3 [7,8,9]. Im weiteren Verlauf kann IL-21 sowohl 'Signal Transducer and Activator of Transcription' (STAT)1 und STAT3 aktivieren sowie STAT5a und STAT5b, wobei die Stimulation von STAT3 nachhaltiger ist (**Abb. 1.1**) [4,12]. Bei der Aktivierung von STAT Proteinen durch IL-21 sind die Tyrosinreste der cytoplasmatischen Domäne des IL-21R entscheidend. Es konnte gezeigt werden, dass Tyr510 phosphoryliert ist und als Bindungsstelle für STAT1 und STAT3 dienen kann [4]. Neben den STAT Proteinen konnte auch eine Aktivierung des MAPK und des PI3K Signalweges durch IL-21 identifiziert werden [10].

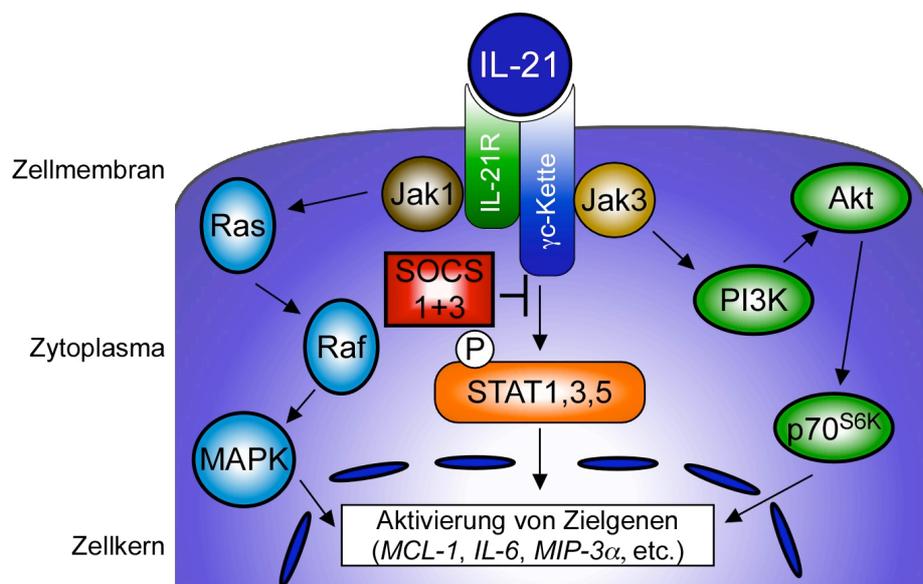


Abbildung 1.1: Schema des IL-21 Signalweges. Nach der Stimulation des IL-21R durch IL-21 kommt es an der intrazellulären Domäne des IL-21R zur Aktivierung von Jak Proteinen. Im weiteren Verlauf können verschiedene STAT Proteine phosphoryliert werden und es kommt zur Aktivierung von Zielgenen im Zellkern (modifiziert nach Leonard, Spolski; JLeukBiol; 2008)

1.2.3 Regulation, Expression und Funktion von IL-21 und IL-21R

Die Expression von IL-21 wird in CD4⁺ T-Zellen über Signale des T-Zell Rezeptors (TZR) induziert. In der IL-21 Promotorregion befinden sich 'Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen' (NFAT) Bindungsstellen, die hauptsächlich für die Transkriptionsinitiation verantwortlich sind [13,14].

Einleitung

In NKT-Zellen wird die Expression von IL-21 vor allem durch mycobakterielle Antigene induziert. Dies zeigt, dass die IL-21 Expression durch Mechanismen der angeborenen Immunabwehr angeregt werden kann [15].

Die Expression von IL-21R ist in den späteren Entwicklungsstadien prominenter als in den Vorläuferstadien der einzelnen Zelltypen. Dies deutet auf Funktionen von IL-21R vor allem in reiferen Zellen hin und weniger bei der Differenzierung von Zellen [16]. *IL-21R* Knock out (KO) Experimente zeigen eine normale Differenzierung der einzelnen Zelltypen des hämatopoetischen Systems. *In vivo* und *in vitro* Experimente demonstrieren eine stimulierende Wirkung von IL-21 auf die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen [17,18].

Die breite Expression von IL-21R in fast allen Zelltypen des hämatopoetischen Systems deutet auf vielfache Wirkungsweisen von IL-21 hin [6,7,15,19,20,21]. In Mausversuchen konnte nach der Überexpression von IL-21 eine erhöhte Anzahl an unreifen Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen identifiziert werden, was auf eine Proliferations-stimulierende Wirkung hindeutet [22]. *In vitro* Experimente zeigen, dass je nach dem kostimulatorischen Kontext auch anti-proliferative Antworten in B-Zellen durch IL-21 induziert werden können. So erfolgt eine Induktion der Proliferation in murinen splenischen B-Zellen nach einer Stimulation mit anti-IgM (imitiert B-Zell Rezeptor (BZR) Stimulation), anti-CD40 (imitiert T-Helferzellen Signale) und IL-21. Werden die gleichen Zellen jedoch mit anti-IgM und IL-4 stimuliert, führt IL-21 zu einem Rückgang der Proliferation [22]. Dieser Effekt konnte im murinen und im humanen System mit der Zugabe von anti-CD40 reduziert werden [22,23]. In Anwesenheit von Signalen wie LPS oder CpG DNA induziert IL-21 sogar die Apoptose von B-Zellen, was im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Typ-I Cytokinfamilie steht [24]. Eine weitere wichtige Wirkung von IL-21 auf B-Zellen ist die Induzierung von Aktivierungs-induzierter Cytidin Deaminase (AID) und Isotypwechsel des BZRs von IgM zu IgG und IgA. Wieder im Zusammenhang mit anti-CD40 und anti-IgM konnte diese Funktion sowohl in humanen als auch in murinen Zellen nachgewiesen werden [25,26]. Die Induzierung von Blimp-1 als ein Regulator der terminalen Differenzierung von B-Zellen durch IL-21 ist eine Erklärung für die Rolle von IL-21 bei der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen [27].

Die Wirkung von IL-21 auf T-, NK-, NKT- und dendritischen Zellen ist ebenso vielfältig und soll hier nur kurz dargestellt werden. Innerhalb der T-Zellen befinden sich mit den CD4⁺ Th1-, Th2- und Th17-Zellen die Untergruppen, die hauptsächlich für die Expression von IL-21 verantwortlich sind [4]. Es konnte gezeigt werden, dass IL-21 in diesen Zellen an der Regulation seiner eigenen Expression beteiligt ist [28]. Eine weitere wichtige

Einleitung

Funktion im Zusammenhang mit CD4⁺ T-Zellen ist die bevorzugte Differenzierung in Richtung Th17-Zellen gegenüber der Entwicklung zu regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) durch IL-21 [28]. In CD8⁺ Zellen führt IL-21 zusammen mit IL-7 oder IL-15 zu einer stärkeren Proliferation und steigert die Expression von Cytokinen, die zur Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen führen (z.B. Granzyme B) [29].

NK-Zellen dagegen sind generell abhängig von Signalen der γ_c -Rezeptorkette. In γ_c KO Mäusen findet man keine reifen NK-Zellen, während IL-21R KO Mäuse eine normale Anzahl an NK-Zellen aufweisen [18]. Dennoch konnten auch hier, abhängig vom Entwicklungsstadium der NK-Zellen, proliferative Wirkungen von IL-21 nachgewiesen werden. Diese treten in frühen Entwicklungsstadien und im Zusammenhang mit IL-15 oder IL-2 auf [30]. Diese Funktion übt IL-21 auch bei den NKT-Zellen aus [31]. Da NKT-Zellen, die dem angeborenen Immunsystems zugeordnet werden, nach Stimulation mit mikrobiellen Antigenen auch eine große Menge IL-21 produzieren, wird darüber spekuliert, ob sie als Ausgangspunkt der Formation einer adaptiven Immunantwort von B- und T-Zellen stehen [4].

Im Gegensatz zu der stimulierenden Wirkung auf lymphoide Zellen steht die überwiegend inhibitorische Wirkung auf myeloide dendritische Zellen. Unter IL-21 Einfluss wird die Reifung von myeloiden dendritischen Zellen blockiert, wodurch eine verminderte Antigenpräsentation und eine Inhibition der T-Zell Aktivierung entsteht [15].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IL-21 pleiotrope Funktionen hat, die in Abhängigkeit der Ko-Stimulatoren und des Entwicklungsstadiums der jeweiligen Zellen stehen.

1.2.4 Die Rolle von IL-21 bei Tumoren und Autoimmunkrankheiten

In diesem Abschnitt soll auf die Funktion bzw. therapeutische Bedeutung von IL-21 bei verschiedenen Krankheitsbildern des Immunsystems eingegangen werden. Die pleiotropen Auswirkungen von IL-21 auf Zellen des Immunsystems sind dabei auch bei der Behandlung von verschiedenen Tumorentitäten und Autoimmunkrankheiten zu berücksichtigen.

Untersuchungen in verschiedenen Mausmodellen konnten die unterstützende Wirkung von IL-21 bei der Bekämpfung von Tumorzellen des Melanoms, Fibrosarkoms und Darmkrebses durch NK- und CD8⁺ T-Zellen nachweisen. Daher kam es in klinischen Studien zur Anwendung von IL-21 bei inoperablen metastasierenden Melanomen und es zeigten sich erste Anzeichen einer anti-tumoralen Wirkung [32]. Dabei hat IL-21 einige

Einleitung

Vorteile gegenüber anderen γ_c Cytokinen wie IL-2, da es auch in höheren Dosen kaum unerwünschte Nebenwirkungen zeigt. Im Jahr 2009 wurde die zweite Stufe der Studie an humanen Melanomen abgeschlossen. Ein kompletter Rückgang des Melanoms bei einem Patienten und ein eingeschränktes Wachstum bei einem Teil der anderen 23 Patienten sowie Verträglichkeit ohne Nebenwirkungen bestätigten die Ergebnisse der ersten Studie [33]. Insgesamt war der durchschnittliche Tumorrückgang von 8,3 % jedoch niedrig. Positive Effekte von IL-21, die sich auf die Unterstützung von anti-tumoralen Antworten durch NK- und CD8⁺ T-Zellen zurückführen lassen, konnten zusammen mit IFN- α auch in Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden [34]. Eine Aktivierung von STAT1 durch rekombinantes (r)IL-21 führt in den Tumorzellen des Mantel Zell Lymphoms direkt zur Induktion von Apoptose [35].

Die pleiotropen Effekte von IL-21 können in anderen malignen Erkrankungen aber auch unerwünschte Ergebnisse hervorrufen. Im multiplen Myelom kommt es durch IL-21 zu einem Wachstum der Tumorzellen durch die Aktivierung von diversen Signalwegen [36,37,38,39]. Daher ist es wichtig, die Wirkungen von IL-21 bei jeder malignen Erkrankung individuell zu analysieren.

In Autoimmunkrankheiten begünstigt IL-21 eher den Krankheitsverlauf. In verschiedenen Mausmodellen konnte ein Anstieg der IL-21 und der Immunglobulin Konzentrationen im Serum mit Fortschreiten der Krankheit gemessen werden. Das erhöhte Immunglobulin Niveau kann auf die Funktion von IL-21 bei der Stimulierung der Differenzierung von Immunglobulin produzierenden Plasmazellen zurückgeführt werden [22,40]. Durch die IL-21 Inhibition mit IL-21R:Fc Konstrukten bei Autoimmunkrankheiten in Mausmodellen konnte ein Rückgang der Symptome beobachtet werden [41,42].

Sowohl in malignen Krankheiten als auch bei Autoimmunkrankheiten kann IL-21, je nach Art der Erkrankung, zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden oder muss für eine Verbesserung der Prognose inhibiert werden. Um die Entscheidung für einen der beiden Wege zu treffen, muss die Funktion von IL-21 bei jedem Krankheitsbild genau charakterisiert werden.

1.3 Kolonie-stimulierender Faktor und Kolonie-stimulierender Faktor Rezeptor

Das Cytokin 'Kolonie-stimulierender Faktor' (CSF-1 oder auch MCSF) ist für das Wachstum und Überleben sowie die Differenzierung und Funktion von mononukleären Phagozyten (Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten und den jeweiligen Vorläuferzellen)

Einleitung

zuständig. Der korrespondierende Rezeptor (CSF1R oder auch MCSFR) wird durch das Gen *c-fms* (im Folgenden *CSF1R*) kodiert und ist einer der frühen Differenzierungsmarker für die mononukleären Phagozyten [43,44]. Defekte in der Regulation der Expression von CSF1R oder CSF-1 können zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Bei der rheumatoiden Arthritis im Menschen kommt es durch einen erhöhten CSF-1 Level zum Beispiel zu einer höheren Überlebensrate von inflammatorischen Makrophagen oder Granulozyten. Bei der Arthritis, Nephritis, Lungenfibrose und Arteriosklerose führt die Blockade des CSF-1 Signalweges zu einem Rückgang der Symptome in Patienten [43]. In einigen Tumorentitäten wird in der Literatur für CSF-1 und CSF1R eine onkogene Rolle diskutiert [44]. Besonders beim Mammakarzinom ist die Förderung der Metastasierung durch CSF-1 bereits gezeigt worden [45]. Die Literaturdaten zur physiologischen Funktion von CSF-1 und CSF1R in verschiedenen Zelltypen sowie die bisher bekannte Regulation, besonders des *CSF1R* Gens, sollen in den folgenden Abschnitten behandelt werden.

1.3.1 Struktur des CSF-1 Cytokins

CSF-1 wird von Fibroblasten, Endothelialzellen, Stromazellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Osteoblasten exprimiert [43].

Das Gen des Cytokins CSF-1 ist auf dem langen Arm des Chromosoms 5 lokalisiert (5q33.1). Die mRNA existiert in drei verschiedenen Spleißvarianten und codiert für drei verschiedene Isoformen des Proteins CSF-1, die sich in ihrer Glykolisierung und Länge unterscheiden. Zwei dieser Isoformen werden sezerniert und zirkulieren im ganzen Körper, während die membrangebundene Isoform von CSF-1 an der lokalen Regulation von Zielzellfunktionen beteiligt ist [46]. In allen drei Isoformen sind die biologisch aktiven 150 N-terminalen Aminosäuren enthalten. Sie bilden vier α -Helices gebündelt mit β -Faltblattstrukturen. In der aktiven Form bilden zwei dieser Bündel über Disulfidbrücken Dimere und binden dann an den CSF1R [47]. Experimente in Mäusen, die jeweils exklusiv nur eine der drei Isoformen exprimieren, haben gezeigt, dass diese sich in ihrer Funktion überlappen, aber alleine nicht alle Defekte einer CSF-1 defizienten Maus beheben können [46,48]. Über die Regulation der verschiedenen Spleißvarianten ist wenig bekannt. In den CSF-1 exprimierenden Zellen kann die mRNA von allen drei Formen identifiziert werden [49].

Einleitung

1.3.2 Funktionen von CSF-1

Die wichtigsten Funktionen von CSF-1 im Zusammenhang mit Monozyten und Makrophagen sind die Verstärkung von Cytotoxizität, Superoxidproduktion, Phagozytose, Chemotaxis und Cytokinproduktion [50]. CSF-1 ist damit ein wichtiger Faktor bei der angeborenen Immunantwort. Nach Ko-Stimulation mit LPS und CSF-1 erfolgt eine Aktivierung der Cytokinproduktion in Monozyten, die zur Bekämpfung der bakteriellen Infektion und zur Stimulation einer Th2 Antwort führt. Eine wichtige Eigenschaft von Makrophagen ist die Mobilität. CSF-1 Stimulation bei inaktiven Makrophagen führt zur schnellen morphologischen Veränderung durch Umlagerungen von Aktinfilamenten des Cytoskeletts und Chemotaxis in Richtung der CSF-1 Quelle. Auch die Adhäsionsfähigkeit von Makrophagen wird durch die CSF-1 Stimulation erhöht [51].

In der frühen Phase der Entwicklung von myeloiden Zellen ist CSF-1 allein nicht in der Lage die Proliferation und Differenzierung von multipotenten Vorläuferzellen zu regulieren. CSF-1 koordiniert diese Aufgabe jedoch synergistisch mit anderen Wachstumsfaktoren. Im Zusammenhang mit Stammzellofaktor (SCF) und IL-3 differenzieren multipotente Vorläuferzellen zu mononukleären, phagozytischen Vorläuferzellen, die dann durch Stimulation von CSF-1 allein zu funktionellen Makrophagen ausdifferenzieren [52,53]. Wirkt CSF-1 dagegen zusammen mit dem Rezeptor Aktivator des NF- κ B Liganden (RANKL), so differenzieren mononukleäre Phagozyten zu mehrkernigen Osteoklasten [54].

Korrespondierend zu den Daten der Stimulation mit CSF-1 sind die Defekte der CSF-1 defizienten Maus, die eine inaktivierende Mutation des *Csf-1* Gens trägt. Die Anzahl an Makrophagen in diesen Mäusen ist signifikant reduziert, einige Populationen wie zum Beispiel die Osteoklasten fehlen gänzlich. Die Folge sind Osteopetrose, Skelettabnormalitäten sowie Zahn- und Nervensystementwicklungsstörungen [55].

1.3.3 Struktur des CSF1R

Das Cytokin CSF-1 stabilisiert die nicht-kovalent verbundenen Dimere des CSF-1 Rezeptors (CSF1R) und es aktiviert dessen Kinasedomäne. Das Gen *CSF1R* ist auf Chromosom 5 (5q33.3) lokalisiert [56]. Die Transkription kann gewebeabhängig von zwei verschiedenen Promotoren erfolgen. In Trophoblasten der Plazenta existiert eine *CSF1R* mRNA, die ihren Ursprung ungefähr 26 kb stromaufwärts des Translationsstartes hat [57]. In Monozyten erfolgt der Transkriptionsstart dagegen von einem Promotor, welcher etwa 132 bp vor dem Transkriptionsstart liegt und einem Enhancer Element, das im

Einleitung

ersten Intron des *CSF1R* Gens lokalisiert ist. Die Struktur des Promotors und des Enhancers sowie die Regulation der Transkription von *CSF1R* werden in dieser Arbeit in einem eigenen Abschnitt ausführlich behandelt, da die Ursache für die Expression von *CSF1R* im Hodgkin Lymphom bisher ungeklärt ist und einen Schwerpunkt in dieser Arbeit einnimmt.

Die mRNA des *CSF1R* Gens setzt sich aus 4006 bp zusammen und codiert das transmembrane Glykoprotein CSF1R. Das Protein CSF1R besteht aus einem 512 Aminosäuren langen N-terminalen extrazellulären Segment, welches die Cytokinbindungsstellen enthält, einer 25 Aminosäuren langen Transmembranregion und einer 435 Aminosäuren langen intrazellulären Tyrosinkinasedomäne [58]. Das extrazelluläre Segment enthält mehrere Schleifen, die durch Disulfidbrücken verbunden und den Immunglobulinen Superfamilien ähnlich sind. Diese Domäne ist im reifen Protein stark glykolisiert und macht alleine 45 kDa des 150 kDa großen CSF1R Proteins aus [59]. Die intrazelluläre Region enthält neben der Tyrosinkinase die ATP Bindungsstelle rund um das Lysin 614 sowie sieben Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können und unterschiedliche Signalwege aktivieren [60]. Die Tyrosinkinasedomäne ist durch ein Zwischenstück in zwei Teile, den ATP bindenden und den Tyrosinkinase enthaltenden, unterteilt [61]. Die Bindung von CSF-1 führt nach einer ersten Kinaseaktivierung und Autophosphorylierung von Tyrosinresten zu einer kovalenten Dimerbildung von CSF1R Monomeren durch Disulfidbrücken. Anschließend, nach einer weiteren Tyrosinphosphorylierung und Ubiquitinierung, wird der Cytokin-Rezeptor-Komplex internalisiert und lysosomal degradiert [49]. Die dabei aktivierten Signalwege werden im nächsten Abschnitt kurz charakterisiert.

1.3.4 Signalwege des CSF1R

Experimente in verschiedenen zellulären Systemen haben gezeigt, dass geringe Konzentrationen des CSF-1 Cytokins genügen, um das Überleben von Makrophagen zu sichern, jedoch noch keine Proliferation induzieren. Es konnte demonstriert werden, dass die Stimulation des Rezeptors unterschiedliche Konsequenzen haben kann und unterschiedliche Signalwege stimuliert werden. Der PI3K Signalweg ist an dem Überleben, jedoch nicht an der Proliferation von Makrophagen und Osteoklasten beteiligt [62,63]. PI3K wird durch zwei verschiedene Wege aktiviert, zum einen direkt durch Bindung an die Tyrosinkinasedomäne von CSF1R, zum anderen indirekt durch eine Src Familien Kinase (SFK) [64].

Einleitung

In Bezug auf die Proliferation ist bisher wenig über die genauen Signalwege bekannt. Studien in CSF1R defizienten Mäusen, in denen die Rezeptorfunktion mit mutierten Tyrosinresten in der cytoplasmatischen Domäne wieder hergestellt werden, zeigten, dass besonders die Tyrosinreste 559 und 807 für diese Funktion zuständig sind [65]. Mutationsstudien haben gezeigt, dass das Adaptorprotein DAP12 und die daraus resultierende Aktivierung von β -Catenin eine wichtige Rolle bei der CSF-1 induzierten Proliferation von Makrophagen spielen [66].

Die Differenzierung wird ebenfalls durch SFK induziert, welches Pyk2 und damit verbundenes Paxilin phosphoryliert. Aus Fibroblasten ist bekannt, dass aktiviertes Paxilin zur Adhäsion und Mobilität beiträgt. SFK und Pyk2 sind beide mit dem aktivierten CSF1R assoziiert [67,68]. CSF1R assoziierte Untereinheiten (p110 β und p110 δ) der PI3K sind an der Umlagerung von Aktinfilamenten des Cytoskelettes und damit an der Migration von Fibroblasten beteiligt.

Der CSF1R nutzt für seine Hauptfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Mobilität vor allem den PI3K und den Src/Pyk2 Signalweg, die genaue Regulation und Beteiligung anderer Signalwege soll hier nicht weiter diskutiert werden, da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit sind. Die Regulation des *CSF1R* Gens während der Entwicklung und Differenzierung von mononukleären Phagozyten ist in einigen Studien bereits beschrieben. Die Mechanismen der aberranten Regulation der *CSF1R* Expression im Hodgkin Lymphom sind jedoch noch unbekannt und sollen in dieser Arbeit identifiziert werden und daher wird in folgendem Abschnitt ausführlich auf die bisher bekannten Literaturdaten eingegangen.

1.3.5 Regulation des *CSF1R* Gens

Eine defekte Regulation des CSF1R konnte bereits in einigen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Eine verminderte oder fehlende Expression von CSF1R ist in der akuten myeloiden Leukämie beobachtet und mit Mausmodellen bestätigt worden [69]. Eine aberrante Expression von CSF1R wurde in soliden Tumoren, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, gefunden [70]. Die Regulation von *CSF1R* ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Dabei wurden nicht nur ausdifferenzierte Zellen analysiert, sondern die Regulation von CSF1R während der gesamten Hämatopoese betrachtet.

Die spezifische Genexpression in einem bestimmten Entwicklungsstadium einer Zelle wird durch ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren ermöglicht. Dabei ist es wichtig, dass Gene, die in einem bestimmten Zelltyp vorkommen (im Folgenden 'linien-spezifische Gene'),

Einleitung

exprimiert werden, während Gene, die charakteristisch für andere Zelltypen sind (im Folgenden 'linien-fremde Gene'), reprimiert werden. Es hat sich gezeigt, dass bei der Regulation von Genen neben den Transkriptionsfaktoren auch Chromatinmodifikationen beteiligt sind. Durch epigenetische Veränderungen wird ein bestimmter Chromatinbereich entweder zugänglicher für Transkriptionsfaktoren oder unzugänglich für die Transkriptionsinitiation gemacht [71].

Die Induktion und Steuerung dieser Vorgänge bei der Differenzierung der einzelnen Zelltypen des hämatopoetischen Systems ist in der Literatur kontrovers diskutiert und wird am Beispiel der B-Zell-Entwicklung im nächsten Kapitel dieser Arbeit behandelt. Der Verlauf der epigenetischen Modifikationen an regulatorischen Elementen des *CSF1R* Gens während der Hämatopoese konnte in den letzten Jahren durch drei verschiedene experimentelle Ansätze näher charakterisiert werden: i) Identifizierung von homologen, potentiell regulatorischen Sequenzen zwischen verschiedenen Spezies, ii) Analyse von DNaseI hypersensitiven (DHS) Chromatinbereichen, um funktionelle Elemente (Promotor, Enhancer, etc.) zu charakterisieren und iii) Untersuchung dieser funktionellen Elemente in transgenen Mäusen [71].

Es zeigte sich, dass die Regulation des *CSF1R* Gens über zwei verschiedene Elemente verläuft. Dies sind zum einen der Promotor, zum anderen ein Enhancer, der im ersten Intron des Gens lokalisiert ist. Der Promotor besitzt keine klassische TATA Box. Als Ersatz für das Transkriptionsstart markierende TATA-bindungs Protein TBP dient bei Makrophagengen das EWS/FUS/TLS Protein. TBP kann aber zusätzlich im Initiationskomplex identifiziert werden [72,73]. Die Transkriptionsfaktorfamilie 'Ets' ist an der Expression des *CSF1R* Gens beteiligt. Ein entscheidender Faktor für die linien-spezifische Promotoraktivität in Monozyten/Makrophagen ist das Ets Familienmitglied PU.1, welches mehrere Bindungsstellen stromaufwärts der Transkriptionsinitiation hat [74]. Der nächste hoch konservierte Bereich stromaufwärts ist die so genannte RUNX/CEBP Bindungsstelle. Sie ist an der vollständigen Aktivierung des Promotors beteiligt und enthält Bindungsstellen für RUNX1 und C/EBP- α [75].

Der 300 bp *CSF1R* Promotor allein aktiviert in Makrophagen das *CSF1R* Gen, allerdings kann mit einer Sequenz, die einen größeren Chromatinbereich stromabwärts des *CSF1R* Promotors abdeckt, diese Aktivierung noch gesteigert werden. Die konservierten Regionen, in diesen stromabwärts des klassischen Promotors liegenden Bereichen, zeigten im ersten Intron ein weiteres 300 bp großes Segment mit regulatorischen Eigenschaften [76]. In Makrophagen konnte eine spezifische DHS identifiziert werden. Das ganze Segment wurde als 'Fms-intronisches regulatorisches Element' (FIRE) bezeichnet. Als Transkriptionsfaktoren an dem FIRE Element wurden bisher PU.1, Sp1

Einleitung

und EGR2 identifiziert [73]. Ein weiterer Aspekt ist die Detektion von antisense RNA Produkten, die vom FIRE Element stammen und auf eine antisense Regulation der *CSF1R* Expression hindeuten [77].

Während der Hämatopoese wird die Regulation des *CSF1R* Transkripts über die Regulation des Chromatinstatus der regulatorischen Elemente Promotor und FIRE realisiert. In hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) und myeloiden Vorläuferzellen können bereits geringe Mengen an *CSF1R* mRNA Transkript identifiziert werden. Hier ist der Promotor des *CSF1R* Gens bereits vollständig mit Transkriptionsfaktoren besetzt. Kommt es zur Differenzierung in Richtung Makrophagen, öffnet sich auch die FIRE Region und eine vollständige Aktivierung der beiden regulatorischen Elemente führt zur *CSF1R* Expression [78].

Im Laufe der lymphoiden Entwicklung hingegen wird das *CSF1R* Gen inaktiviert. Die gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle exprimiert noch *CSF1R* mRNA während differenziertere Stadien der Lymphozyten dieses Gen abgeschaltet haben. Dies geschieht bei B- und T-Zellen mit unterschiedlichen Mechanismen. In T-Zellen findet eine vollständige Inaktivierung durch epigenetische Veränderung der regulatorischen Elemente statt. Promotor und FIRE Element enthalten maximale DNA und Histon 3 Lysin 9 (H3K9) Methylierungen [71]. In B-Zellen sind diese epigenetischen Modulationen auf einem geringeren Niveau und für Transkriptionsfaktoren zugängliches Chromatin kann noch identifiziert werden. In Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass trotz der Expression des PU.1 Proteins in B-Zellen [79] die Expression von *CSF1R* mRNA durch PAX5 reprimiert wird [80]. Zusätzlich kann auch ein erhöhter Level des FIRE getriebenen antisense Produktes identifiziert werden. Ein Schema der epigenetischen Modulationen während der Hämatopoese ist in **Abb. 1.2** gezeigt.

Einleitung

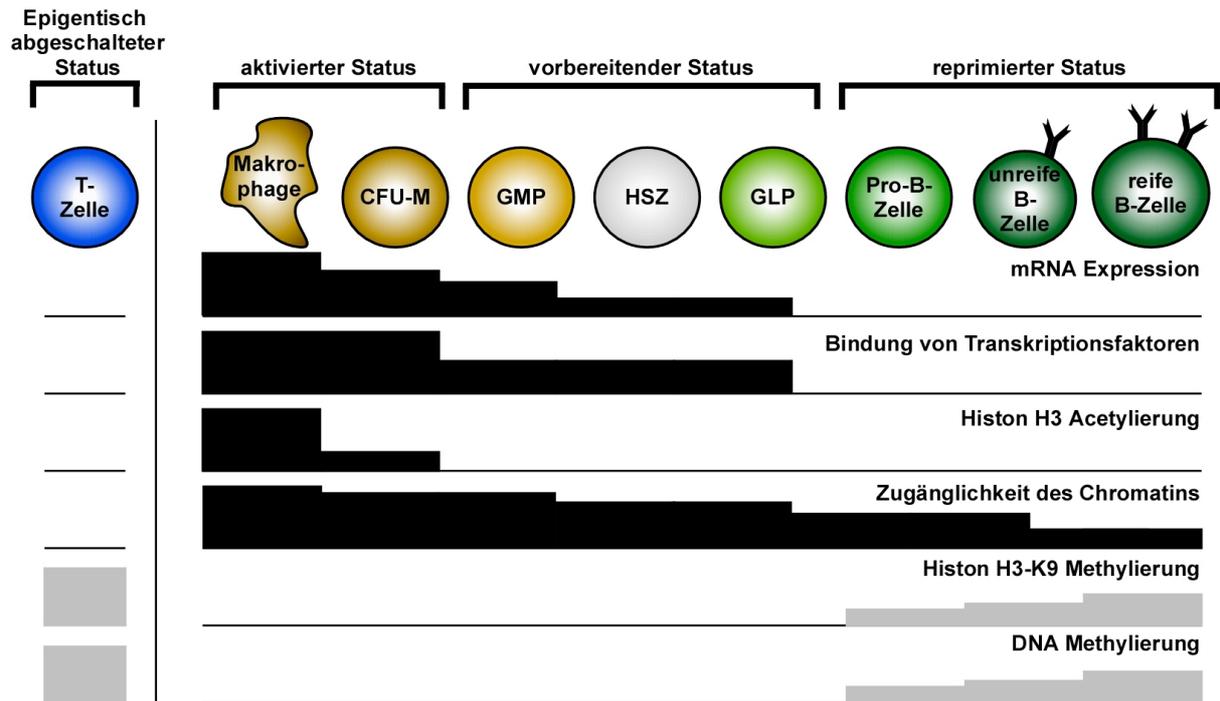


Abbildung 1.2: DNA- und Chromatinmodifizierungen am klassischen *CSF1R* Promotor während der Hämatopoese. Bei der Differenzierung von B-Zellen wird die Stilllegung der *CSF1R* Expression unter anderem durch PAX5 reguliert. Im Vergleich dazu sind die *CSF1R* exprimierenden Makrophagen und die nicht exprimierenden T-Zellen bzw. Fibroblasten, in denen *CSF1R* komplett epigenetisch abgeschaltet ist, dargestellt (modifiziert nach Bonifer et.al, FrontBiosc, 2008). CFU-M – Differenzierte Makrophagen Vorläuferzelle; GMP – Gemeinsamer myeloider Progenitor; GLP – Gemeinsamer lymphoider Progenitor

Zusammenfassend sind an der Regulation der *CSF1R* Expression in der Hämatopoese sowohl Transkriptionsfaktoren, als auch epigenetische Modulationen des Chromatinbereiches der regulatorischen Elemente Promotor und FIRE beteiligt.

In dieser Arbeit sollen die Ursachen und Wirkung der aberranten Cytokinexpression am Beispiel des Hodgkin Lymphoms behandelt werden. Die malignen Tumorzellen dieser Lymphomentität haben ihren Ursprung im B-Zell Kompartiment des Hämatopoetischen Systems. Da die Differenzierungsstufe der einzelnen Zelltypen sowohl bei der Pathogenese des Lymphoms als auch bei der Wirkung von Cytokinen auf die jeweiligen Zellen eine Rolle spielt, wird die B-Zell-Entwicklung hier kurz dargestellt.

1.4 Die B-Zelle

Als Teil des adaptiven Immunsystems sind die Hauptfunktionen der B-Zelle die Expression und Sekretion von Antikörpern (Immunglobulinen), die bei einer mikrobiellen

Einleitung

Infektion Antigene markieren und mit verschiedenen Effektorfunktionen bekämpfen. Die Evolution der B-Lymphozyten begann bereits vor 500 Millionen Jahren mit der Entstehung der Wirbeltiere [81].

1.4.1 Die Entwicklung der B-Zelle

Die B-Zell-Entwicklung hat ihren Ausgangspunkt, wie die meisten hämatopoetischen Zelltypen, im Knochenmark. Auch die frühen Phasen der Entwicklung finden während der gesamten Lebensspanne eines Individuums dort statt [82]. Die gemeinsame Ursprungszelle der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark ist die hämatopoetische Stammzelle (HSZ). Die HSZ hat sowohl die Fähigkeit sich selbst zu replizieren als auch differenzierte Vorläuferzellen der verschiedenen Zelltypen zu bilden. Die Differenzierungsstufen der HSZ konnten in den letzten Jahren immer genauer definiert werden. Dabei kommt es durch einen noch nicht genau geklärten Mechanismus der asymmetrischen Teilung zunächst zu den Langzeit- (LT-) HSZs und dann zu Kurzzeit- (ST-) HSZs, die weiter zu multipotenten Progenitorzellen (MPP) differenzieren [83]. Durch die Differenzierung in mehrere pluripotente Vorläuferzellen, bei der die Fähigkeit der Zellen zur Selbsterneuerung abnimmt, wird die häufige Teilung der HSZ bei hohem Zellbedarf vermieden. Die weitere Differenzierung der Zellen in die verschiedenen Zelltypen ist in der Literatur kontrovers diskutiert. Zunächst ging man davon aus, dass nach dem Stadium der MPP eine erste funktionelle Aufspaltung der Differenzierung stattfindet. Die B- und T-Zellen entstehen aus einer gemeinsamen lymphoiden Progenitorzelle (GLP), die Zellen der myeloiden Reihe (Makrophagen, Granulozyten, usw.) aus der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle (GMP) und die Megakaryozyten und Erythrozyten haben ebenfalls eine gemeinsame Vorstufe (MEP) [83]. In neuen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass Vorläuferzellen eine viel höhere Plastizität aufweisen, als in älteren Modellen angenommen. So können aus ursprünglich lymphoiden Progenitoren auch noch myeloide Zellen entstehen und selbst weiter differenzierte T-Zell Vorläuferzellen konnten noch in B-, NK- und myeloide Zellen reprogrammiert werden [84]. Die Erstellung eines Modells der Hämatopoese als unidirektionale Differenzierung von einzelnen Zelltypen aus den jeweils eigenen Vorläuferzellen ist daher als zu vereinfacht anzusehen. Vielmehr kann die Entwicklung eines differenzierten, reifen Zelltyps im hämatopoetischen System aus einer Vielzahl verschiedener Vorläuferzellen entstehen. Ob die Entscheidung in eine Richtung der Differenzierung intrinsisch über Transkriptionsfaktornetzwerke initiiert oder über Signale von den jeweiligen Cytokinen aus dem Umfeld der Zellen induziert wird, ist ebenfalls Gegenstand kontroverser Diskussionen in der Literatur [85]. Die Transkriptionsfaktoren sind auf jeden Fall

Einleitung

entscheidend für das jeweilige Genexpressionsprogramm der Zellen. Es ist jedoch unklar, ob Cytokine nur für die Expansion der differenzierenden Zellen nötig sind oder auch zusätzlich entscheidende Signale für die Initiation der Differenzierung bereitstellen [85].

Die weitere Differenzierung der B-Zellen im Knochenmark vollzieht sich über Zwischenstufen. So hat man im humanen System diese Stufen in frühe B-, Pro-B-, Prä-B1-, große Prä-B2-, kleine Prä-B2- und unreife B-Lymphozyten-Stadien eingeteilt [86]. Das wichtigste Ereignis dabei ist die Bildung eines antigenspezifischen B-Zell-Rezeptors (BZR), der essentiell für das Überleben und die spätere Funktion der Antikörperproduktion durch die B-Zelle ist [87]. Die Vielzahl von möglichen Antikörpervariationen wird durch den Mechanismus der Genumlagerung der B-Zell-Rezeptorgene erreicht und durch die Rekombinationsaktivierten Gen- (RAG) Proteine durchgeführt wird [88,89,90].

Bei der Steuerung der Differenzierungsstufen sind sowohl Transkriptionsfaktoren als auch Cytokine beteiligt [82]. Bereits die Selbsterneuerungsfähigkeit der HSZ wird in Stammzellnischen durch eine bestimmte Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und der Zusammensetzung des Cytokinumfeldes erhalten. Die Cytokinzusammensetzung wird von den so genannten Stromazellen gesteuert, die im direkten Umfeld der HSZ liegen. Im Knochenmark sind dies zum Beispiel Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelialzellen und retikuläre Zellen. Die Wanderung von Vorläuferzellen zu den Organen ihrer weiteren Entwicklung wird von Chemokinen gesteuert [83].

Die B-Zellen, die im Knochenmark heranreifen, werden auch als naive B-Zellen bezeichnet, da sie noch keinem Antigen begegnet und daher nicht vollständig ausdifferenziert sind. Sie wandern in Blut- und Lymphgefäßen durch den Körper. Dies ändert sich nach dem T-Zell-unterstützten Antigenkontakt. Es kommt zur Bildung von Keimzentren in den peripheren lymphoiden Organen (Milz, Lymphknoten, Peyer's Patches, Tonsillen) [91]. Durch Hochregulierung von Chemokinrezeptoren migrieren die B-Zellen zunächst durch die T-Zell-Zone und es kommt zur Interaktion mit T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (z.B. dendritischen Zellen), die zu einer vollen Aktivierung der B-Zellen führt [91]. Anschließend formiert sich das Keimzentrum in dem aktivierte B-Zellen extensiv proliferieren und sich eine dunkle Zone bildet. Die hier liegenden B-Zellen werden Zentroblasten genannt, die während ihrer Proliferation ihren Antigenrezeptor durch den Prozess der somatischen Hypermutation modifizieren. In der hellen Zone findet dann keine Proliferation mehr statt. Die hier befindlichen B-Zellen werden Zentrozyten genannt und auf verbesserte Bindungsfähigkeit hinsichtlich ihres BZRs durch die somatische Hypermutation getestet. Im Gegensatz zu der dunklen Zone, in der sich ausschließlich B-Zellen aufhalten, sind in der hellen Zone auch wieder T-Zellen und

Einleitung

antigenpräsentierende, folliculäre, dendritische Zellen zu finden [91]. Auch innerhalb des Keimzentrums findet die Migration entlang von Chemokingradienten statt [92]. Eine unidirektionale Bewegung von der dunklen in die helle Zone ist jedoch nur schematisch – in aktuellen *in vivo* Studien hat sich gezeigt, dass B-Zellen auch wieder den umgekehrten Weg einschlagen können [93,94,95,96].

Eine wichtige Eigenschaft der Zentroblasten B-Zellen ist, dass sie ohne exogene Überlebensfaktoren sehr schnell dem programmierten Zelltod (Apoptose) zugänglich sind, da ihnen anti-apoptotische Signale wie B-Zell Lymphoma 2 (BCL-2) fehlen und viele pro-apoptotische Faktoren exprimiert werden (FAS, C-MYC, P53 und BAX) [97,98,99]. Dadurch können die Keimzentrums B-Zellen, die durch die somatische Hypermutation einen nicht-bindenden oder nicht-funktionellen BZR generiert haben, schnell eliminiert werden [91].

Ein weiterer Schritt der B-Zell-Entwicklung im Keimzentrum ist der Isotypwechsel. Der Isotypwechsel ist eine irreversible somatische Rekombination der konstanten Bereiche der Antikörper, wodurch unterschiedliche Effektorfunktionen entstehen [100]. Bei der Induktion des Isotypwechsels spielen Cytokine, wie zum Beispiel IL-21, eine große Rolle. Der Isotypwechsel findet sowohl in Zentrozyten, als auch in Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen statt, so dass dieser Prozess keiner Differenzierungsstufe vorbehalten bleibt. Er ist jedoch zeitlich und räumlich von der somatischen Hypermutation getrennt [91].

Die terminale Differenzierung von aktivierten B-Zellen führt entweder zu der Bildung von Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen, es ist jedoch unklar, wie diese Entscheidung induziert wird [91]. Die Plasmazellen verlassen das Keimzentrum dann als Antikörper sezernierende B-Zellen, die die akute Infektion mit ihrem spezifischen Antigen bekämpfen. Die Gedächtnis-B-Zellen patrouillieren als langlebige B-Zellen durch Lymph- und Blutgefäße und führen bei sekundärem Kontakt mit dem Antigen zu einer schnelleren adaptiven Immunantwort. Eine schematische Abbildung der B-Zell-Entwicklung im Keimzentrum des Lymphknotens ist in Kapitel 1.5.2. in **Abb. 1.3** dargestellt.

In dem folgenden Abschnitt soll nun genauer auf die Transkriptionsfaktoren eingegangen werden, die an der Differenzierung der B-Zellen beteiligt sind.

1.4.2 Transkriptionsfaktoren in B-Zellen

Cytokine steuern die Differenzierung der verschiedenen Zellen in dem sie an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Diese Interaktion induziert Signalkaskaden, die

Einleitung

in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma und der Initiation oder Repression der Translation von Zielgenen im Zellkern enden. Transkriptionsfaktoren regulieren auch die Genexpression der jeweiligen Zelltypen und deren Differenzierungsstufen. Dabei induzieren sie wiederum auch Cytokinrezeptoren der jeweiligen Zelltypen und sind ebenfalls wichtig für die Steuerung und Aufrechterhaltung der Differenzierung. Der erste Differenzierungsschritt nach der HSZ ist die Abspaltung der myeloiden Zellen. Die lymphoiden Vorläufer exprimieren dabei IL-7R, während die myeloiden Progenitoren IL-7R⁻ bleiben [101]. Durch ektope Überexpression von Cytokinrezeptoren eines bestimmten Zelltyps können Vorläuferzellen eines anderen Zelltyps noch reprogrammiert werden [102]. Dies verdeutlicht die entscheidende Rolle von Cytokinen in der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen. Für die Expression der IL-7R α Kette ist die Menge des Transkriptionsfaktors PU.1 in der Zelle wichtig. In geringen Mengen induziert er die Expression von IL-7R α und leitet die Zelle in Richtung des lymphoiden Progenitors, während PU.1 bei hohen Expressionsniveaus myeloide Vorläufer erzeugt [103].

Für die weitere B-Zell-Entwicklung im Knochenmark gibt es eine hierarchische Anordnung von essentiellen Transkriptionsfaktoren. Zunächst aktiviert das 'Basic helix-loop-helix' (bHLH) Protein E2A den 'frühen B-Zell Faktor' (EBF). Beide zusammen sind entscheidend für die Expression von frühen B-Zell-spezifischen Genen wie *RAG1* und *RAG2*, *Ig α (mb-1)* und *Ig β* [104,105]. Zelltyp-spezifische Transkriptionsfaktoren fördern nicht nur die Expression ihrer eigenen Linie, sondern können auch repressorische Funktionen auf Transkriptionsfaktoren anderer Zelltypen ausüben, um die Differenzierung aufrecht zu erhalten. Der T-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor Notch1 führt zur Expression von Hes1, einem bHLH Protein, welches Heterodimere mit E2A bilden kann und dessen Funktion inhibiert [106]. Für die NK-Zell-Differenzierung ist das HLH Protein ID2 verantwortlich, welches alle anderen lymphoiden Differenzierungen durch Bildung von Heterodimeren mit den jeweiligen Transkriptionsfaktoren (z.B. E2A) blockt [107].

Ein weiterer notwendiger Faktor für die B-Zell-Entwicklung ist PAX5 [108]. PAX5 ist in der Lage, B-Zell-spezifische Gene hoch zu regulieren (z.B. *CD19*, *BLNK*, *Ig α*) und sorgt dafür, dass Gene anderer Zelltypen reprimiert werden (z.B. *MPO*, *CSF1R*), damit die B-Zell-Identität erhalten bleibt [109]. Dies konnte in Mausmodellen mit PAX5 Knock out Experimenten in differenzierten B-Zellen gezeigt werden. Differenzierte B-Zellen waren nach konditionalem Knock out von PAX5 wieder in der Lage, pluripotente Vorläuferzellen zu bilden und in andere hämatopoetische Zelltypen zu differenzieren [109,110].

Einleitung

Nach der initialen B-Zell-Entwicklung durch die drei Transkriptionsfaktoren E2A, EBF1 und PAX5, bei der es zur Ausbildung des BZRs kommt, ist ein ganzes Netzwerk an Transkriptionsfaktoren für die weiteren Differenzierungen nötig. Sox4, IRF4 und IRF8 sind für den Schritt von der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle verantwortlich, teilweise allerdings in redundanter Funktion. Octamer-bindender Transkriptionsfaktor 1 (OBF-1) ist dagegen für den Schritt vom Prä-B-Zell Stadium zu unreifen bzw. naiven B-Zellen verantwortlich [111].

Auch bei peripheren B-Zellen spielen Transkriptionsfaktoren bei der Differenzierung eine wichtige Rolle. Die Transkriptionsfaktoren BLIMP1, XBP1 und IRF4 sind entscheidend an der Plasmazellentwicklung beteiligt, während BCL6, PAX5 und MITF die Keimzentrums B-Zell-Identität aufrechterhalten [112]. Der Transkriptionsfaktorkomplex NF- κ B hat je nach Komplexzusammensetzung verschiedene Funktionen in der B-Zell-Entwicklung. In Mäusen, denen die p50 Untereinheit fehlt, findet keine Differenzierung zu Marginal Zonen B-Zellen statt, einem B-Zell-Subtyp in der Milz, der für sehr schnelle Antikörperproduktion nach Infektion verantwortlich ist [113]. Ist dagegen REL-B, ein weiterer Bestandteil des NF- κ B Komplexes, nicht vorhanden, können sich keine Keimzentren bilden und die Organisation der Marginalzone in der Milz ist beeinflusst [114]. Weitere Knock out Experimente, die jeweils mehrere Komponenten betrafen, konnten zeigen, dass NF- κ B einen großen Anteil an der Differenzierung von unreifen zu reifen B-Zellen hat [115,116]. Durch die Kombination von Cytokinen und Transkriptionsfaktoren wird die B-Zell-Entwicklung gesteuert und die Identität der einzelnen Stadien aufrechterhalten. Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass diese Entwicklung nicht irreversibel ist und B-Zellen ein hohes Maß an Plastizität besitzen. So kann es durch eine deregulierte Expression von Transkriptionsfaktoren oder Cytokinen zu einer Reprogrammierung in ihre jeweiligen Vorläufer kommen [117].

Ein Beispiel, wie eine Reprogrammierung *in vivo* durch malignen Krankheiten auftreten könnte, ist das Hodgkin Lymphom. Es zeichnet sich durch die Expression von Cytokinen und deren Rezeptoren der verschiedensten hämatopoetischen Zelltypen aus und ist daher eine interessante Tumorentität für die Untersuchung von Konsequenzen der linienfremden Genexpression im lymphatischen System. Im Folgenden soll das Hodgkin Lymphom kurz näher charakterisiert werden.

1.5 Das Hodgkin Lymphom

Das Keimzentrum von peripheren Lymphgefäßen kann der Ursprung einer Vielzahl von Lymphomen sein. Dabei wird die Rolle von nicht-malignen Zellen des Umfeldes von

Einleitung

Tumorzellen, dem inflammatorischen Begleitinfiltrat, immer stärker diskutiert [118]. Die Steuerung von Migration, Differenzierung und Wachstum in der normalen B-Zell-Entwicklung durch Cytokine kann sich auch auf das biologische Verhalten von Tumorzellen auswirken und deren Pathogenese positiv beeinflussen. Zu den Lymphomen des Keimzentrums zählen unter anderem das Follikuläre Lymphom, das angioimmunoblastische T-Zell Lymphom und das Hodgkin Lymphom [118]. Letzteres nimmt dabei eine besondere Position ein, da es lange Zeit ungeklärt blieb welchen zellulären Ursprung der Tumorzellen es hat und sich durch einen ungewöhnlich hohen Anteil des inflammatorischen Begleitinfiltrates (mehr als 99 % der Tumormasse) auszeichnet [119,120]. Das Hodgkin Lymphom ist mit drei Fällen pro 100.000 Menschen pro Jahr ein häufiges Lymphom und macht ungefähr 30 % aller malignen Lymphome aus [121,122]. Symptome eines Hodgkin Patienten sind geschwollene Lymphknoten, Müdigkeit und Leistungsminderung. Später kommen Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust hinzu. Unbehandelt führt das Hodgkin Lymphom zu 90 % innerhalb von 2-3 Jahren zum Tode [122]. Die Weiterentwicklung der Strahlen-, kombiniert mit Chemotherapien führte in den letzten Jahren zu einer Heilungsrate von 80-90 % [121]. Besonders Patienten im Alter von 19-25, die die größte Inzidenz an Hodgkin Fällen aufweisen, sind bei diesen Therapien durch Nebenwirkungen wie zum Beispiel sekundäre Neoplasien gefährdet [123]. Daher ist es immer wichtiger molekulare Ursachen zu ergründen, um spezifischere Therapien für das Hodgkin Lymphom zu finden.

Bevor der zelluläre Ursprung des Hodgkin Lymphoms näher beschrieben wird, soll nun kurz die Geschichte des Hodgkin Lymphoms reflektiert werden.

1.5.1 Die Geschichte des Hodgkin Lymphoms

Im Jahre 1832 veröffentlichte Thomas Hodgkin (1798 – 1866) erstmals einen Artikel, in dem das Hodgkin Lymphom als eigenes Krankheitsbild eingestuft wurde. Er beschrieb eine ungewöhnliche Vergrößerung von Drüsen- und Milzgewebe in sechs, post mortem von ihm untersuchten, Patienten.

Bereits Cruickshank (1786) und Craigie (1828) berichten über ähnliche Beobachtungen, schrieben diese aber immer Folgeerscheinungen durch andere Erkrankungen zu [124]. 1865 wurde dann durch Sir Samuel Wilks der Name Hodgkin bis heute mit der Krankheit verknüpft. Die ersten histopathologischen Beschreibungen der Tumorzellen gehen auf Carl Sternberg (1898) und Dorothy Reed (1902) zurück. Die Bezeichnung der Zellen nach einkernigen Hodgkin (H) und mehrkernigen Reed-Sternberg (RS) Zellen begründet sich in den Arbeiten dieser beiden Autoren [125,126].

Einleitung

Die Ursache der Krankheit wurde seitdem kontrovers diskutiert. Ein paralleles Auftreten von Tuberkulose wurde sowohl von Thomas Hodgkin als auch Carl Sternberg diagnostiziert und als Ursache in Erwägung gezogen. 1932 postulierte Gordon erstmals eine Rolle von Viren, da Extrakte aus Lymphknoten von Hodgkin Patienten Enzephalitis in Kaninchen verursachten [124]. Erst in den 1960er Jahren wurde das Hodgkin Lymphom aufgrund der Klonalität und Aneuploidie der neoplastischen Zellen als maligne Krankheit eingestuft [124].

1.5.2 Der zelluläre Ursprung der HRS Zellen

Der zelluläre Ursprung der Tumor Zellen des Hodgkin Lymphoms war aufgrund ihrer Seltenheit im Tumorgewebe und ihres einzigartigen Expressionsmusters lange Zeit unklar [127]. Vor allem die Ko-Expression von Oberflächenmarkern verschiedener hämatopoetischer Zelltypen machte eine klassische Einordnung im hämatopoetischen System unmöglich. Durch die Möglichkeit von Einzelzell-Dissektion aus gefrorenen Patientenproben konnte herausgefunden werden, dass die meisten HRS Zellen klonale Umlagerungen und somatische Hypermutationen in ihren Immunglobulingenen aufweisen. Diese Vorgänge finden nur in B-Zellen statt, die durch ein Antigen aktiviert wurden und sich in der Keimzentrumsreaktion befanden [128].

Zusätzlich kann man in einem ungewöhnlich hohen Anteil (25 %) der Hodgkin Lymphom Fälle somatische Hypermutationen identifizieren, die einen ursprünglich funktionellen Rezeptor durch Einfügen von Stopp Codons zu einem nicht-funktionellen BZR umwandeln. Diese so genannten destruktiven Mutationen führen im Keimzentrum normalerweise zur Apoptose. Aufgrund dieser Befunde wurden die HRS Zellen des Hodgkin Lymphoms als prä-apoptotische Keimzentrums B-Zellen identifiziert [129].

Die gleichen Analysen führten auch zur Entdeckung von HRS Zellen, die Umlagerungen in den T-Zell-Rezeptor- (TZR) Genen aufwiesen. Der hier zu Grunde liegende T-Zell-Ursprung trifft jedoch nur für 2 % der Fälle zu. Microarray Analysen von T-Zell-abstammenden Hodgkin Lymphom Zelllinien (HDLM-2) haben gezeigt, dass diese in ihrem Genexpressionsmuster den Hodgkin Lymphom Zellen zugeordnet werden können [130]. Die ungewöhnliche Expression von T-Zell Genen kommt hauptsächlich in den von B-Zell-abstammenden HL Fällen vor [131].

Ein Schema der B-Zell-Entwicklung im Lymphknoten und der vermutete Ursprung der HRS Zellen ist in **Abb. 1.3.** dargestellt.

Einleitung

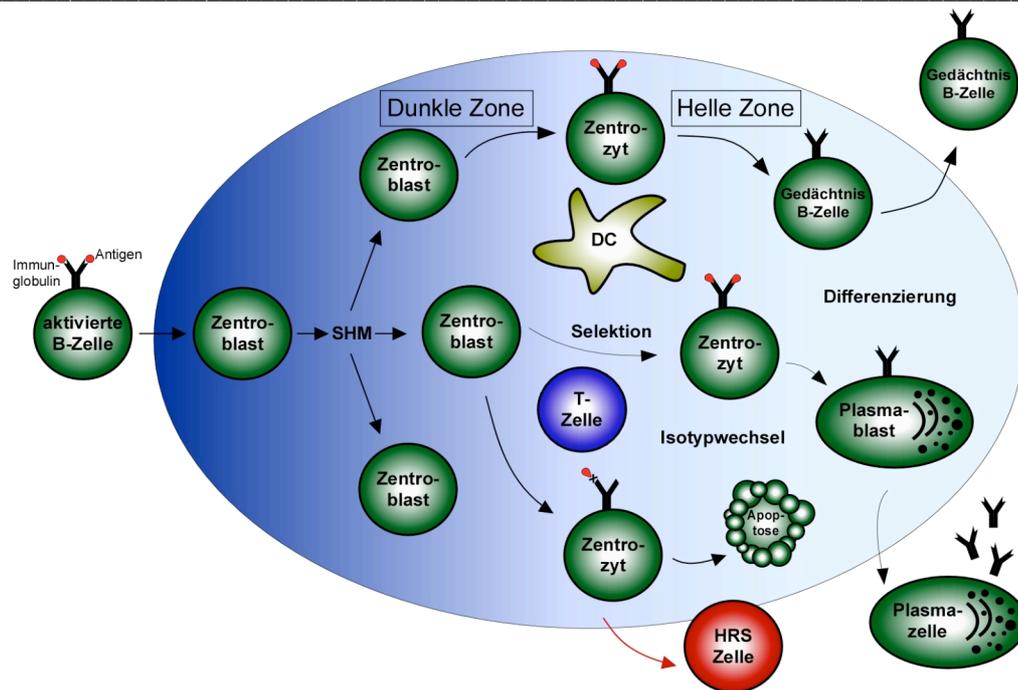


Abbildung 1.3: Schema der B-Zell-Entwicklung im Lymphknoten. Dargestellt sind verschiedene Differenzierungsschritte, die zeitlich und räumlich voneinander getrennt stattfinden. T-Zellen und dendritische Zellen (DC) sind dabei antigenpräsentierende Zellen, die die Selektion von B-Zellen mit funktionellen und hochaffinen B-Zell Rezeptoren unterstützen. Aufgrund von B-Zell Rezeptor Genumlagerungen und somatischen Hypermutationen wird der Ursprung von HRS Zellen des Hodgkin Lymphoms in B-Zellen, die bereits eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben, gesehen. Bemerkenswert ist dabei, dass HRS Zellen keinen funktionellen B-Zell Rezeptor exprimieren und daher eigentlich der Apoptose zugeführt werden müssten (modifiziert nach Klein et.al., NatRevImm, 2008). (SHM – Somatische Hypermutationen)

Die Ereignisse, die zur Transformation der prä-apoptotischen Keimzentrums B-Zellen führen, sind dagegen weiterhin unklar. Dem Epstein-Barr-Virus (EBV) wird bei einem signifikanten Anteil der Hodgkin Fälle eine Verantwortung zugeschrieben. In der westlichen Hemisphäre findet man zu etwa 40 % den EBV in HRS Zellen, in den Entwicklungsländern ist dieser Anteil höher [132]. Viral codierte Proteine (z.B. LMP1 und LMP2A) können B-Zell Signalwege imitieren bzw. ersetzen. Aktiviertes CD40 kann durch LMP1 imitiert werden und LMP2A kann die Funktion des BZRs ersetzen [133,134]. EBNA1, ein weiteres EBV Protein, reguliert das Tumor Suppressor Gen *Protein-Tyrosin Phosphatase- κ* herunter [135]. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass B-Zellen mit nicht funktionierendem BZR durch EBV vor der Apoptose geschützt werden können [136,137,138]. In den EBV positiven Fällen hat EBV aus diesen Gründen vermutlich einen großen Anteil an der Transformation der HRS Zellen. Welche Proteine eine Transformation der B-Zellen in EBV negativen Fällen verursachen ist spekulativ. Eine inverse Korrelation mit dem EBV Status gibt es für verschiedene aktivierte Rezeptortyrosinkinasen, wie 'platelet derived growth factor receptor- α ' (PDGFRA) und

Einleitung

'epithelial discoidin domain-containing receptor 2' (DDR2), was zu der Vermutung führt, dass die Rezeptortyrosinkinasen die Funktionen von EBV bei der Pathogenese von HRS Zellen ersetzen könnten [121].

Ein gemeinsames Merkmal aller Hodgkin Lymphom Zellen unabhängig vom EBV Status ist jedoch die konstitutive Aktivität einer Vielzahl von normalerweise streng regulierten Transkriptionsfaktoren. Im nächsten Kapitel wird näher auf deregulierte Transkriptionsfaktornetzwerke eingegangen, die zur Expression von B-Zell-fremden Genen führen können bzw. zur Repression von B-Zell-spezifischen Genen beitragen. Es wird darüber spekuliert, ob diese Vorgänge bei dem Schutz vor der Apoptose einen Vorteil für die Tumorzellen darstellen. In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass HRS Zellen in der Tat mit der Expression von B-Zell-fremden Genen durch autokrine oder parakrine Stimulation sich und ihr Umfeld in einer überlebenssichernden Weise beeinflussen.

1.5.3 Transkriptionsfaktornetzwerke in HRS Zellen

Der für Lymphome und Leukämien ungewöhnliche Verlust der B-Zell-Identität kann zumindest teilweise durch den Verlust von wichtigen Transkriptionsfaktoren wie OCT2, BOB1 und PU.1 erklärt werden [139,140,141]. Eine epigenetische Ursache der fehlenden Expression von B-Zell-spezifischen Genen in HRS Zellen wird in der Literatur diskutiert. Ushmorov et. al. konnten zeigen, dass durch die Demethylierung von DNA in HRS Zellen, mittels 5-Aza-Deoxycytidin (5-Aza-dC) Behandlung, B-Zell-spezifische Gene wie *CD19*, *CD20*, *CD79B*, *SYK*, *PU.1*, *BOB.1/OBF.1*, *BCMA* und *LCK* wieder hochreguliert werden können [142]. Analysen der Promotorregionen einiger dieser Gene zeigten, dass die Herunterregulierung in HRS Zellen mit dem hypermethylierten Status der Promotoren korreliert [142].

EBF1, einer der Schlüsselfaktoren für die B-Zell-Differenzierung, wird ebenfalls nur auf sehr geringem Niveau exprimiert. Dieser ist nicht nur für die Expression von B-Zell-Genen verantwortlich, sondern unterdrückt gleichzeitig auch die Expression von linien-fremden Genen. Seine geringe Expression in HRS Zellen könnte daher auch zur Hochregulierung von Genen der T- und myeloiden Zelltypen führen [143,144].

Ein weiterer wichtiger Faktor in der B-Zell-Entwicklung ist E2A. E2A ist in den HRS Zellen detektierbar, jedoch in der Funktion durch die beiden Inhibitoren 'aktivierter B-Zell Faktor 1' (ABF-1) und 'Inhibitor von Differenzierung und DNA Bindung 2' (ID2) beeinträchtigt [145,146]. Die normale physiologische Rolle von ABF-1 ist unbekannt. ID2

Einleitung

wird in dendritischen Zellen exprimiert und fördert deren Differenzierung, während es die B-Zell-Entwicklung unterdrückt [147,148].

Der dritte entscheidende Transkriptionsfaktor in der B-Zell-Differenzierung ist PAX5. Obwohl PAX5 in HRS Zellen exprimiert ist, sind viele der Zielgene nicht detektierbar [146,149]. Mutationen, die die Funktionsfähigkeit von PAX5 beeinträchtigen könnten, sind bisher nicht bekannt [150]. Da die Expression von Genen jedoch oftmals die konzentrierte Aktion mehrerer Transkriptionsfaktoren ist, fehlen vermutlich wichtige andere Ko-Faktoren für eine normale Funktion von PAX5.

Zu den Faktoren, die in HRS Zellen aberrant hochreguliert sind und damit sowohl die Expression von B-Zell-Genen inhibieren, als auch Gene anderer Zelltypen hoch regulieren, gehört Notch1 [151]. Notch1 wird aktiviert durch den Jagged1 Liganden, der im Umfeld der Tumorzellen exprimiert wird und sorgt normalerweise für die Erhaltung und Differenzierung der T-Zell-Identität [152]. Es konnte auch eine Interaktion von Notch1 mit PAX5 identifiziert werden, die evtl. eine Erklärung für die Beeinträchtigung der PAX5 Funktion sein könnte [152].

Die Expression von linien-fremden Transkriptionsfaktoren trägt nicht nur zu der Hochregulation von B-Zell-fremden Genen bei, sondern unterdrückt auch die Expression der B-Zell-spezifischen Gene. Faktoren, die nur in Stammzellen exprimiert werden, könnten die Inhibition der Expression der B-Zell-spezifischen Gene in HRS Zellen ausüben. *GATA2* ist ein Zielgen von Notch1 und wird in HSZs und in Mastzellen, nicht jedoch in normalen B-Zellen, exprimiert [153,154]. In HRS Zellen kann *GATA2* ebenfalls detektiert werden. Mehrere Mitglieder der Polycomb Gruppe (*BMI1*, *RING1*) sind im Hodgkin Lymphom exprimiert. Sie können zu Chromatinmodifikationen führen, B-Zell-spezifische Gene herunterregulieren und sorgen in Stammzellen für die parallele Expression von Genen verschiedener Zelltypen [155,156,157]. Im nächsten Abschnitt sollen weitere bisher bekannte Defekte der HRS Zellen kurz erläutert werden.

1.5.4 Molekulare Defekte in HRS Zellen

Durch Analysen von einzelnen HRS Tumorzellen und Zelllinien konnten in den letzten Jahren immer mehr Mechanismen gefunden werden, die zur Deregulation des Expressionmusters der HRS Zellen und potentiell zur Pathogenese des Hodgkin Lymphoms beitragen. Ein wichtiger Schwerpunkt war dabei, wie die HRS Zellen als prä-apoptotische Zellen vor dem programmierten Zelltod geschützt werden. Mutationen in pro- bzw. anti-apoptotischen Genen sind selten, abgesehen von Ausnahmen wie *p53*,

Einleitung

welches in einigen Hodgkin Lymphom Zelllinien mutiert ist [158,159]. Translokationen, die zum Beispiel BCL-6 als Regulator der Keimzentrums Differenzierung von B-Zellen betreffen, sind in HRS Zellen seltene Ereignisse [160,161].

Viele anti-apoptotische Proteine wie zum Beispiel CASP8, c-FLIP und XIAP sind hochreguliert und tragen durch ihre Überexpression zur Apoptoseresistenz bei [162,163,164].

Die größten Aberrationen konnten bei Genen identifiziert, die den Jak/STAT und den NF- κ B Signalweg betreffen. Wie bereits in der Einführung zu IL-21 beschrieben, führen die Signalwege vieler Cytokine über die Aktivierung von Jak Proteinen, die ihrerseits dann zur Phosphorylierung und Transkriptionsaktivität von STAT Proteinen führen. In HRS Zellen findet man Amplifikationen des *JAK2* Gens sowie Mutationen des 'Suppressor of Cytokine signalling' (*SOCS1*) Gens [165,166,167]. *SOCS1* ist ein Inhibitor des Jak/STAT Signalweges und wird durch die Mutationen inaktiviert. Die NF- κ B Aktivität in HRS Zellen ist von einer Reihe genetischer Schäden beeinflusst. Für das Gen *REL* konnten in einer Vielzahl von Fällen Amplifikationen festgestellt werden. Gene für Inhibitoren des NF- κ B Signalweges ($I\kappa B\alpha$ und $I\kappa B\epsilon$) sind in einem signifikanten Anteil an Fällen mutiert [168,169,170]. *TNFAIP3*, das Gen für die Ubiquitinase bzw. Deubiquitinase A20, ist in einigen Fällen mutiert. Dadurch wird das Enzym inaktiv und es kommt zu keiner negativen Regulation der NF- κ B Aktivität [171]. Weiterhin wurde beobachtet, dass *TNFAIP3* Mutationen in den Fällen auftraten, in denen der EBV Status negativ war. Die Mutationen könnten ein weiterer alternativer Mechanismus sein, der zur Hodgkin Pathogenese beitragen kann.

1.5.5 Deregulierte Signalwege in HRS Zellen

Die konstitutive Aktivität einiger Signalwege im Hodgkin Lymphom ist nicht immer aufgrund genetischer Defekte zu erklären. In HRS Zellen sind vier STAT Faktoren (*STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B* und *STAT6*) durch parakrine oder autokrine Stimulation verschiedener Signalwege konstitutiv aktiviert, die genaue Ursache ist nur in wenigen Fällen bekannt [172,173,174]. Für *STAT6* konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Expression von IL-13 und IL-13R eine autokrine Aktivierung in HRS Zellen erfolgt [175]. Auch für die anderen Faktoren wird eine Aktivierung durch Cytokinrezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen vermutet.

Für die Aktivierung von NF- κ B werden vor allem 'Tumornekrosefaktor Rezeptor' (TNFR) Familienmitglieder verantwortlich gemacht. HRS Zellen exprimieren CD30, CD40, TACI,

Einleitung

BCMA und RANK [176,177,178,179]. Die Liganden der jeweiligen Rezeptoren werden von den HRS Zellen selber (BAFF im Falle von TACI und BCMA, RANKL bei RANK) [177,178] oder vom Umfeld der Tumorzellen produziert. CD40L wird von T-Zellen exprimiert, die unmittelbar neben den HRS Zellen lokalisiert sind [180], während der Ligand von CD30 durch eosinophile Granulozyten oder Mastzellen der Umgebung zur Verfügung gestellt wird [181,182]. Für CD30 konnte eine konstitutive ligandenunabhängige Aktivierung des CD30 Signalweges und ein gleichzeitiger Beitrag zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch CD30 in HRS Zellen identifiziert werden [183]. APRIL, ein Ligand für TACI und BCMA, wird von neutrophilen Granulozyten im Tumorgewebe exprimiert [177]. Die aberrante Expression und Aktivität von Notch1 kann ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B beitragen [184].

Auch andere Signalwege sind in HRS Zellen dereguliert und konstitutiv aktiv. Dies betrifft PI3K-Akt, den Erk Signalweg, AP1 und verschiedene Rezeptortyrosinkinasen [185,186,187,188]. Die Ursachen für diese Aktivierungen sind weitestgehend spekulativ. Die Inhibition dieser Signalwege führt zum Proliferationsarrest oder sogar zum Zelltod der Tumorzellen, so dass diese Signalwege essentielle Überlebensfaktoren darstellen [185,189]. Der PI3K-Akt Signalweg könnte durch CD30, CD40, RANK und Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden, ebenso wie der Erk Signalweg. Bei beiden sind aktivierte Formen der jeweiligen zentralen Proteine des Signalweges in HRS Zellen identifiziert worden (Serin/Threonin Kinasen Akt bzw. ERK1, 2 und 5). Substrate dieser Enzyme können in den Tumorzellen in ihre aktive Form umgewandelt werden [186,189]. AP1 Transkriptionsfaktoren sind Dimere der Jun- und der Fos-Proteinfamilie. In HRS Zellen wird vor allem JUN und JUNB exprimiert und AP1 Zielgene wie Galectin1 und CD30 sind hochreguliert. Die Expression von JUNB wird durch die Aktivität von NF- κ B gesteuert, während der Mechanismus für die Expression von JUN noch weitestgehend ungeklärt ist [187,190,191].

Eine weitere Besonderheit unter den Lymphomen stellt die hohe Anzahl an exprimierten Phosphotyrosinkinasen im Hodgkin Lymphom dar. Zu ihnen zählen der 'Platelet-derived growth factor- α ' (PDGFRA), die Tyrosinkinasen (TRK) A und TRKB, sowie DDR2 [188]. Mutationen in den einzelnen Domänen der Rezeptoren konnten bisher noch nicht identifiziert werden, daher wird die Ursache der Aktivierung eher in der parakrinen oder autokrinen Stimulation vermutet.

Bemerkenswert ist die Vielzahl von Defekten und deregulierten Signalwegen, die gleichzeitig in den HRS Zellen auftauchen können und zu dem einzigartigen Phänotyp führen. Hierbei ist zu beachten, dass die Expression von Cytokinen und die Interaktionen mit dem Umfeld der Tumorzellen eine große Bedeutung haben. Genetische Mutationen

Einleitung

können diese Effekte noch verstärken, es bleibt jedoch spekulativ, ob sie Ursache oder sekundäre Effekte der Pathogenese sind.

1.5.6 Das zelluläre Umfeld der HRS Zellen und die Rolle von Cytokinen im Hodgkin Lymphom

Ein bereits genanntes charakteristisches Merkmal des Hodgkin Lymphoms ist das umfangreiche Infiltrat an inflammatorischen Immunzellen, welches die HRS Zellen umgibt. Es hat sich gezeigt, dass viele dieser T-, B-, Plasma- und Mastzellen sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten durch die HRS Zellen selber aktiv in das Tumorgewebe angelockt werden. Durch die Sekretion von CCL5 (RANTES), CCL17 (TARC) und CCL22 (MDC) durch HRS Zellen migrieren zum Beispiel Th2 und regulatorische T-Zellen (T_{reg}) in Richtung der Tumorzellen [192]. IL-5, CCL5, CCL28 und Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) sorgen dagegen für die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in das Hodgkin Lymphom Gewebe. Durch CCL5 werden zusätzlich auch Mastzellen angelockt. IL-8, welches ebenfalls von HRS Zellen exprimiert und sezerniert wird, führt zum Einwandern von neutrophilen Granulozyten [192].

Einige Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Tumorzellen abhängig von Signalen ihres zellulären Umfeldes sind. Die primären HRS Zellen sind schwer zu kultivieren und kommen im peripheren Blut gar nicht oder nur zu einer sehr geringen Anzahl vor. Bei Ansiedelung in nicht-lymphatischem Gewebe kann man das gleiche Umfeld an Zellen sehen [193]. $CD4^+$ T-Zellen stellen dabei die größte Population an infiltrierenden Zellen dar. Sie bilden so genannte T-Zell Rosetten, die die HRS Zellen umgeben und versorgen diese, wie schon erwähnt, zum Beispiel mit CD40L, aber auch mit IL-3, dessen Rezeptor ebenfalls von HRS Zellen exprimiert wird [194]. Eine weitere Fähigkeit der HRS Zelle ist die Koordination von Aktionen verschiedener Zelltypen untereinander. So können sie durch verschiedene Faktoren (z.B. $TNF\alpha$ oder $TGF\beta$) Fibroblasten dazu aktivieren CCL5 oder Eotaxin zu produzieren, was wiederum zur Anziehung von eosinophilen Granulozyten oder T_{reg} -Zellen führen kann [195].

Die Attraktion von T_{reg} -Zellen hat einen weiteren Vorteil für die HRS Zellen. Sie können dadurch einem Angriff durch cytotoxische T-Zellen oder natürliche Killer Zellen entgehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anhäufung von T_{reg} -Zellen im Tumorgewebe nicht alleine auf Chemotaxis beruht, sondern auch durch induzierte Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen erfolgt [190]. Die Produktion der immunsuppressiven Cytokine IL-10,

Einleitung

TGF β , Galectin1 und Prostaglandin E₂ durch HRS Zellen führt zu einer weiteren Repression der Immunantwort [190,192,196,197].

Dies zeigt, dass die Interaktion von Tumorzellen mit dem Umfeld durch Cytokine im Hodgkin Lymphom eine besondere Rolle spielt und bei der Entwicklung neuer Therapien mit einbezogen werden muss. Eine weitere Erforschung dieser Interaktionen ist dafür die Grundlage.

1.6 Zielstellung der Arbeit

In dieser Arbeit geht es um die funktionelle Charakterisierung linien-fremder Cytokine im Hodgkin Lymphom. Dabei soll die Beteiligung von neuen, linien-fremden Cytokin/Rezeptorsystemen bei der Pathogenese des Hodgkin Lymphoms und die Wirkung auf die Tumorzellen selber beurteilt werden. In zwei getrennten Teilen dieser Arbeit wird dabei jeweils die Expression von IL-21/ IL-21R bzw. CSF-1/CSF1R Hodgkin Lymphom im Vergleich zu anderen B-Zell Lymphomen und Leukämien analysiert. Aus diesen Analysen können Rückschlüsse auf eine differentielle Expression der Cytokine bzw. Rezeptoren im Hodgkin Lymphom gezogen werden. Weiterhin kann gezeigt werden, ob die Voraussetzungen für einen intakten Signalweg auf der Ebene des Rezeptors und des Ligands gegeben sind.

Für IL-21 ist anschließend die Fragestellung, welcher der verschiedenen Signalwege stromabwärts nach Stimulation des IL-21R in HRS Zellen genutzt wird. Daraus ergeben sich dann die Untersuchung der aktivierten Zielgene und die Konsequenzen aus dieser Zielgenaktivierung für die Tumorzellen und deren zelluläres Umfeld.

Auch für CSF-1 wird, nach der Analyse der Expression, die funktionelle Bedeutung der CSF1R Stimulation für die HRS Zellen untersucht. Dabei soll die Rolle von CSF-1 und CSF-1R als Proliferation induzierende Faktoren in HRS Zelllinien näher charakterisiert werden. In Experimenten mit stabilen Zelllinienklonen werden die Auswirkungen einer Expression von CSF-1R in Non-Hodgkin Zellen untersucht.

Zusätzlich wird ein Schwerpunkt auf die Regulation von *CSF-1* und *CSF1R* als B-Zell-fremde Gene in HRS Zellen mit einem B-Zell Ursprung gelegt. Dabei ist vor allem die Frage zu klären, wie die Expression von *CSF1R* ermöglicht wird, obwohl der als essentiell beschriebene Transkriptionsfaktor PU.1 fehlt und der repressorische Transkriptionsfaktor PAX5 in den HRS Zellen exprimiert ist. Wenn möglich wurden die Daten aus den Zelllinien in primärem Material von Hodgkin Lymphompatienten verifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	BMA, Rockland, ME, USA
Agencourt magnetische Beads	BeckmanCoulter, Danvers, MA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	Difco/BD, Sparks, MD, USA
Bacto Trypton	Difco/BD, Sparks, MD, USA
β -Mercaptoethanol	Gibco BRL, Billings, MT, USA
Blasticidin	Calbiochem, LaJolla, CA, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Whitehouse Station, NJ, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
CpGenome Universal Methylated DNA	Millipore, Billerica, MA, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, MO, USA
DEPC	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ExpressHyb Lösung	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Ficoll	Sigma, St. Louis, MO, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutamax	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Difco/BD, Sparks, MD, USA
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Low Molecular Weight Marker (LMW)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Microscint™ 0	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
MOPS	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma, St. Louis, MO, USA
NP40	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Optimem	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Substanz	Hersteller
Penicillin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, St. Louis, MO, USA
poly[d(I-C)]	Roche, Mannheim, Deutschland
Ponceau-Rot	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protein-A-Sepharose	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
Protein-Assay (Bradford Reagenz)	BioRad, München, Deutschland
RPMI-1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec, München, Deutschland
Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trichostatin A (TSA)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trinatriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Sigma, St. Louis, MO, USA
Venimmun	Centeon, Marburg, Deutschland
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Humane Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp
L428	Hodgkin Lymphom
L1236	Hodgkin Lymphom
KM-H2	Hodgkin Lymphom
L591	Hodgkin Lymphom
HDLM-2	Hodgkin Lymphom
L540	Hodgkin Lymphom
L540Cy	Hodgkin Lymphom
Reh	Akut lymphoblastische prä-B-Zell Leukämie
Blin	Akut lymphoblastisches B-Zell Lymphom
Karpas1106	Mediastinales lymphoblastisches B-Zell Lymphom
SU-DHL-4	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
SU-DHL-5	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
SU-DHL-6	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
Oci-Ly-3	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
Oci-Ly-10	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
Karpas422	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
Namalwa	Burkitt Lymphom
BL-60	Burkitt Lymphom
BJAB	Burkitt Lymphom
Raji	Burkitt Lymphom
Ramos	Burkitt Lymphom
CA46	Burkitt Lymphom
H9	Cutanes T-Zell Lymphom (Sezary)
Jurkat	Akut lymphoblastische T-Zell Leukämie
KE37	Akut lymphoblastische T-Zell Leukämie
Molt 14	Akut lymphoblastische T-Zell Leukämie
Molt 4	Akut lymphoblastische T-Zell Leukämie
MM1.S	Multipl. Myelom
HL-60	Akut myeloide Leukämie
DEL	Anaplastisch großzelliges Lymphom
FEPD	Anaplastisch großzelliges Lymphom
HEK293	Transformierte humane embryonale Nierenzelllinie

Material und Methoden

2.1.3 Bakterienstämme

E. coli XL1 blue

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Radioaktive Verbindungen

Verbindung

Hersteller

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml)	NEN, Boston, MA, USA
$^3\text{[H]}$ -Thymidin	NEN, Boston, MA, USA

2.1.5 Antikörper

Spezifität (Experiment)	Isotyp	Hersteller	Produktnummer
IL-21 (WB, IHC, ELISA)	Kaninchen	Peprotech	#500-P191
IL-21R (FACS)	MausIgG1	R&D Systems	#MAB9911
IL-21 (ELISA)	Kaninchen	Peprotech	#500-P191Bt
p44/p42 (WB)	Kaninchen	CellSignaling	#9102
pp44/p42 (WB)	Kaninchen	CellSignaling	#9101
STAT3 (WB)	Kaninchen	CellSignaling	#9132
pSTAT3 (WB)	Kaninchen	CellSignaling	#9131
IL-6 (ELISA)	Maus	R&D Systems	#MAB206
IL-6 (ELISA)	Ziege	R&D Systems	#BAF206
CD30 (Ki-1)(Stimulation)	Maus	Pathologie Harald Stein, Charité, UKBF	
CD95 (Apoptose)	Maus	Coulter-Immunotech	#IM1504
MIP-3 α (IHC)	Ziege	SantaCruz	#sc-9775
MIP-3 α (Migration)	Ziege	R&D Systems	#AF360
CCR6 (FACS)	Maus IgG2B	R&D Systems	#MAB195
CD127-PE (FACS)	Maus IgG1	BD Pharmingen	#557938
CD4-FITC (FACS)	Maus IgG1	Miltenyi Biotec	#130-080-501
CD25-PE (FACS)	Maus IgG2B	Miltenyi Biotec	#130-091-024
FoxP3-APC	Maus IgG1	Miltenyi Biotec	#130-093-014
CSF-1 (FACS)	Maus IgG2A	R&D Systems	#MAB216
CSF1R (FACS, IP)	Maus IgG1	R&D Systems	#MAB3291
CSF1R (WB)	Kaninchen	SantaCruz	#sc-692
pTyrosin (WB)	Maus IgG2B	SantaCruz	#sc-7020
I κ B α (WB)	Kaninchen	SantaCruz	#sc-371
PU.1 (WB)	Kaninchen	SantaCruz	#sc-352
H3K4me3 (ChIP)	Kaninchen	Abcam	#ab4441
CBFA2T3	Kaninchen	Raman Kumar	Australien
FLAG M2 (WB)	Maus	Sigma Aldrich	#F1804
Maus IgG1-PE (FACS)	Ziege	Dianova	#115-116-071
β -Aktin (WB)	Maus	Sigma-Aldrich	#A5316
PARP1 (WB)	Ziege	SantaCruz	#sc-1561
Ziege IgG-HRP (WB)	Affe	SantaCruz	#sc-2020
Kaninchen IgG-HRP (WB)	Ziege	Promega	#W401B
Maus IgG-HRP (WB)	Ziege	Promega	#W402B
Isotypkontrolle	Kaninchen	SantaCruz	#sc-3888
Isotypkontrolle	Maus IgM	Ancell	#290-010
Isotypkontrolle	Maus IgG2A	R&D Systems	#MAB003
Isotypkontrolle	Maus IgG1	R&D Systems	#MAB002
Isotypkontrolle	Maus IgG2B	R&D Systems	#MAB0041
Isotypkontrolle	Ziege	R&D Systems	#AB-108-C

Material und Methoden

2.1.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
DreamTaq™ Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, WI, USA
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
AccuPrime™ Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.7 Kits

Kit	Hersteller	Produktnummer
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Indianapolis, IN, USA	#11483188001
AnnexinV-FITC/PI Kit	Bender MedSystems, Wien, Österreich	# BMS500FI
ECL	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden	# RPN2132
HexaLabelKit	MBI, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	# K0611
Nucleobond Maxi Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA	#740417
pGEM®Teasy cloning Kit	Promega, Madison, WI, USA	#TM042
QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	#20021
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	#27106
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	#74106
QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, LaJolla, CA, USA	#200518
Agencourt AMPure	BeckmanCoulter, Brea, CA, USA	#A50850
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	#4367659
First Choice® RLM-RACE Kit	Ambion, Austin, TX, USA	#AM1700
Invisorb® SpinTissueMiniKit	Invitex, Berlin, Deutschland	#1032100200
EpiTect Bisulfit Conversion Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	#59110
DuoSet® ELISA Development Kit MIP-3 α	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	#DY360
DuoSet® ELISA Development Kit CSF-1	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	#DY216
Fix&Perm® Kit	Caltag Laboratories, Buckingham, UK	#GAS-003
CD19 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-050-301
CD33 Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-091-153
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland	#79254
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison, WI, USA	#E1960
FoxP3 Staining Buffer Set	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-091-153

Material und Methoden

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Nylonmembran Zeta-Probe® Blotting membran	BioRad, München, Deutschland
Quick Spin Column	Roche, Basel, Schweiz
Nitrozellulosemembran Protran®	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
Transwell® Permeable Supports 3 µm	Costar, Corning, NY, USA
Elektroporationsküvetten	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Whatmanpapier	Schleicher&Schuell Bio Science, Dassel
X-omat LS Filme	Kodak, Rochester, NY, USA
UniFilter® - 96, GF/C®	PerkinElmer, Waltham, MA, USA

2.1.9 Plasmide und BAC Klone

Plasmid	Hersteller
pcDNA3.1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pEGFP-N3	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pGEM®-T Easy	Promega, Madison, WI, USA
pEF6.5VHIS-CSF1R	Konstrukt v. M. Roussel, Memphis, TN, USA
pEF6.5VHIS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pcDNA3.1 CBFA2T3a	s. Methoden
pcDNA3.1 CBFA2T3b	s. Methoden
pRK5	BD Pharmingen, SanDiego, CA, USA
pRK5 IKKβ (EE)	s. Methoden
pGL2 Basic	Promega, Madison, WI, USA
pGL2 Promotor	Promega, Madison, WI, USA
pCR®2.1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BAC Klon RZPDB737C051001D	Imagenes, Berlin, Deutschland

2.1.10 Oligonukleotide

2.1.10.1 PCR

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>CSF1R-805s</i>	TGACCCCAGATGTAGAGGAT
<i>CSF1R-713as</i>	GGCACCAGATTCGTGTCT
<i>CSF1R-595s</i>	CTGGGCAACAGAGTGAAACTG
<i>CSF1R-483as</i>	CCCTGATGTCCTGGCTTACAA
<i>CSF1R-169s</i>	AGAAGAGGATCAGCCCAAGGA
<i>CSF1R-78as</i>	AGGGATCGGGACACTGGAC
<i>CSF1R-100s</i>	TGTGTCCAGTGTCCTGATCC
<i>CSF1R-14as</i>	AAGTGGCAGGCAGGTGCAG
<i>CSF1R+1s</i>	ATGGGCCCAGGAGTTCTG
<i>CSF1R+96as</i>	TCCATCACACCCCAACAAAG
<i>CSF1R+59s</i>	CCCAGTGATAGAGCCCAGTGT
<i>CSF1R+148as</i>	CATTCCACGCTGCCATTG
<i>CSF1R-5747s</i>	GCGTGCTCAATAGTTTATGT
<i>CSF1R-5084as</i>	TTAAGTCAATGAAGCCAGTA
<i>CSF1R-5090s</i>	TTTTGCTACTGGCTTCATTGA
<i>CSF1R+148as</i>	CATTCCACGCTGCCATTG

Material und Methoden

Primerbezeichnung	Sequenz (5'→3')
<i>CSF1R-6152s</i>	GCCTTCCACTATGATTCTGA
<i>CSF1R-143as</i>	CCTCCTCCTTGGGCTGAT
<i>CSF1R+720s</i>	AACACTAAGCTCGCAATCC
<i>CSF1R+1325as</i>	TCACACCTATCAGTGTGGCC
<i>CSF1s</i>	TGCTGTTGTTGGTCTGTCTCC
<i>CSF1as</i>	AGCTGTTGTTGCAGTTCTTGC
<i>GAPDHs</i>	ATGCTGGCGCTGAGTAC
<i>GAPDHas</i>	TGAGTCCTTCCACGATAC
<i>GAPDHs (Real-Time)</i>	CTCTGCTCCTCCTGTTCCGAC
<i>GAPDHas (Real-Time)</i>	TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC
<i>TBPs</i>	CAGGAGCCAAGAGTGAAGAACA
<i>TBPas</i>	AGCTGGAAAACCCAACTTCTGT
<i>CBFA2T3s</i>	CGAGCACCTCAGCAAACG
<i>CBFA2T3as</i>	GGGCCCTTCTTTGTGTCCTC
<i>TBP Ps</i>	CTGGCGGAAGTGACATTATCAA
<i>TBP Pas</i>	GCCAGCGGAAGCGAAGTTA
<i>IL-21s</i>	GGATTGTCATCTGTCTGATGG
<i>IL-21as</i>	TCACTCCCGTGTGTTCTAGAGG
<i>IL-21Rs</i>	GATGTATTCCAATTCATGGCC
<i>IL-21Ras</i>	TGACAAGCAGGAGGAGAAGC
<i>MCL-1s</i>	GAGGAGGAGGAGGACGAGTT
<i>MCL-1as</i>	ACCAGCTCCTACTCCAGCAA
<i>IL-6s</i>	CCACTCACCTCTTCAGAACG
<i>IL-6as</i>	TGACCAGAAGAAGGAATGCC
<i>TGF-βs</i>	GGGACTATCCACCTGCAAGA
<i>TGF-βas</i>	CGGAGCTCTGATGTGTTGAA

Erläuterungen: *CSF1R* Primer sind nummeriert relativ zum A (+1) des ATG Startcodons. **Fett/kursive** Zahlenangaben beziehen sich auf die genomische Sequenz, *kursive* Angaben beziehen sich auf die relative Position in der cDNA Sequenz (NM_005211). P – Promotor; s – sense; as – antisense

2.1.10.2 EMSA

Shiftoligo	Sequenz (5'→3')
NF-κB sense	AGCTCAGGGCTGGGGATTCCCCATCTCCACAGG
NF-κB antisense	AGCTCCTGTGGAGATGGGGAATCCCCAGCCCTG
STAT3 sense	AGCTTCATTTCCCGTAAATCCCTA
STAT3 antisense	AGCTTAGGGATTTACGGGAAATGA
STAT5 sense	AGCTAGATTTCTAGGAATTCAATCC
STAT5 antisense	AGCTGGATTGAATTCCTAGAAATCT

2.1.10.3 siRNA

siRNA	Sequenz (5'→3')
shCBFA2T3	GAAGTGATCGACCACAAGC
shKontrolle	GACACGCGACTTGTACCA

Material und Methoden

2.1.10.4 Bisulfit-Pyrosequenzierung

Name	Sequenz (5'→3')	5' - Modifikation	Produktlänge
R1-2_s	GTGAGTTTTTGTGGAGGGATAGATGGTTGGA	Biotin	349bp
R1-2_as	CCCCACCCTAACTAAAACCACAAACCTAACAACCTACC		
R1-2_seq1	CCCACAAAATAAATAAAAAATA	Biotin	264bp
R1-2_seq2	CCCCCACCACCTA		
R3_s	TTTGTAGGTAGTTGTTAGGTTTGTGGTTTTAGTTAGGGTG	Biotin	289bp
R3_as	CAAACCCAACCTCCCCCCTTCAAATCT		
R3_seq	TAGGAGGTTTTTAGGGTAG	Biotin	183bp
R4_s	TGGGAGGAGGAAGTTGTTGGAAGGTTAAA		
R4_as	CCTAAAAAACCCAAACCTCCCCACCACCAACTAAATAT		
R4_seq	AAAAAATCTCCCTACAACCT		
R5_s	AGGTGGTGGGGTGGGGGTAGAGA	Biotin	183bp
R5_as	CTCACCAACCCACCTACCCCAACT		
R5-seq	GGGTGGGGGTAGAGA		

2.1.11 Rekombinante Proteine

Protein	Hersteller
rhIL-21	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
rhCSF-1	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
IL-21R:Fc	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CSF1R:Fc	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
rhMIP-3 α	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
rhIL-6	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
rhIL-21	Antigenex, Huntington Station NY, USA

2.1.12 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x MOPS	0.2 M MOPS, 0.05 M Natriumacetat, 0.01 M EDTA, pH 7.0
10x Shift-Hybridisierungspuffer	0.5 M Tris HCl pH 8.0, 0.7 M NaCl
20x SSC	3 NaCl, 0.3 M Trinatriumcitrat
4x Laemmlipuffer	200 mM Tris-HCl pH 6.8, 40 % Glycerol, 16 % SDS, 20 % β -Mercaptoethanol, 0.22 % Bromphenolblau
Antikörperverdünnungslösung (AKV)	1 % Venimmun, 0.01 % Na ₃ in PBS
Immunoblot-Transferpuffer	35 mM Tris, 40 mM Glycin, 0.04 % SDS, 20 % Methanol
Immunoblot-Waschpuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 % Triton-X100, 1 % Trockenmilchpulver
LB Medium	10 g Bacto-trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1l H ₂ O
NP40-Hochsalzlysepuffer	20 mM HEPES pH 7.9, 350 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA pH 8.0, 0.2 mM EGTA pH 8.0, 1 % NP40, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail / 5ml, 1 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄

Material und Methoden

Puffer	Zusammensetzung
PBS	0.8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.2 mM NaH ₂ PO ₄ , 14 mM NaCl
Protein-A-Sepharose Suspension	50 % (vol/vol) Protein-A-Sepharose in H ₂ O
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris, 500 mM Glycin, 0.1 % SDS
TBE	0.1 M Tris, 0.1 M Borsäure, 2.5 mM EDTA

2.1.13 Geräte

Gerät	Hersteller
FACSAria™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSCantoII™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSVantage™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Gene Pulser™ Xcell	BioRad, München, Deutschland
Bioruptor™	Diagenode, Liège, Belgien
ABI StepOnePlus™	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
VacuumPrep Tool	Biotage, Uppsala, Schweden
Nanodrop Spectrophotometer ND1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
SpectraMax 250 Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Mithras LB940 Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
TOPCount NXT	PerkinElmer, Waltham, MA, USA

2.1.14 Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Diva	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Pyro Q-CpG 1.0.9	Biotage, Uppsala, Schweden

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 *Zellkulturbedingungen*

Alle Zelllinien wurden in RPMI-1640 unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamax und 1 mM Natriumpyruvat bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Je nach Zelllinie wurden sie mit einer Dichte von 1×10^5 – 5×10^5 Zellen pro ml gehalten.

2.2.1.2 *Aufreinigung primärer Zellen*

Für die Aufreinigung von CD19⁺ oder CD33⁺ primären Zellen wurden mononukleäre Zellen aus Blut von freiwilligen Spendern über eine Dichtezentrifugation (Ficoll) separiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit den jeweiligen Kits nach Angaben des Herstellers über eine magnetische Säule aufgereinigt. Für CD19⁺ Zellen wurden CD19 Microbeads (#130-050-301) genutzt und für CD33⁺ Zellen der 'Monocyte Isolation Kit II' (#130-091153). Nach der Aufreinigung wurden die Zellen sofort lysiert und entweder RNA oder Protein isoliert. Die Aufreinigungseffizienz wurde mittels spezifischer Antikörper gegen CD20 (B-Zellen) bzw. CD14 (Monozyten) durchflusscytometrisch analysiert und lag bei > 85 %. Im Falle der Migrationsexperimente wurden die gesamten mononukleären Zellen über den Zeitraum des Versuches in Migrationsmedium bzw. in Zellkulturüberstand inkubiert (s. **Kap. 2.2.9**).

2.2.1.3 *Transiente Transfektion von Zellen*

Für die Transfektion von Zellen wurde die Methode der Elektroporation genutzt. Die Menge benötigter Zellen wurde mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 500 µl *Optimem* Transfektionsmedium aufgenommen und 30 µg/ Küvette Expressionsplasmids hinzupipettiert (Abweichungen in der Plasmidmenge sind jeweils angegeben). Die Zellen sind anschließend in eine Elektroporationsküvette überführt worden und die Transfektion erfolgte in einem GenePulser™ Xcell Gerät nach einem exponentiellen Protokoll. Die jeweiligen Bedingungen waren Zelllinien-abhängig und sind in **Tab. 2.1** aufgeführt.

Material und Methoden

Zelllinie	Transfektionsbedingungen
L428	950 μ F; 180 V
KM-H2	50 μ F; 500 V
L591	500 μ F; 300 V
L540Cy	950 μ F; 180 V
Reh	500 μ F; 300 V
SU-DHL-4	950 μ F; 230 V
H9	950 μ F; 250 V
Molt-14	950 μ F; 260 V

Tabelle 2.1: Transfektionsbedingungen für Zelllinien

Nach der Elektroporation wurden die Zellen nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37 °C in Standardmedium ohne Penicillin bzw. Streptomycin überführt.

2.2.1.4 Generierung stabiler Klone

Für die Generierung von stabilen Klonen sind die Zellen nach Protokoll mittels Elektroporation mit dem Plasmid pEF6.5VHis-CSF1R (10 μ g) transfiziert worden. Nach 24 h sind die Zellen mit Blasticidin (s. **Tab. 2.2**) selektioniert und für 7 – 10 Tage unter diesen Bedingungen weiterkultiviert worden.

Zelllinie	Konzentration Blasticidin (μ g/ml)
SU-DHL-4	4
H9	8
Molt-14	6

Tabelle 2.2: Blasticidin Konzentration bei der Generierung stabiler Klone

Anschließend wurden die Zellen verdünnt und in 96-Well Platten (0.5 bzw. 5 Zellen pro Well) eingesät. Nach weiteren 14 – 21 Tagen sind Kolonien, die aus einer Zelle entstanden sind, geerntet und weiter kultiviert worden. Diese Zellen wurden auf Expression des CSF1R Transgens mittels durchflusscytometrischer Zelloberflächenfärbung mit CSF1R-spezifischen Antikörpern analysiert. Entsprechende Kontrollen mit leerem Vektor pEF6.5VHis (Mock) sind parallel kloniert worden.

Material und Methoden

2.2.2 DNA

Die Standardmethoden Plasmidpräparation, Klonierungsmethoden, Agarose-Gelelektrophorese in TBE usw. wurden nach Sambrook et. al. [198] oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.2.2.1 Molekulare Klonierungen

Für die Klonierung der Promotorkonstrukte zur Analyse der LTR Promotoraktivität wurde die DNA des BAC Klonen RZPDB737C051001D, der einen Teilbereich von Chromosom 5 abdeckt, genutzt. In diesem Bereich sind die regulatorische LTR Region des *CSF1R* Gens, die klassischen regulatorischen Elemente des *CSF1R* Gens und das *CSF1R* Gen selber enthalten. Mit Hilfe von Primern, die zusätzlich die Restriktionsstellen von NheI (sense primer) und XhoI (antisense Primer) enthalten (s. **Tab. 2.3**), wurden drei verschieden lange Bereiche aus der Sequenz des *THE1B* LTRs amplifiziert, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aufgereinigt und über die Schnittstellen NheI und XhoI in den *pGL2 Basic* Vektor kloniert. Die Zahlen in der Primerbezeichnung beziehen sich auf die Position der Primer, relativ zum Transkriptionsstart des Transkripts in der *THE1B* LTR Sequenz (s. **Abb. 3.46**).

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Promhuc-fmsLTR-382 s	AC GCTAGC TTCCCCCTTATTGGCAATT
Promhuc-fmsLTR-142 s	AC GCTAGC TTGTAATAATTCCCACATGTCAA
Promhuc-fmsLTR-85 s	AC GCTAGC GGCAGTTTTCCCCATACTGT
Promhuc-fmsLTR+14 as	AC CTCGAG GGCAGGCAAAGAGTATATG

Tabelle 2.3: Primer für die Klonierung von Luciferasepromotorkonstrukten

Für die Klonierung der CBFA2T3 Isoformen (CBFA2T3a und CBFA2T3b) sind PCR Fragmente mit Primern, die jeweils an den 5' und 3' Enden des Transkripts liegen, und cDNA von Zelllinien, die beide Isoformen exprimieren, generiert worden. Die Primer enthielten Restriktionsschnittstellen, die eine Klonierung in das Expressionsplasmid pcDNA3.1 ermöglichen (s. **Tab. 2.4**). Die amplifizierten Fragmente wurden entsprechend ihres Retentionsverhaltens in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem '*QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit*' extrahiert. Durch einen Restriktionsverdau von pcDNA3.1 und nachfolgender '*T4 DNA Ligase*' vermittelter Ligation nach Angaben des Herstellers mit den Fragmenten wurde das Expressionsplasmid hergestellt. Parallel erfolgte eine Sequenzierung des PCR-Amplifikats. Durch Transfektion des Plasmides in HEK293 Zellen und Expressionskontrolle mittels Western Blot Analysen wurde die Funktionsfähigkeit der Konstrukte untersucht.

Material und Methoden

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
CBFA2T3b BamHI s	GGATCCGCCACCATGCCGGACTCCCCAG
CBFA2T3a NheI s	AGCTAGCGCCACCATGCCGGCTTCAAGATG
CBFA2T3b+a XhoI as	CTCGAGTCAGCGGGGCACGGTGTC

Tabelle 2.4: Primer für die Klonierung der CBFA2T3 Isoformen

Das IKK β (EE) Expressionsplasmid wurde durch Punktmutagenese des pRK5 IKK β Konstruktes (bereitgestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Claus Scheidereit) generiert. Wie bei Delhase, *et. al.* [199] beschrieben, wurden dabei durch zwei Punktmutationen ('*QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit*') die Serine S177 und S181 jeweils in Glutamate umgewandelt (S177E und S181E). Die Primer, die für die Mutagenese genutzt wurden sind in **Tab. 2.5** aufgeführt:

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
IKK β S177E s	GAGCTGGATCAGGGCGAACTTTGCACATCATTTCG
IKK β S177E as	CGAATGATGTGCAAAGTTCGCCCTGATCCAGCTC
IKK β 177E S181E s	GAGCTGGATCAGGGCGAACTTTGCACAGAATTTCG
IKK β 177E S181E as	CGAATTCTGTGCAAAGTTCGCCCTGATCCAGCTC

Tabelle 2.5: Primer für die Mutagenese des IKK β Expressionsplasmides

2.2.2.2 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma AGOWA in Berlin durchgeführt.

2.2.2.3 Mutagenese von Promotorkonstrukten

Die Mutation der Transkriptionsfaktorbindungsstellen in dem pGL2-LTR-*cfms*-142/+14 Konstrukt erfolgte mit dem '*QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit*' nach Angaben des Herstellers. Die genutzten Primer sind in der **Tab. 2.6** aufgeführt.

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
LTRmutkB1 s	ATAAATGGCGTTCCCTG
LTRmutkB1 as	CAGGGGAACGGCCATTTAT
LTRmutkB2 s	ATAAATGGCCGTTAACCTGC
LTRmutkB2 as	GCAGGTTAACGGCCATTTAT
LTRmutkB3 s	ATAAATGGCCTTTAACCTG
LTRmutkB3 as	CAGGTTAAAGGCCATTTAT
LTRmutAP1dist s	GGAGATAATTGAATTGTGGGGGCAG
LTRmutkAPdist as	CTGCCCCACAATTCAATTATCTCC
LTRmutGATAprox s	CAGGTGGACTTAATTGAATC
LTRmutGATAprox as	GATTCAATTAAGTCCACCTG
LTRmutSP1prox s	CATGTCAAGTTTGGGGCCACCTGG
LTRmutSP1prox as	CCACCTGGCCCCAACTTGACATG

Material und Methoden

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
LTRmutAP1distGATAprox s	GGGGCAGGTGGACTTAATTGAATTGTGGGGGCAGTTTTTC
LTRmutAP1distGATAprox as	GAAAACTGCCCCCAACAATTCAATTAAGTCCACCTGCCCC

Tabelle 2.6: Primer für die Mutagenese der Luciferasepromotorkonstrukte

Die mutierten Plasmide wurden jeweils sequenziert und auf die gewünschten Mutationen hin analysiert.

2.2.2.4 PCR Techniken

2.2.2.4.1 Reverse Transkriptase-PCR

Die reverse Transkriptase (RT-) PCR Analysen sind mittels *DreamTaq™* Polymerase nach Standardmethoden [198] und nach Angaben des Herstellers durchgeführt worden. Die genutzten Primer sind in **Kap. 2.1.10.1** aufgeführt.

2.2.2.4.2 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitativen Real-Time Analysen wurden mit dem 'Power SYBR® Green PCR Master Mix' nach Angaben des Herstellers angefertigt. Die Experimente wurden mit dem ABI StepOnePlus™ Gerät durchgeführt. Der cDNA Gehalt wurde dabei jeweils auf die Menge der *GAPDH* oder TBP Amplifikate normalisiert.

2.2.2.4.3 5'-RLM-RACE PCR

Die 5'-RLM-RACE PCR Analysen sind im Labor von Prof. Constanze Bonifer in Leeds, UK durchgeführt worden.

Die Transkriptionsstartstellen des *CSF1R* Gens in verschiedenen Zelllinien wurden mit dem 'First Choice® RLM-RACE' Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die dafür genutzten *CSF1R* Gen-spezifischen Primer waren als äußerer Primer *CSF1R-14* as und als innerer Primer *CSF1R-78* as (s. **Kap. 2.1.10.1**). Von jeder RLM-RACE Reaktion wurden die Produkte in den pCR®2.1 Vektor kloniert ('TA Cloning Kit') und je 10 individuelle Bakterienkolonien sequenziert.

Material und Methoden

2.2.2.5 Methylierungsexperimente

Die Bisulfit Pyrosequenzierungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Reiner Siebert in Kiel, Deutschland durchgeführt. Dafür sind fünf verschiedene Amplikons genutzt worden, die die Transkriptionsstartstellen (TSS) der *CBFA2T3* Isoformen (Isoform A: NM_005187.4; Isoform B NM_175931) abdecken. Die genomische DNA der Zelllinien und der primären Lymphome wurde mit dem *'Invisorb® SpinTissueMiniKit'* nach Angaben des Herstellers präpariert. Diese wurde dann mit dem *'EpiTect Bisulfit Conversion Kit'* Bisulfit konvertiert. In der folgenden PCR Reaktion wurden die lokusspezifischen Primer genutzt, wobei einer der beiden Primer biotinyliert war (s. **Kap. 2.1.10.4**). Bei der PCR wurde die *'AccuPrime™ Taq Polymerase'* und *Puffer 2* genutzt sowie 75 ng Bisulfit konvertierter DNA und Primer in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Nach der initialen Denaturation wurde die PCR mit 45 Zyklen (95 °C für 30 s; Annealing Temperatur für 30 s, 68 °C für 30 s) und einer finalen Synthese bei 68 °C für 2 min durchgeführt. Die Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Mit Hilfe des VacuumPrep Tool wurden Einzelstränge präpariert, gefolgt von einem Denaturierungsschritt bei 85 °C für 2 min und einer Sequenzprimerhybridisierung. Die Pyrosequenzierung erfolgte mittels *'Pyrosequencer ID'* und der DNA Methylierungs Analyse Software *'Pyro Q-CpG 1.0.9'*. Alle Experimente wurden optimiert und bewertet mit kommerzieller, komplett methylierter DNA. Die Ergebnisse wurden kontrolliert mittels gesammelter DNA aus peripherem Blut von 10 gesunden, männlichen und weiblichen freiwilligen Spendern.

2.2.3 RNA

2.2.3.1 RNA Präparation

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann mit dem *'RNeasy Mini Kit'* nach Angaben des Herstellers lysiert und RNA extrahiert. Um DNA Kontaminationen zu verhindern, wurde während der Extraktion ein DNase Verdau mit *'RNase Free DNase Set'* durchgeführt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert. Konzentrationsbestimmungen erfolgten photometrisch an einem Nanodrop Spectrophotometer ND1000.

2.2.3.2 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem *'First Strand cDNA Synthesis Kit'* und wurde mit 1 µg RNA nach Protokoll durchgeführt. Für die Synthese wurden Oligo-dT Primer genutzt.

Material und Methoden

2.2.3.3 Northern Blot

Die Northern Blot Sonden für CSF-1, CSF1R und GAPDH wurden durch PCR Reaktionen mit cDNA aus Zelllinien und spezifischen Primern hergestellt. (s. **Tab. 2.7**)

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
<i>CSF1R+720s</i>	AACACTAAGCTCGCAATCC
<i>CSF1R+1325as</i>	TCACACCTATCAGTGTGGCC
<i>CSF1s</i>	TGCTGTTGTTGGTCTGTCTCC
<i>CSF1as</i>	AGCTGTTGTTGCAGTTCTTGC
<i>GAPDHs</i>	ATGCTGGCGCTGAGTAC
<i>GAPDHas</i>	TGAGTCCTTCCACGATAC

Tabelle 2.7: Primer für die Generierung von Northern Blot Sonden

Die Produkte aus dieser PCR wurden über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das amplifizierte DNA Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem 'QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit' eluiert. Durch Vergleich mit dem quantifizierenden Marker (Smart Ladder) ist die ungefähre Menge des Amplifikats bestimmt worden; durch Klonierung in den pGEM®-T Easy Vektor wurde die Sequenz des amplifizierten Produktes kontrolliert.

Für die Northern Blot Experimente wurden jeweils 60 ng der amplifizierten DNA Oligomere mit Hilfe des HexaLabel Kit radioaktiv markiert. Nicht eingebautes [α -³²P]dCTP wurde durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe von Quick Spin Säulen nach Angaben des Herstellers entfernt.

Die RNA Agarose-Gelelektrophorese wurde nach folgendem Protokoll und mit den entsprechenden Materialien durchgeführt:

RNA Gel	1.2 % Agarose, 1.1 % Formaldehyd, 1x MOPS
Prämix	1.3x MOPS, 3 M Formaldehyd, 4 % Formamid
Ladepuffer	1 mM EDTA (pH 8.0), 0.25 % Bromphenolblau(gesättigt), 0.25 % Xylencyanol, 50 % Glycerol
10x MOPS	0.2 M MOPS, 0.05 M Natriumacetat, 0.01 M EDTA (pH 7.0)
20xSSC	3 M NaCl, 0.3 M Trinatriumcitrat

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 10 µg Gesamt-RNA in 12 µl H₂O mit 39 µl Prämix, 10 µl Ladepuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1 µg/µl) aufgefüllt, für 15 min bei 55 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V und in 1x MOPS Laufpuffer. Nach dem vollständigen Einlaufen der Proben in das Gel wurde der Laufpuffer ständig zwischen den Elektrodenräumen umgewälzt. Nach der Auftrennung

Material und Methoden

wurden die 28S (4.7 kb)-, 18S (1.87 kb)- und die 5S (0.16 kb)-ribosomale RNA Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte über Nacht ein Übertrag durch Kapillarkräfte auf eine Hybond-N-Membran. Als Transferpuffer diente 20x SSC.

Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung der RNA auf der Membran durch UV-Strahlung (120 mJ/cm²). Für die spezifische Detektion von RNA Banden wurde die Membran nach folgendem Protokoll mit den radioaktiv markierten Sonden hybridisiert: Die Membran ist zunächst 30 min bei 68 °C in 15 ml ExpressHyb inkubiert worden. Anschließend wurde die radioaktive DNA Sonde zunächst 5 min bei 95 °C inkubiert und mit einer Endkonzentration von 1-3 x 10⁶ cpm/15 ml zu der Membran gegeben und über Nacht bei 68 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurden die folgenden Waschschrte vorgenommen:

1. 2x SSC, 0.05 % SDS 20 min bei RT
2. wie 1
3. 0.1x SSC, 0.1 % SDS 20 min bei RT

Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und belichtete X-omat Filme bei -80 °C.

2.2.4 Protein

2.2.4.1 *Präparation von Gesamtprotein*

NP40-Hochsalzlysepuffer	20 mM Hepes (pH 7.9), 350 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.2 mM EGTA (pH 8.0), 1 % NP40, 1x Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail / 3 ml, 1 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄
-------------------------	---

Für die Präparation von Gesamtprotein wurde, wenn nicht anders angegeben, die Hochsalzlyse gewählt. Die Proteine liegen dabei in ihrer nativen Form vor. Nach einem Waschschrte mit PBS wurden die Zellen in dem Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und für weitere 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vom Pellet getrennt und bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte nach Bradford.

Material und Methoden

2.2.4.2 Western Blot und Immunoblotdetektion

4x Laemmlipuffer	200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40 % Glycerol, 16 % SDS, 20 % β -Mercaptoethanol, 0.22 % Bromphenolblau
SDS Laufpuffer	50 mM Tris, 500 mM Glycin, 0.1 % SDS
Immunoblot-Transferpuffer	35 mM Tris, 40 mM Glycin, 0.04 % SDS, 20 % Methanol
Immunoblot-Waschpuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 1 % Trockenmilchpuffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden pro Spur 20 μ g Protein für 5 min in 1 x Laemmlipuffer inkubiert, zusammen mit einem entsprechenden Größenmarker mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Durch Ponceaurot Färbung wurden anschließend die Proteinbanden sichtbar gemacht und die Markerbanden markiert. Für die Immunoblot Färbung ist die Membran 90 min in Immunoblot-Waschpuffer geblockt und für weitere 90 min mit dem Erstantikörper (1:1000 in Immunoblot-Waschpuffer) inkubiert worden. Es folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 45 min (1:5000 in Immunoblot-Waschpuffer). Nach 3 x 10 min Waschschritten wurde die Membran mit dem ECL-Kit behandelt, um dann anschließend X-omat LS Filme zu belichten.

2.2.4.3 EMSA

10x Shift-Hybridisierungspuffer	0.5 M Tris HCl (pH 8.0), 0.7 M NaCl
---------------------------------	-------------------------------------

Die Hybridisierung der einzelsträngigen DNA Oligomere erfolgte bei 95 °C für 10 min und anschließender Abkühlung über Nacht auf Raumtemperatur. Es wurden jeweils 200 ng/ μ l der sense- und antisense Oligomere in insgesamt 50 μ l Shift-Puffer eingesetzt.

Die radioaktive Markierung der hybridisierten Oligomere erfolgte über einen AGCT Überhang am 5'-Ende, welcher mit Hilfe des Klenow-Enzyms durch dNTPs aufgefüllt wurde. Das dCTP wurde dabei durch [α -³²P]dCTP ersetzt. Der Reaktionsansatz sah dabei wie folgt aus:

Shift Oligomer	1.25 μ l
10x Klenowpuffer	2.5 μ l
[α - ³² P]dCTP	4 μ l
dNTPs (ohne CTP)	1 mM
Klenow-Enzym	1 μ l
H ₂ O	Ad 25 μ l

Material und Methoden

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebautes [α -³²P]dCTP wurde durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe von *Quick Spin*-Säulen nach Angaben des Herstellers entfernt.

20x TBE	1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA-Na ₂ x2H ₂ O
2x Shiftpuffer	40 mM Hepes (pH 7.9), 120 mM KCl, 8 % Ficoll, 10 mM DTT, 1 mg/ml BSA, 0.2 µg/ml poly[d(I-C)]
Gel	1x TBE, 5 % Acrylamid-Bisacrylamid, 0.4 ml 10 % APS, 40 µl TEMED, ad 60 ml H ₂ O

Für den EMSA sind 5 µg Gesamtprotein zusammen mit 10 µl 2x Shiftpuffer und 20000 cpm des radioaktiv markierten Oligomers (auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt) für 10 min bei RT inkubiert worden. Anschließend wurden die Proben durch Gelelektrophorese bei 180-240 V aufgetrennt. Dabei wurde 1x TBE als Laufpuffer eingesetzt. Nach der Auftrennung erfolgte ein Transfer auf Whatmanpapier bei Unterdruck und 80 °C für 30 min. Die Belichtung von X-omat LS Filme erfolgte dann mit dem auf Filterpapier getrockneten Gel bei -80 °C.

2.2.4.4 Stimulation mit rekombinanten Proteinen, Rezeptor :Fc Konstrukten und agonistischen Antikörpern

Für die Stimulation mit rekombinanten Proteinen wurden exponentiell wachsende Zellen über Nacht in 0.5 % FCS Medium inkubiert. Am nächsten Tag sind die Zellen mit 20-100 ng/ml rhIL-21 bzw. 100-200 ng/ml rhCSF-1 oder den entsprechenden Mengen H₂O als Kontrolle stimuliert worden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden entweder Protein- und/oder RNA-Präparationen durchgeführt sowie Überstände für ELISA Analysen (s. **Kap. 2.2.4.6**) generiert (rhIL-21). In rhCSF-1 Stimulationsexperimenten sind die stimulierten Zellen für die Immunpräzipitationen des Rezeptors (s. **Kap. 2.2.4.5**) genutzt sowie in ³[H]-Thymidin Experimenten hinsichtlich ihrer Proliferation untersucht worden (CSF1R:Fc) (s. **Kap. 2.2.8**). Bei Ko-Stimulationen wurden die Zellen zusätzlich zu rhIL-21 auch noch mit 100 ng/ml bzw. 500 ng/ml der aktivierenden Antikörpern CH11 (CD95) bzw. Ki-1 (CD30) inkubiert (s. **Kap. 3.1.4**).

Für die spezifische Blockade der jeweiligen Signalwege wurden Rezeptor:Fc Konstrukte genutzt. Diese wurden zur Überprüfung ihrer Effizienz bei der Inhibition von den jeweiligen rekombinanten Proteinen getestet. Dazu sind die Konstrukte (Konzentration s. **Tab. 2.8**) mit den Cytokinen für 90 min bei RT vorinkubiert worden und nach Stimulation

Material und Methoden

der Zellen, wie in den oben genannten Versuchen, auf ihre Fähigkeit zur Blockierung des jeweiligen Effektes analysiert worden. Mit diesen Konzentrationen wurde auch die Inhibition von endogen exprimierten Cytokinen (IL-21 bzw. CSF-1) bei der Regulation von Signalkaskaden und Zielgenen (IL-21) bzw. der Proliferation (CSF-1) untersucht.

Konstrukt	Konzentration
IL-21R:Fc	20-50 $\mu\text{g/ml}$
CSF1R:Fc	80 $\mu\text{g/ml}$

Tabelle 2.8: Konzentrationen der Rezeptor:Fc Konstrukte

2.2.4.5 Immunopräzipitation von CSF1R

IP Lysepuffer	Hepes (pH7.4), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % Glycerol, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , Phosphatase Inhibitor Cocktail II, Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail
---------------	--

Für die Immunopräzipitation (IP) von CSF1R wurden pro Ansatz 6×10^7 Zellen unbehandelt oder behandelt mit rhCSF-1 (s.o.) in PBS gewaschen und dann in IP Lysepuffer für 15 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 14000 rpm und bei 4 °C zentrifugiert. Es erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand nach Bradford. Für eine Reduktion der unspezifischen Bindungen wurden 2.5 mg Protein zunächst mit 30 μl gequollener Protein-A-Sepharose für 30 min rotierend bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation mit 1600 rpm für 1 min bei 4 °C wurde der Überstand mit 2 $\mu\text{g/ml}$ des monoklonalen anti-CSF1R Antikörper bzw. der Maus IgG1 Isotypkontrolle sowie jeweils 25 μl gequollener Protein-A-Sepharose für 6 h rotierend bei 4 °C inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit IP Lysepuffer (Zentrifugation bei 4 °C, 1600 rpm, 1 min) mit jeweiligem Verwerfen des Überstandes wurde die Protein-A-Sepharose mit dem immunpräzipitierten Protein in 25 μl 2x Lämmli resuspendiert, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und anschließend einer SDS - Gelelektrophorese unterzogen. Die Gelelektrophorese und die nachfolgenden Immunoblots sind in **Kapitel 2.2.4.2** beschrieben.

2.2.4.6 ELISA

Für die Bestimmung von sezernierten Cytokinen wurden folgende ELISA Experimente jeweils nach den Angaben des Herstellers durchgeführt: Es wurden 0.8×10^6 Zellen pro ml in frischem Standardmedium aufgenommen und in einer 24-Well Platte ausgesät.

Material und Methoden

Nach 48 h wurde die Platte geerntet und die Zellen abzentrifugiert. Mit den Überständen erfolgte eine Analyse der Cytokinexpression mit den '*DuoSet® ELISA Development Kits*' für MIP-3 α (DY360) und CSF-1 (DY216). Für IL-6 wurden die Antikörper der oben genannten Kits durch #MAB206 als Capture, #BAF206 als Detektionsantikörper und der Proteinstandard durch rhIL-6 (#206-IL) ersetzt. Für IL-21 wurde der Antikörper #500-P191 als Capture, #500-P191Bt als Detektionsantikörper und rhIL-21 (#HC51215) als Standard genutzt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm gemessen. Eine Korrektur für optische Fehler der Platten wurde bei 570 nm durchgeführt. Die Extinktion wurde photometrisch an einem SpectraMax 250 Microplate Reader gemessen.

2.2.4.7 Durchflusscytometrie

Antikörperverdünnungslösung (AKV)	1 % Venimmun, 0.01 % NaN ₃ in PBS
-----------------------------------	--

Für die Analyse von Oberflächenproteinen sind pro Ansatz 1×10^5 Zellen einmal in PBS gewaschen, in Antikörperverdünnungslösung (AKV) aufgenommen und für 15 min bei 4 °C inkubiert worden. Anschließend wurden die Antikörper (s. **Kap. 2.1.5**) mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt in AKV auf die Zellen gegeben und für weitere 10 min bei 4 °C inkubiert. Dieser Schritt wurde mit den jeweiligen Zweitantikörpern, die 1:100 eingesetzt worden sind, wiederholt. Zwischen den Inkubationen und vor der durchflusscytometrischen Analyse sind die Zellen jeweils einmal mit PBS gewaschen worden. Die Analyse im FACSCanto II Gerät erfolgte in PBS und bei der entsprechenden Wellenlänge, abhängig von den Fluorochrom-konjugierten Zweitantikörpern (s. **Kap. 2.1.5**). Die Analysen wurden mittels '*CellQuest*' Software ausgewertet.

Intrazelluläre Färbungen wurden mit dem '*Fix&Perm® Kit*' nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Konzentrationen der Antikörper waren äquivalent zu den Oberflächenfärbungen und auch die Messung und Auswertung der durchflusscytometrischen Analyse erfolgte nach demselben Protokoll.

Für die Färbung von FoxP3 wurde der '*FoxP3 Staining Kit*' genutzt und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Immunhistologie

Alle beschriebenen Fälle stammen aus dem Konsultations- und Referenzzentrum der Hämatopathologie am Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin, Charité und

Material und Methoden

wurden dort von Mitarbeitern der Pathologie von Prof. Harald Stein analysiert. Die Diagnosen wurden nach den Richtlinien der Welt-Gesundheitsorganisation (WHO) gestellt.

2.2.5.1 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemischen Analysen wurden 4 µm Schnitte von Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Patientenmaterial genutzt. Für die Färbungen von IL-21 und MIP-3α wurden folgende Hodgkin Subklassen analysiert: Sechs Fälle vom Mischtyp und vier Fälle von Nodulärer Sklerosis. Zwei dieser Fälle exprimierten das EBV Protein 'Latentes Membran Protein-1' (LMP1). Als primäre Antikörper wurden anti-IL-21, anti-MIP-3α und anti-CBFA2T3 genutzt. Für die Kontrolle der Spezifität der Färbung wurden entsprechende Isotypkontrollen angefertigt.

Bevor die Schnitte mit den primären Antikörpern inkubiert wurden, sind sie in Citratpuffer (10 mM, pH 6.0) getaucht und in einem Hochdruck-Kocher auf hohe Temperatur erhitzt worden. Die gebundenen Antikörper wurden mit der 'Streptavidin-Biotin-Alkaline-Phosphatase' (AP) Methode und FastRed als Chromogen detektiert.

2.2.5.2 In situ Hybridisierung

Für die RNA *in situ* Hybridisierung (ISH) sind in Paraffin eingebettete Gewebeproben entwachst und mit Proteinase K (DAKO, 1:10 verdünnt) behandelt worden. Die Hybridisierung erfolgte mit Biotin markierten *CSF1R* Sonden (*CSF1R* +720/+1325; sense (Negativkontrolle) und antisense Orientierung) in einem DAKO Hybridisierer über Nacht bei 50 °C. Die hybridisierten Proben sind unter stringenten Bedingungen gewaschen worden, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach einer Blockierung von endogenem Biotin sind die spezifischen Bedingungen mit einem 'Streptavidin-AP' Konjugat und NBT/BCIP als Substrat detektiert worden.

2.2.6 Behandlung von Zellen mit agonistischen Antikörpern gegen CD95 oder CSF1R inhibierenden Molekülen

2.2.6.1 CD95 Stimulation

Für die CD95 Stimulation wurden HDLM-2 Zellen im exponentiellen Wachstum mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in jeweils dreifachen Ansätzen ausgesät und mit 10 bzw.

Material und Methoden

20 ng/ml Antikörper gegen CD95 (CH11) (oder der entsprechenden Isotypkontrolle) alleine oder mit 25 bzw. 50 ng/ml rhIL-21 (oder der Wasserkontrolle) stimuliert. Die Zellen wurden dann nach 48 h Inkubation bei 37 °C durchflusscytometrisch auf Annexin-FITC/PI analysiert bzw. der ³[H]-Thymidin Einbau während dieser Zeit gemessen (s. **Kap. 2.2.7** bzw. **Kap. 2.2.8**).

2.2.6.2 Stimulation von Zellen mit CSF1R inhibierenden Molekülen

Als Test für die Funktion der CSF1R inhibierenden Moleküle CYC10268, CYC12200 und CYC12752 im CSF-1 Signalweg wurden L540Cy Zellen über Nacht auf 0.5 % FCS Zellkulturmedium gesetzt, am nächsten Tag mit den inhibierenden Molekülen für 60 min inkubiert, anschließend mit 100 ng/ml rhCSF-1 für 5 min stimuliert und in einer Immunpräzipitation die Phosphorylierung des Rezeptors untersucht (s. **Kap. 2.2.4.5**).

Für die Inhibition der vermuteten autokrinen Schleife von CSF-1 und CSF1R in den HRS Zellen wurden die Zellen mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml in 24-Well Platten in Standard Zellkulturmedium ausgesät und mit den inhibierenden Molekülen CYC10268, CYC12200 und CYC12752 bei dieser Zelldichte bei 37° inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils durchflusscytometrische Analysen einer AnnexinV-FITC und PI Färbung durchgeführt (s. **Kap. 2.2.7**).

2.2.7 Messung der Apoptoserate mit Annexin-FITC/PI Färbung

Die Rate der apoptotischen Zellen wurde in allen Versuchen mit dem '*AnnexinV-FITC/PI Kit*' nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Zellen durchflusscytometrisch analysiert und die doppelt negativen (AnnexinV-FITC/PI) Zellen als Population der lebenden Zellen definiert. Die Wirkungsweise des Kits beruht auf der Tatsache, dass AnnexinV an Phosphatidylserin (PS) bindet, welches zunächst auf der intrazellulären Membranseite verankert ist [200]. Bei der Induktion von Apoptose wird PS an der Zelloberfläche exponiert und ist dadurch für AnnexinV-FITC zugänglich. Bei weiterem Fortschreiten der Apoptose kommt es zu einer Porenbildung in der Membran, wodurch das Propidiumiodid (PI) in die Zelle eindringen und in der fluoreszenzcytometrischen Analyse detektiert werden kann. Die entsprechenden Fluoreszenzemissionen bei denen FITC (Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat) und PI gemessen wurden, waren 519 nm bzw. 617 nm.

Material und Methoden

2.2.8 Messung der DNA Syntheserate durch $^3\text{[H]}$ -Thymidin Einbau

Die Analyse von Proliferationsraten erfolgte indirekt über die Messung des $^3\text{[H]}$ -Thymidin Einbaus in die neu synthetisierte DNA während der Zellteilung. Dafür wurden die Zellen je nach Versuch in Standardmedium oder serumreduziertem Medium mit entsprechenden stimulatorischen Zusätzen (s. **Kap. 2.2.4** und **2.2.6**) inkubiert und dann mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Well in eine 96-Well Platte eingesät und für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert. Die jeweils letzten 24 h wurden die Zellen zusätzlich mit $1 \mu\text{Ci/Well } ^3\text{[H]}$ -Thymidin inkubiert. Nach der gesamten angegebenen Inkubationszeit wurde die Platte über Nacht bei -20 °C eingefroren und die Zellen dadurch lysiert. Am nächsten Tag wurde die Platte auf eine UniFilter®-96,GF/C® Filterplatte geerntet, auf der nur in DNA eingebautes $^3\text{[H]}$ -Thymidin zurückgehalten wird. Anschließend wurde die Filterplatte getrocknet, jedes Well mit 'Microscint® 0' Scintillationsflüssigkeit versehen, versiegelt und in einem Scintillationszähler (TOPCount NXT) gemessen.

2.2.9 Experimente zur Migration von Zellen

Für die Migrationsexperimente wurden Transwells® genutzt, die aus einer 24-Well Platte bestehen, bei der in den Boden des Wells 0.2 % FCS Zellkulturmedium mit und ohne rhMIP-3 α in einem Gesamtvolumen von 500 μl eingesät wurde. Zusätzlich wurden in zwei weiteren Ansätzen ein inhibitorischer Antikörper gegen MIP-3 α (AF360) bzw. dessen Isotypkontrolle zusammen mit dem rekombinanten Protein eingesät. In jedes Well wurde anschließend ein Einsatz mit einer Collagen behandelten, feinporigen (3.0 μm Porendurchmesser) Membran als Boden eingesetzt. In jedem dieser Einsätze wurden jeweils 1×10^6 frisch aufgereinigte, periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMZ) eingesät. Diese Zellen können nur durch aktive Migration durch die Membran in Richtung Medium wandern. Nach einer Migrationszeit von 2.5 h wurden die Membraneinsätze wieder entfernt und von jedem Ansatz die Zellzahl der migrierten Zellen als Triplikate der Wells mit einer Trypanblaufärbung bestimmt. Die Zellzählung erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer. Für die Auswertung wurden alle Ergebnisse auf die Spontanmigration gegen Medium ohne zusätzliche Faktoren bezogen. Eine Steigerung der Migration um den Faktor 1.5 wurde als signifikant bezeichnet.

In weiteren Experimenten wurde anstatt Medium Zellkulturüberstand von verschiedenen Zelllinien als Migrationsmedium genutzt. Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von 6×10^5 Zellen/ml in einer Zellkulturschale in frischem 0.2 % FCS Zellkulturmedium ausgesät,

Material und Methoden

nach 4 Tagen geerntet und abzentrifugiert. Pro Well wurden 500 μ l Überstand alleine oder mit der Isotypkontrolle oder dem inhibitorischen Antikörper gegen MIP-3 α eingesät.

2.2.10 Reporterstudien

Für die Reporterstudien wurden die Zellen wie in **Kapitel 2.2.1.3** beschrieben transfiziert. Bei jeder Transfektion wurde zusätzlich ein Ansatz mit 10 μ g GFP transfiziert und es erfolgte eine durchflusscytometrische Analyse der GFP Expression nach 24 h und 48 h zur Überprüfung der Transfektionsrate. Die Plasmidmengen für die übrigen Ansätze sind in **Tab. 2.9** zusammengefasst:

Zelllinie	Renilla Luciferase /Küvette	Plasmid Firefly	Firefly Luciferase /Küvette
L428	250 ng	pGL2 Basic	10 μ g
KM-H2	400 ng	pGL2 Promotor	10 μ g
L591	200 ng	pGL2 -85/+14	10 μ g
L540Cy	200 ng	pGL2 -142/+14	10 μ g
		pGL2 -382/+14	10 μ g
		pGL2 -142/+14 mutierte Konstrukte	Je 10 μ g

Tabelle 2.9: Plasmidmengen für die Luciferasereporterexperimente

Pro Ansatz wurden 3.5×10^6 Zellen transfiziert. Nach der Transfektion sind die Zellen in 2 ml Medium/Ansatz aufgenommen und bei 37 °C inkubiert worden. Nach 24 h wurde 1 ml der Zellen abgenommen, zentrifugiert (1200rpm, 5 min) und einmal in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Lyse und Luciferase Messung mit dem 'Dual-Luciferase® Reporter Assay System' nach Angaben des Herstellers an einem Mithras LB940 Luminometer. Für die Auswertung sind für jeden Ansatz die Verhältnisse von Firefly zu Renilla Messwerten kalkuliert und die Mittelwerte sowie Standardabweichungen der Triplikate berechnet worden. Die Werte wurden dann jeweils auf den Ansatz mit leerem pGL2 Vektor bezogen, dessen Wert 1 gesetzt wurde.

2.2.11 Behandlung von Zellen mit 5-Aza-dC und/oder TSA

Für die Behandlung von HRS und Non-Hodgkin Zelllinien mit 5-Aza-dC/TSA sind pro Ansatz 1×10^6 Zellen in 3 ml Zellkulturmedium in 6-Well Platten ausgesät worden. Sie wurden dann mit 3 μ M 5-Aza-dC für 72 h und mit 625 nM TSA für 24 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und RNA bzw. Gesamtprotein präpariert.

3 Ergebnisse

Die Auswahl der untersuchten Cytokine erfolgte aufgrund von Genexpressionsanalysen mit HRS Zellen, kombiniert mit einer Literatursuche nach Cytokinen und Cytokinrezeptoren, deren Expression bis dahin als spezifisch für bestimmte B-Zell-fremde Zelltypen bekannt war. Die Cytokine IL-21 und CSF-1 und deren Rezeptoren wurden unabhängig voneinander untersucht. Daher erfolgt im Ergebnisteil und in der Diskussion der Doktorarbeit eine getrennte Darstellung der Ergebnisse der beiden Projekte.

3.1 IL-21/ IL-21R

3.1.1 Expression von IL-21 und IL-21R in HRS Zellen

Die Expression von IL-21 und IL-21R in den Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) und Non-Hodgkin Zelllinien wurde auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Für die Untersuchung der Ausprägung der Expression von IL-21 und IL-21R innerhalb B-Zellen unterschiedlichen Ursprungs wurden HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy), prä-B-Zell Leukämie (Reh) und verschiedene B-Zell Non-Hodgkin Lymphom (Namalwa, SU-DHL-4) Zelllinien sowie aufgereinigte CD19⁺ B-Zellen aus Tonsillen, miteinander verglichen. Für die mRNA Analysen wurden reverse Transkriptase PCRs (RT-PCR) durchgeführt (**Abb. 3.1**).

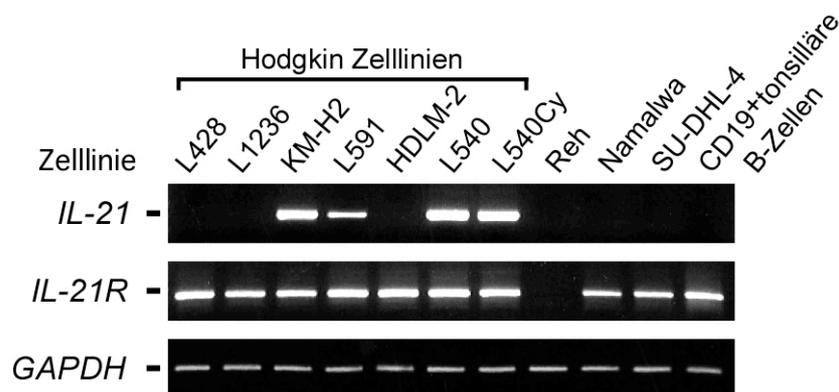


Abbildung 3.1: Analysen der *IL-21* und *IL-21R* mRNA Expression. RT-PCR Analysen von cDNA aus HRS Zelllinien (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540, L540Cy), prä-B-Zell Leukämie Zelllinien (Reh), Non-Hodgkin Lymphom Zelllinien (Namalwa, SU-DHL-4) und primären CD19⁺ tonsillären B-Zellen mit Primern spezifisch für *IL-21* und *IL-21R*. Die Expression von *GAPDH* diente als Kontrolle.

Es zeigt sich eine differentielle Expression von *IL-21* in 4 von 7 HRS Linien, jedoch in keiner der Vergleichszellen. Dabei ist eine hohe Expression in den Linien KM-H2, L540

Ergebnisse

und L540Cy detektierbar und eine etwas geringere auch in L591. *IL-21R* wird in allen Zellen exprimiert außer der Reh Zelllinie, die mit dem prä-B-Zell Ursprung in Übereinstimmung mit Literaturdaten keine *IL-21R* Expression zeigt [16]. Dabei ist das Expressionsniveau in den HRS Zelllinien höher als in den anderen B-Zell Populationen.

Für die Proteinanalyse von IL-21 wurde der Gesamtextrakt von den HRS sowie Reh und Namalwa Zelllinien im Western Blot Verfahren analysiert. Es zeigte sich eine starke Expression in den Zelllinien KM-H2, L540, L540Cy und etwas abgeschwächt in den L591. Die Non-Hodgkin Linien Reh und Namalwa waren dagegen negativ. Trotz der geringen Qualität des Antikörpers bestätigte die Analyse der Proteinexpression die Daten der RT-PCR (**Abb. 3.2**).

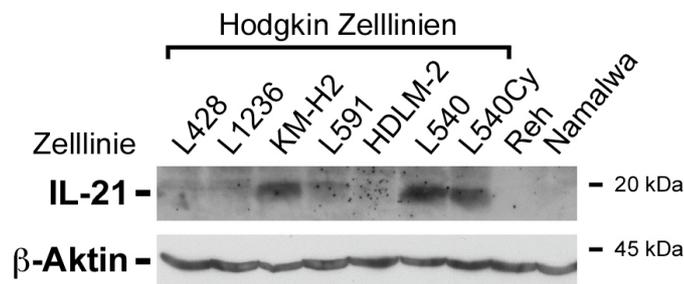


Abbildung 3.2: Analyse der Proteinexpression von IL-21. Western Blot mit 30 μ g Proteingestamtextrakt der angegebenen Zelllinien. Die Membran wurde anschließend mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen IL-21 bzw. β -Aktin gefärbt. Die Detektion von β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Für die Untersuchung, ob IL-21 von den HRS Zellen sezerniert wird und damit aktiv Auswirkungen auf die umliegenden Zellen in einer *in vivo* Situation haben kann, sind verschiedene ELISA Protokolle getestet worden. Die Ergebnisse waren überwiegend unspezifisch oder zeigten auch in Positivkontrollen (rekombinant humanes IL-21) keine Färbung. In **Abb. 3.3** ist das Ergebnis eines ELISA Protokolls gezeigt, das IL-21 spezifisch detektierte.

Es konnte eine große Menge an sezerniertem IL-21 in den Überständen der KM-H2 und L540 Zellen nachgewiesen werden. Alle anderen Zelllinienüberstände waren dagegen negativ, wobei nicht beurteilt werden kann, ob dies an der geringen Sensitivität des ELISAs oder einer nicht vorhandenen Sekretion durch die Zellen liegt.

Ergebnisse

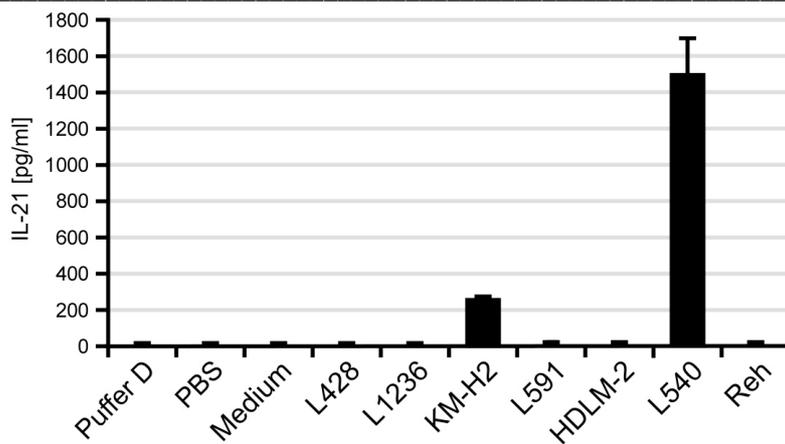


Abbildung 3.3: Analyse der IL-21 Sekretion mit verschiedenen Zelllinien. Für die Experimente wurden Zellen der angegebenen Zelllinien für 48 h in frischem Medium inkubiert und anschließend der Überstand auf IL-21 Protein mittels ELISA untersucht. Die Standardabweichungen sind aus den Duplikaten jeder Probe errechnet worden. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei Experimente. Der Puffer für die Verdünnung der Standardreihe (Puffer D), PBS und Medium dienen dabei als Kontrolle.

Das IL-21R Protein wurde in lebenden Zellen auf der Oberfläche mittels der durchflusscytometrischen Analyse nachgewiesen (**Abb. 3.4**).

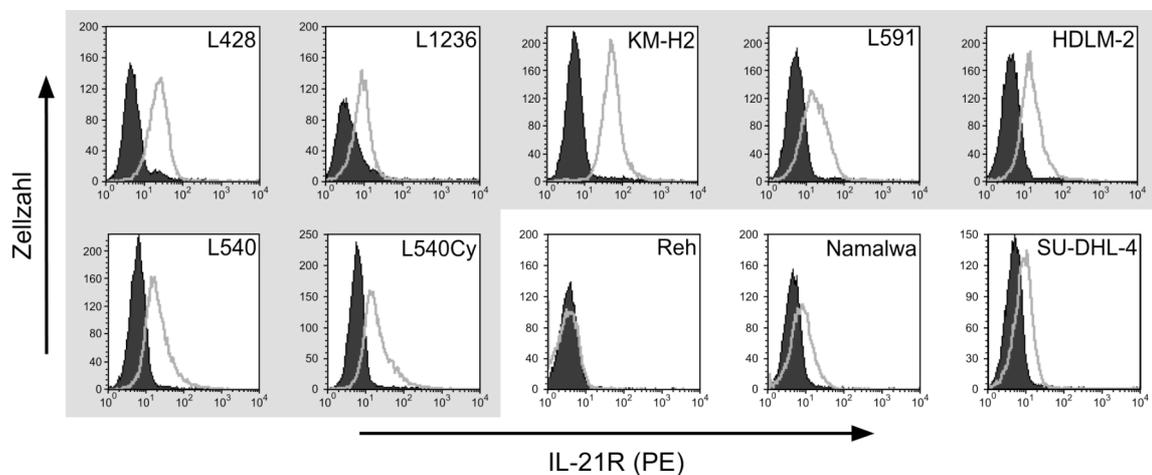


Abbildung 3.4: Analysen der IL-21R Proteinexpression in HRS Zelllinien. Durchflusscytometrische Analysen von HRS Zelllinien (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy; grau hinterlegt) mit einem Antikörper gegen IL-21R (offener Graph) bzw. dessen Isotypkontrolle (gefüllter Graph) im Vergleich zu den Non-Hodgkin Zelllinien Reh, Namalwa und SU-DHL-4.

IL-21R wird in allen Zelllinien außer den Reh Zellen exprimiert und auch die höhere Expression in den HRS Zellen bestätigt die Daten der mRNA Analyse (s. **Abb. 3.1**).

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine Hodgkin Lymphom-spezifische Expression von IL-21. Die gleichzeitige Expression des Rezeptors ließ auf eine parakrine, in einigen Zelllinien sogar auf eine autokrine Stimulation schließen. Die Konsequenzen dieser Stimulation wurden im Folgenden näher untersucht.

3.1.2 IL-21 führt zur Aktivierung von STAT3 Proteinen in HRS Zellen

In einem ersten Schritt zur Analyse der Konsequenzen der IL-21 Expression ist die Funktionalität der IL-21/IL-21R Signalkaskade untersucht worden. Als potentielle Zielproteine in diesem Signalweg findet man in der Literatur vor allem Mitglieder der JAK/STAT Familie, die allgemein bei Typ-I Cytokinen als Mediatoren aktiviert werden [10].

Im speziellen Fall von IL-21 sind es die Proteine STAT1, STAT3 und STAT5, aber auch MAPK und Akt [10]. In dieser Arbeit wurden zunächst die Aktivierung der MAPK p44/p42 und die STAT Proteine STAT5 und STAT3 in den Hodgkin Lymphom Zelllinien untersucht. HRS Zellen, die nur den IL-21R exprimieren, wurden dazu mit rhIL-21 stimuliert und anschließend Gesamtproteinextrakt aus diesen Zellen präpariert. In Western Blot Experimenten wurde die phosphorylierte und damit aktive Form von p44/p42, STAT5 und STAT3 analysiert und/oder in einem EMSA auf DNA Bindungsaktivität dieser Signalwegkomponenten getestet (**Abb. 3.5-3.7**).

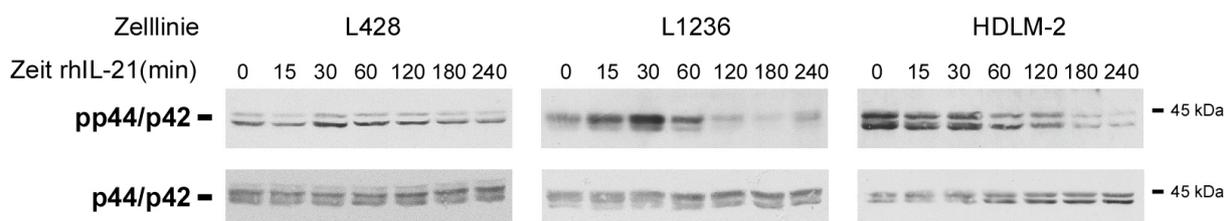


Abbildung 3.5: Kinetik der Phosphorylierung von p44/p42 in HRS Zellen nach Stimulation mit rhIL-21. Die HRS Zelllinien (L428, L236, HDML-2) wurden mit 100 ng/ml rhIL-21 stimuliert. Nach 15, 30, 60, 120, 180 und 240 min ist jeweils Gesamtprotein aus Pellets extrahiert worden. 30 µg Protein sind mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend in einem Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper auf die Phosphorylierung von p44/p42 untersucht worden. Die Färbung der Membran mit einem Antikörper gegen das gesamte p44/p42 dient als Kontrolle. Der 0 min Wert entspricht unstimulierten Zellen.

Die Western Blot Experimente der IL-21 Kinetik hinsichtlich der Aktivierung von p44/p42 waren im Vergleich der verschiedenen Zelllinien nicht konsistent. In den L428 Zellen sind keine Veränderungen der Phosphorylierung von p44/p42 festzustellen, während die Phosphorylierung in den L1236 Zellen nach 15 min leicht zunimmt und nach 120 min

Ergebnisse

wieder das Ausgangsniveau erreicht hat. In den HDLM-2 Zellen nimmt die Phosphorylierung von p44/p42 dagegen sogar über den gesamten Zeitraum von 240 min ab (**Abb. 3.5**).

In einem EMSA wurden die Gesamtextrakte auf die DNA Bindungsaktivität von STAT5 nach der Stimulation der HRS Zelllinien mit rhIL-21 untersucht (**Abb. 3.6**).

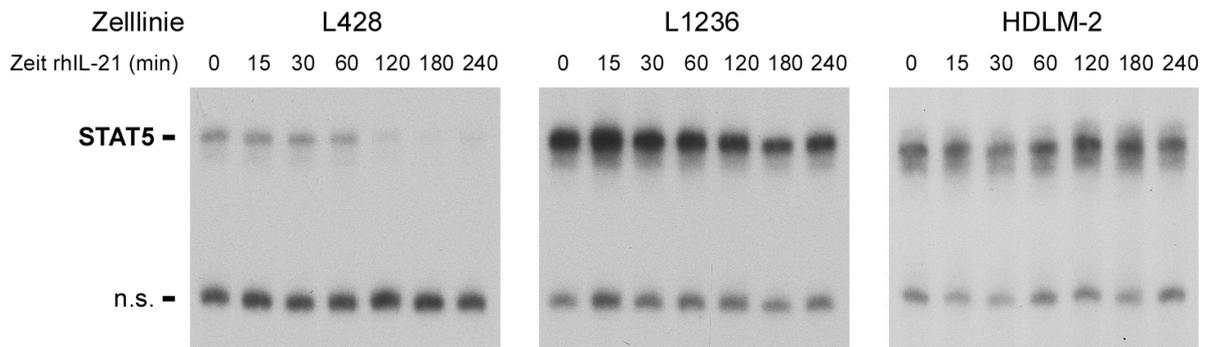


Abbildung 3.6: STAT5 Bindungsaktivität nach IL-21 Stimulation. Die Bestimmung der DNA Bindungsaktivität von STAT5 in den HRS Zelllinien L428, L1236 und HDLM-2 erfolgte mittels EMSA mit den Gesamtextrakten der Experimente in **Abb. 3.5**. 5 µg Gesamtproteinextrakt wurden zusammen mit einem radioaktiv markierten DNA Oligomer, welches die STAT5 Bindungsstelle enthält, auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und DNA-Protein Komplexe autoradiographisch sichtbar gemacht. n.s. – nicht spezifisch

Hier ergibt sich ein divergentes Bild zwischen den einzelnen Zelllinien. Während die DNA Bindungsaktivität von STAT5 in den L428 Zellen kontinuierlich über den gesamten Zeitraum abnimmt, steigt sie in den L1236 Zellen zunächst sehr schnell (15 min) an, um dann nach 180 min wieder auf das Ausgangsniveau abzusinken. In den HDLM-2 Zellen steigt die Aktivität nach 120 min leicht an und bleibt dann auf diesem Niveau (**Abb. 3.6**).

Die Analyse der IL-21 Stimulation hinsichtlich der STAT3 Proteine ergab eine robuste STAT3 Aktivierung. Dies konnte sowohl über die Phosphorylierung (**Abb. 3.7a**) als auch durch eine erhöhte DNA Bindungsaktivität (**Abb. 3.7b**) von STAT3 nach 15 min rhIL-21 Stimulation in allen drei untersuchten HRS Zelllinien gezeigt werden. Im Verlauf der Kinetik nahm die Aktivierung von STAT3 kontinuierlich ab und lag nach 240 min nur geringfügig über dem Ausgangsniveau (**Abb. 3.7a und b**).

Ergebnisse

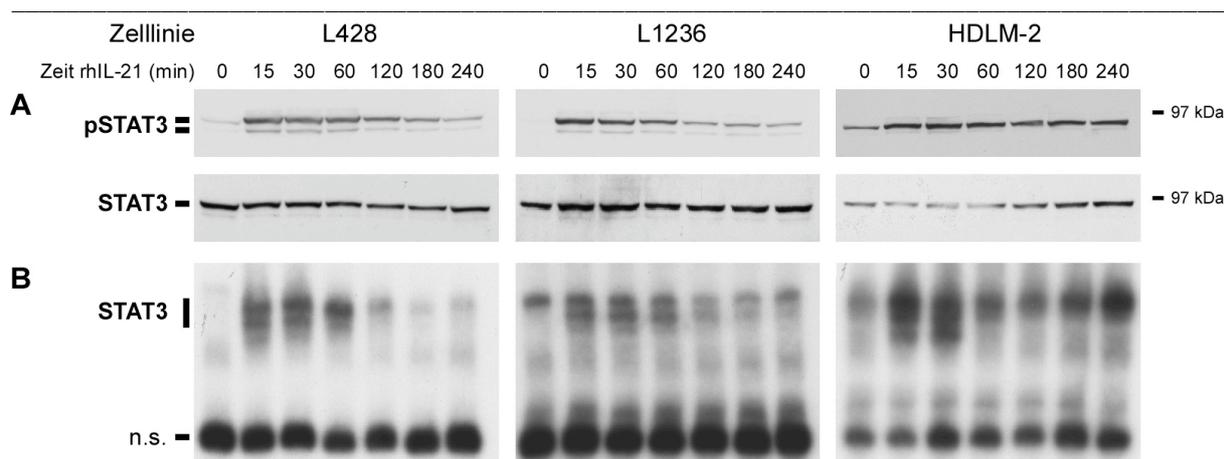


Abbildung 3.7: Kinetik der STAT3 Aktivierung in HRS Zellen nach IL-21 Stimulation. Für diese Versuche wurden die Gesamtextrakte der in **Abb. 3.5** beschriebenen Kinetik genutzt. **(A)** Die Phosphorylierung von STAT3 Proteinen nach IL-21 Stimulation wurde mittels Western Blot mit 30 μ g Gesamtprotein untersucht. Die Membran wurde dabei mit einem spezifischen Antikörper gegen pSTAT3 in einem Immunoblot gefärbt. Die Analyse der gleichen Membran mit einem Antikörper gegen STAT3 diente als Kontrolle. **(B)** Die DNA Bindungsaktivität von STAT3 wurde mittels EMSA analysiert. Dazu wurden 5 μ g Gesamtprotein mit einem radioaktiv markierten DNA Oligomer, welches die Bindungsstelle von STAT3 enthält, elektrophoretisch aufgetrennt und DNA-Protein Komplexe autoradiographisch sichtbar gemacht. n.s. – nicht spezifisch

In einer Stimulation mit verschiedenen Mengen rhIL-21 wurde getestet, ob diese Stimulation des STAT3 Signalweges nicht nur zeit-, sondern auch konzentrationsabhängig ist. Mit zunehmender Konzentration von rhIL-21 steigt die Aktivierung von STAT3 nach 15 min deutlich an (**Abb. 3.8**).

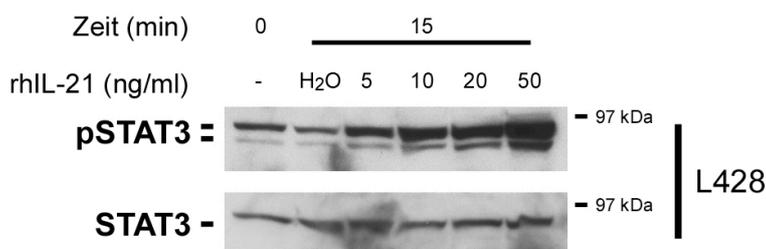


Abbildung 3.8: Aktivierung von STAT3 durch IL-21 ist konzentrationsabhängig. L428 Zellen sind mit 5, 10, 20 und 50 ng/ml rhIL-21 für 15 min stimuliert worden. Anschließend wurden 30 μ g des Proteingestamtextrakts mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper der Anteil an pSTAT3 detektiert. Die Stimulation mit H₂O und die Färbung der Membran mit einem Antikörper gegen das gesamte STAT3 Protein dienten als Kontrolle.

Die Stimulationsversuche mit rhIL-21 zeigten für die Signalwege p44/p42 und STAT5 inkonsistente Daten. Für STAT3 konnte jedoch eine robuste Aktivierung des STAT3 Signalweges in den HRS Zelllinien demonstriert werden. Durch die gleichzeitige Expression von IL-21 und IL-21R wurde eine potentiell autokrine Aktivierungsschleife

Ergebnisse

vermutet und es erfolgte die Analyse unstimulierter Zellen hinsichtlich des Phosphorylierungsstatus von STAT3. Dazu wurden die HRS Linien mit prä-B-Zell Leukämie und Non-Hodgkin B-Zell-Lymphomzelllinien hinsichtlich der Phosphorylierung ihrer STAT3 Proteine untersucht (**Abb.3.9**). Im Vergleich zu den Non-Hodgkin Zellen zeigt sich in allen HRS Zelllinien ein erhöhtes pSTAT3 Niveau. In den L428 und L1236 Zelllinien fällt die Aktivierung von STAT3 nur sehr gering aus, in den KM-H2 Zellen ist sie ein wenig deutlicher und eine besonders robuste konstitutive Phosphorylierung von STAT3 ist in den Zelllinien L591, HDLM-2, L540 und L540Cy zu identifizieren.

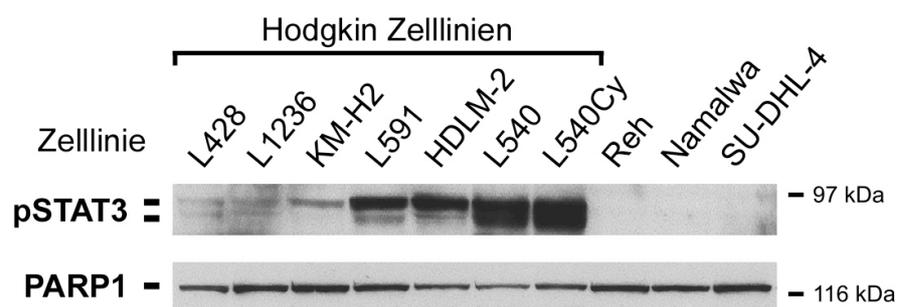


Abbildung 3.9: STAT3 ist in den HRS Zellen konstitutiv aktiviert. 10 µg Kernproteinextrakt von unstimulierten HRS Zellen (L1428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy) und unstimulierten Non-Hodgkin Zelllinien (Reh, Namalwa, SU-DHL-4) wurden mittels Western Blot und einem Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper gegen pSTAT3 hinsichtlich der Phosphorylierung von STAT3 untersucht. Die Färbung der Membran mit einem Antikörper gegen das Kernprotein PARP1 diente dabei als Ladekontrolle.

In allen vier HRS Zelllinien, die sowohl IL-21 als auch IL-21R exprimieren (KM-H2, L591, L540 und L540Cy), ist ein erhöhtes pSTAT3 Niveau festzustellen. Zusätzlich hat auch die HDLM-2 Zelllinie einen ähnlich hohen Phosphorylierungsstatus von STAT3, was durch bereits bekannte Mutationen in SOCS Proteinen und JAK2 Amplifikationen begründet sein kann [166,201].

Ein weiterer Ansatz die Beziehung zwischen IL-21 und der STAT3 Aktivierung darzustellen ist die Blockade von IL-21 mit einem inhibitorischen Fusionsprotein, welches aus einem Teil der IL-21R Kette (AS 20 – 236) und einer unspezifischen humanen IgG1 Kette (AS 100 - 300) besteht (IL-21R:Fc). In Stimulationsexperimenten mit L428 Zellen zeigte sich eine spezifische Inhibition der rhIL-21 induzierten Aktivierung von STAT3 durch IL-21R:Fc (**Abb. 3.10a**).

Ergebnisse

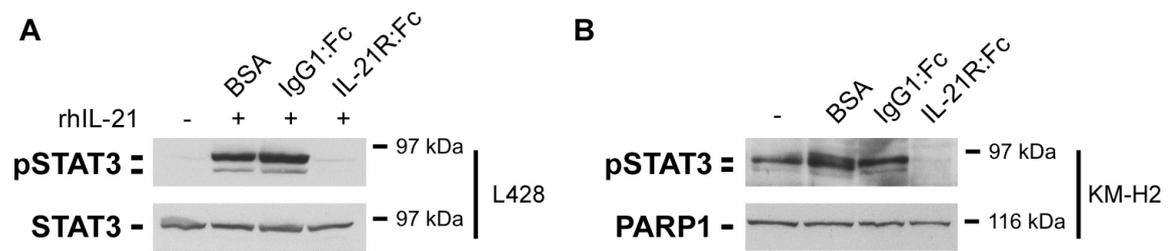


Abbildung 3.10: IL-21R:Fc inhibiert IL-21 induzierte Phosphorylierung von STAT3. **(A)** Die Western Blot Experimente wurden mit 30 μg Gesamtprotein von L428 Zellen, die mit 20 ng/ml IL-21 (vorinkubiert mit BSA, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des Kontrollkonstrukts IgG1:Fc bzw. IL-21R:Fc) für 15 min stimuliert worden sind, durchgeführt. Der Immunoblot erfolgte mit einem Antikörper gegen pSTAT3. Die Analyse von STAT3 diente als Kontrolle. **(B)** Die Western Blot Analyse erfolgte mit 10 μg Kernextrakten aus KM-H2 Zellen, die mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG1:Fc bzw. IL-21R:Fc für 6 h inkubiert wurden. In Immunoblot Experimenten wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT3 bzw. PARP1 als Kontrolle inkubiert.

Nachdem die Wirksamkeit des IL-21R:Fc Konstruktes gezeigt wurde, ist es eingesetzt worden, um den Einfluss einer Inhibition von IL-21 auf die konstitutive Phosphorylierung von STAT3 in KM-H2 Zellen zu bestimmen. Mit dem IL-21R:Fc Konstrukt konnte die konstitutive Phosphorylierung in den KM-H2 HRS Zellen deutlich reduziert werden (**Abb. 3.10b**).

Durch die Stimulations- und Inhibitionsexperimente wird deutlich, dass IL-21 zur STAT3 Aktivierung im Hodgkin Lymphom beiträgt.

3.1.3 IL-21 aktiviert STAT3 Zielgene in HRS Zellen

Die Aktivierung von STAT3 ließ vermuten, dass dieser Signalweg auch zur Aktivierung von STAT3 Zielgenen führt. Nach der Stimulation von L428, L1236 und HDLM-2 Zellen mit rhIL-21 (**Abb. 3.11a**) ist daher die Aktivierung von STAT3 Zielgenen mittels RT-PCR untersucht worden. Die Zielgene *MCL-1* und *IL-6* wurden durch eine Literaturrecherche identifiziert [202]. Diese Gene werden im Hodgkin Lymphom nach IL-21 Stimulation hochreguliert (**Abb. 3.11b**). Bei dem anti-apoptotischen Gen *MCL-1* gibt es eine lange und eine kurze Isoform, nach IL-21 Stimulation wird die kurze Variante stärker hochreguliert. Das Auftreten einer Doppelbande bei der *IL-6* Expression nach IL-21 Stimulation ist dagegen unklar (**Abb. 3.11b**), die Sequenzierung der Banden ergab jeweils *IL-6*.

Ergebnisse

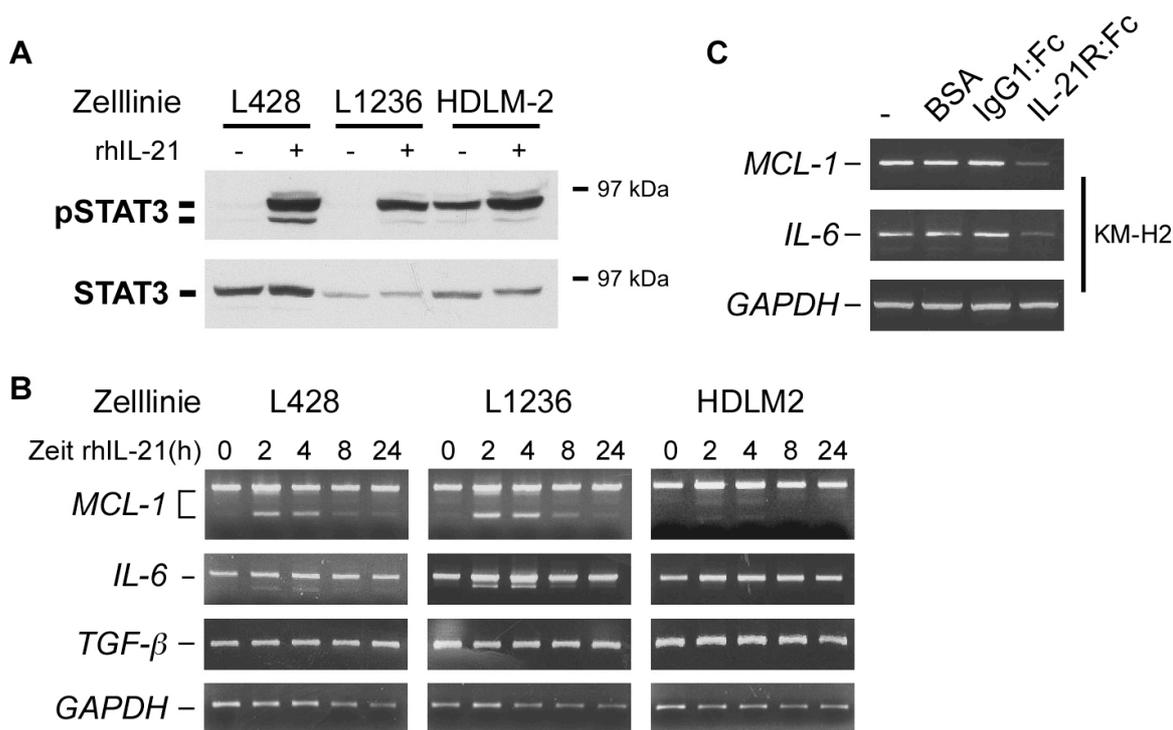


Abbildung 3.11: IL-21 aktiviert die STAT3 Zielgene *MCL-1* und *IL-6*. **(A)** Western Blot Kontrolle der STAT3 Aktivierung durch die IL-21 Stimulation der HRS Zelllinien L428, L1236 und HDLM-2. Dafür wurden die Zellen mit 100 ng/ml rh IL-21 für 15 min stimuliert und anschließend Gesamtprotein extrahiert. 30 µg des Proteingestamtexttraktes wurden anschließend in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Immunoblot die Phosphorylierung von STAT3 mit pSTAT3 spezifischen Antikörpern untersucht. Die Färbung der Membran mit einem STAT3 spezifischen Antikörper diente als Kontrolle. **(B)** RT-PCR Analyse der STAT3 Zielgene *MCL-1* und *IL-6* nach Stimulation der HRS Zelllinien L428, L1236 und HDLM-2. Nach 0, 2, 4, 8 und 24 h Stimulation der Zellen mit 100ng/ml rhIL-21 wurde jeweils die cDNA synthetisiert. Die Analyse der *TGF-β* und *GAPDH* mRNA Expression diente als Kontrolle. **(C)** RT-PCR von *MCL-1* und *IL-6* in IL-21R:Fc behandelten KM-H2 Zellen. Die cDNA Synthese erfolgte nach 6 h Inkubation der KM-H2 Zellen mit IL-21R:Fc bzw. BSA oder IgG1:Fc (s. **Abb. 3.10**). Die Analyse von *GAPDH* diente als Kontrolle. Die Reduktion der konstitutiven STAT3 Aktivierung durch IL-21R:Fc ist in **Abb. 3.10b** dargestellt.

Die beiden STAT3 Zielgene *MCL1* und *IL-6* sind auch in KM-H2 Zellen analysiert worden, deren konstitutiv aktiviertes STAT3 zuvor mit IL-21R:Fc inhibiert wurde (s. **Abb. 3.11c**). Die Expression von *IL-6* und *MCL-1* wurde durch die Blockade von IL-21 verringert. In der Zelllinie KM-H2 wird nur die lange Isoform von *MCL-1* exprimiert und in diesen Experimenten negativ reguliert (**Abb. 3.11c**).

Die Stimulation der Expression von *IL-6* durch IL-21 wurde mittels ELISA auch auf Proteinebene untersucht. In den HRS Zelllinien, die IL-21 nicht exprimieren (L428, L1236 und HDLM-2), konnte ein deutlicher Anstieg der *IL-6* Proteinmenge im Überstand der mit rhIL-21 stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen festgestellt werden.

Ergebnisse

In KM-H2 Zellen, die IL-21 selber produzieren, konnte die IL-6 Produktion nicht durch zusätzliches rhIL-21 verstärkt werden (**Abb. 3.12a**).

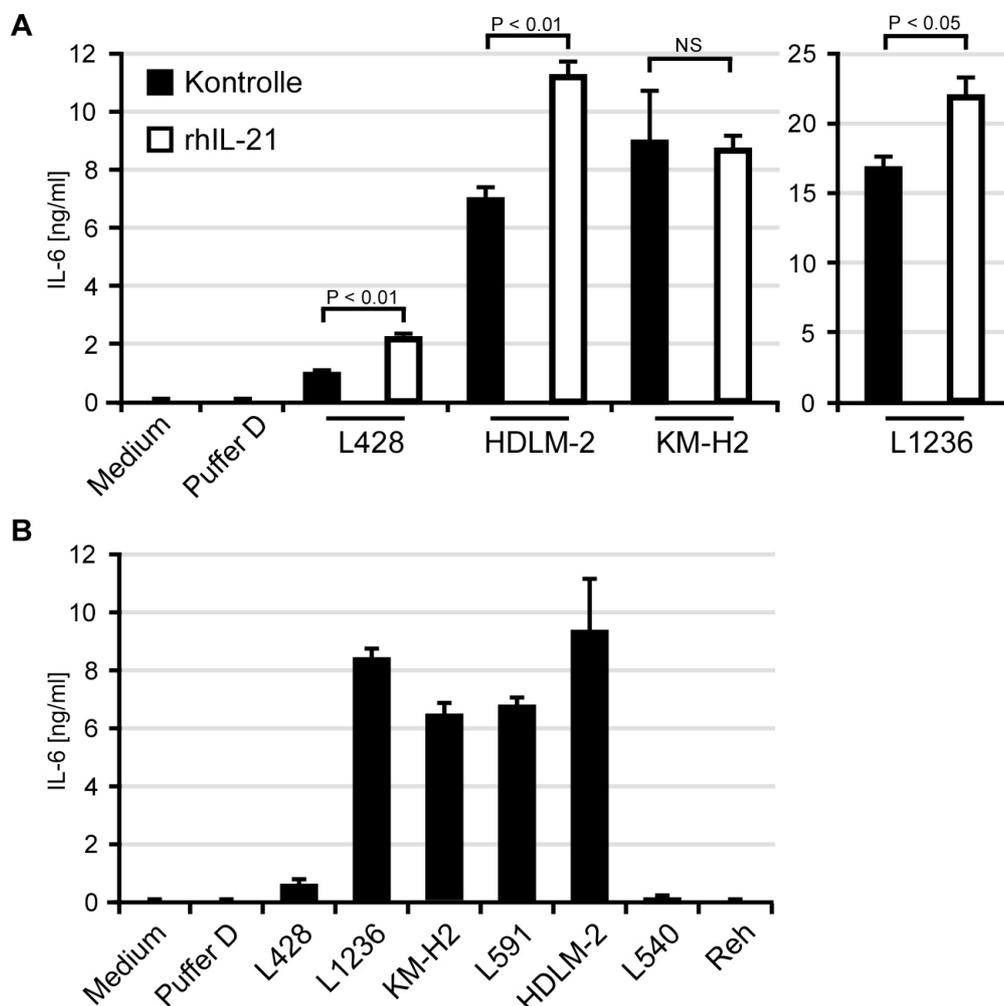


Abbildung 3.12: IL-6 wird nach IL-21 Stimulation von HRS Zellen verstärkt sezerniert. **(A)** Für die Analyse der IL-6 Sekretion die HRS Zelllinien (L428, L1236, KM-H2 und HDLM-2) mit 100 ng/ml rhIL-21 stimuliert. Diese Stimulation ist nach 8 h und 16 h wiederholt worden. Nach 24 h sind die IL-6 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen worden. Als Kontrolle wurden die Zellen jeweils mit dem gleichen Volumen H₂O (Kontrolle) stimuliert. **(B)** Die Bestimmung der IL-6 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen von unstimulierten HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540) und prä-B-Zell Leukämie (Reh) Zelllinien erfolgte mittels IL-6-spezifischen ELISA durchgeführt. Medium und Verdünnungspuffer für die Standardansätze (Puffer D) dienten jeweils als Kontrolle. Die Standardabweichung wurde aus Duplikaten errechnet, es ist jeweils ein repräsentatives von drei Experimenten gezeigt. Statistische Analysen wurden mit dem Zweistichproben t-Test gleicher Varianzen durchgeführt. NS – nicht signifikant

In einem IL-6-spezifischen ELISA mit unstimulierten Zelllinien konnte die konstitutive Sekretion von IL-6 durch HRS Zellen gezeigt werden (**Abb. 3.12b**). Die Daten korrelieren mit bereits bekannten Expressionsdaten zu IL-6 im Hodgkin Lymphom aus der Literatur [203]. Eine Beteiligung von IL-21 an der IL-6 Expression konnte in den Stimulationsversuchen mit rhIL-21 nachgewiesen werden.

Ergebnisse

In diesem Abschnitt konnte durch Stimulations- und Inhibitionsexperimente eine Beteiligung von IL-21 an der Regulation von STAT3 Zielgenen gezeigt werden. In den folgenden Abschnitten sollen nun die Konsequenzen dieser Regulation dargestellt werden.

3.1.4 IL-21 führt zur Resistenz von HRS Zellen gegenüber CD95 induzierter Apoptose

Aus der Literatur ist bekannt, dass IL-21 unterschiedliche Funktionen erfüllt, auch abhängig von den ko-stimulatorischen Faktoren. Solche Faktoren können zum Beispiel Mitglieder der TNFR Familie sein (CD30, CD40 oder CD95), die auch in HRS Zellen exprimiert sind [162,176,204]. In Stimulationsexperimenten soll gezeigt werden, ob die gleichzeitige Stimulation von IL-21 und CD30 bzw. CD95 eine synergistische Wirkung auf die Aktivierung von STAT3 in HRS Zellen ausübt (s. **Abb. 3.13a**). Für die untersuchten Zelllinien (L428, L1236) war das Ausmaß der Phosphorylierung von STAT3 Proteinen unabhängig davon, ob mit rhIL-21 alleine oder im Zusammenhang mit einem der Moleküle CD95 (stimuliert durch den agonistischen Antikörper CH-11) oder CD30 (stimuliert durch einen aktivierenden CD30 Antikörper) stimuliert wurde (**Abb. 3.13a**). Bei der Analyse von *MCL-1* als STAT3 Zielgen konnte in den L428 Zellen mit den Komponenten rhIL-21, CD30 und CD95 alleine jeweils eine Induktion, vor allem der kurzen Variante von *MCL-1*, detektiert werden. Bei den Kombinationen IL-21/CD30 bzw. IL-21/CD95 konnte jedoch keine synergistische Wirkung erzielt werden (**Abb. 3.13b**). Damit die Analyse dieser Ko-Stimulation nicht auf den STAT3 Signalweg konzentriert ist, wurde die Proliferation der stimulierten Zellen untersucht (**Abb. 3.13c**).

Ergebnisse

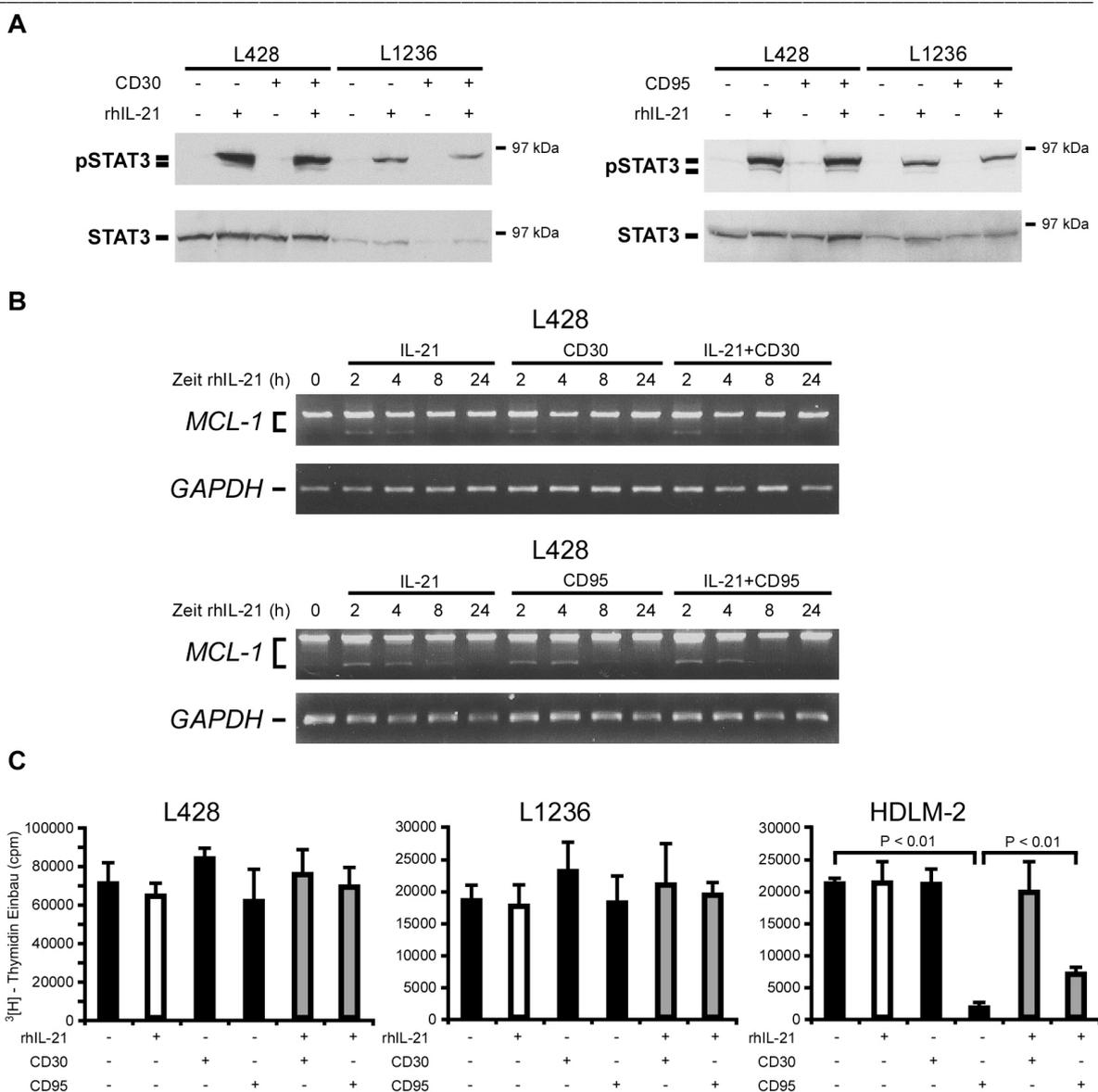


Abbildung 3.13: Ko-Stimulationen mit IL-21 und CD30 bzw. CD95 zeigen keine synergistische Wirkung auf HRS Zellen. Für die Stimulationen wurden die HRS Zelllinien L428 (A, B, C), HDLM-2 (C) und L1236 (A, C) mit 100 ng/ml rhIL-21 allein, 500 ng/ml eines agonistischen Antikörpers gegen CD30 bzw. 100 ng/ml eines agonistischen Antikörpers gegen CD95 (CH-11) allein oder in Kombination mit rhIL-21 inkubiert. **(A)** Nach 15 min der Stimulation wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Immunoblot mit einem pSTAT3 spezifischen Antikörper die Aktivierung von STAT3 untersucht. Die Expression von STAT3 insgesamt diente als Kontrolle. **(B)** Nach 0, 2, 4, 8 und 24 h der Stimulationen von L428 Zellen wurden jeweils cDNA Synthesen durchgeführt und mittels RT-PCR Analysen auf die Expression von *MCL-1* mRNA untersucht. Die *GAPDH* mRNA Expression diente als Kontrolle. **(C)** Nach 48 h Stimulationen wurden die Zellen zusätzlich für 24h mit ^3H -Thymidin inkubiert und anschließend der ^3H -Thymidin –Einbau in neu synthetisierte DNA gemessen. Bemerkenswert ist, dass L428 und L1236 keine signifikanten Unterschiede in der Menge an ^3H -Thymidin Einbau in den verschiedenen Stimulationen zeigen, während die HDLM-2 Zelllinie sensitiv gegenüber CD95 induzierter Apoptose ist. Dieser Effekt in HDLM-2 Zellen ist mit der zusätzlichen Gabe von IL-21 reduzierbar. Statistische Analysen (P) erfolgten mit dem Zweistichproben t-Test gleicher Varianzen. Wenn keine Wahrscheinlichkeiten angegeben sind, waren die Unterschiede nicht signifikant.

Ergebnisse

Die Stimulation mit rhIL-21 allein und mit CD30 bzw. CD95 in Kombination brachte bei den untersuchten HRS Zelllinien L428 und L1236 keine signifikanten Unterschiede zu den unstimulierten Ansätzen. In der HDLM-2 Zelllinie konnte ein Wachstumsarrest bei den CD95 stimulierten HDLM-2 Zellen beobachtet werden, der in der Ko-Stimulation mit rhIL-21 zusammen weniger dramatisch ausfiel (**Abb. 3.13c**).

Diese Beobachtung wurde näher untersucht und es bestätigte sich bei den HDLM-2 Zellen eine, von der CD95 Stimulation konzentrationsabhängige Reduzierung des ^3H -Thymidin Einbaus. Die Reduzierung dieses Effekts mit rhIL-21 war ebenfalls Konzentrationsabhängig (**Abb. 3.14a**).

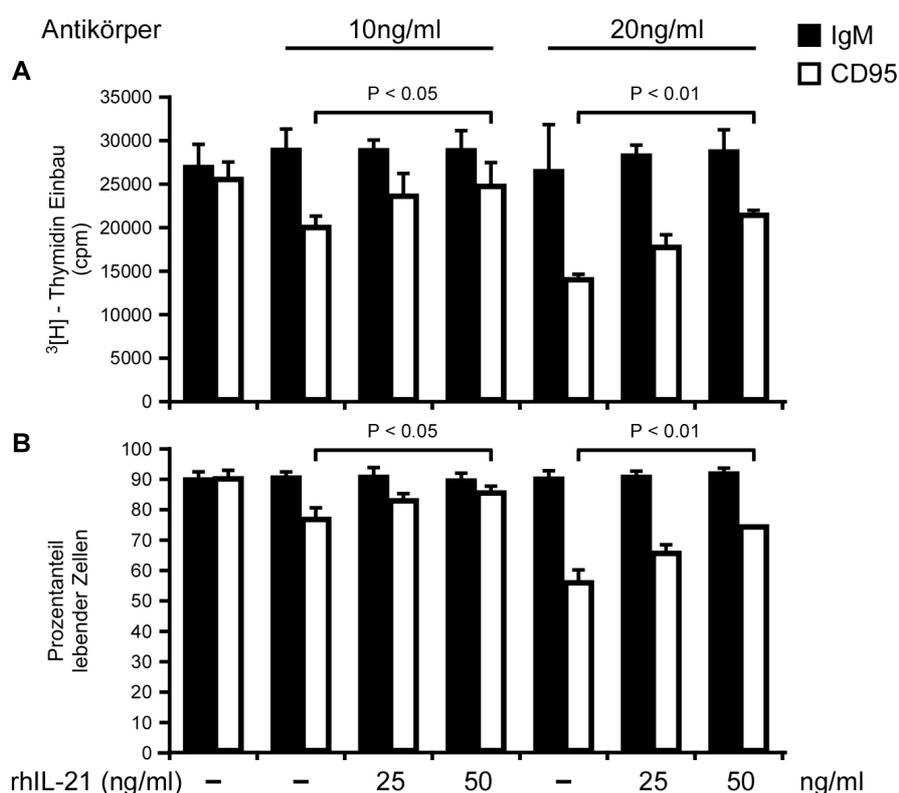


Abbildung 3.14: IL-21 schützt HRS Zellen vor CD95 induzierter Apoptose. Die HRS Zelllinie HDLM-2 ist für 48 h mit den angegeben Mengen des CD95 (CH-11) Antikörpers bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle allein und in Kombination mit 25 bzw. 50 ng/ml rhIL-21 stimuliert worden. **(A)** Nach 24 h der Stimulation mit Antikörpern und rhIL-21 wurden die Zellen zusätzlich mit ^3H -Thymidin inkubiert und nach Beendigung der Stimulation der Einbau von ^3H -Thymidin in neu synthetisierte DNA gemessen. **(B)** Die stimulierten Zellen wurden nach 48 h durchflusscytometrisch auf Annexin V FITC / PI analysiert. Doppelt negative Zellen wurden dabei als lebende Population identifiziert. Es ist jeweils eines von drei Experimenten dargestellt. Alle statistischen Analysen (P) wurden mit einem Zweistichproben t-Test gleicher Varianzen durchgeführt.

Annexin V-FITC/PI Färbungen zeigten, dass durch die CD95 Stimulation mit dem agonistischen Antikörper CH-11 Apoptose in HDLM-2 Zellen induziert werden kann, die

Ergebnisse

mit Zugabe von rhIL-21 weniger stark auftrat (**Abb. 3.14b**). Diese Effekte waren konzentrationsabhängig für CH-11 bzw. rhIL-21. Andere Hodgkin Lymphom Zelllinien waren für diese Analysen nicht zugänglich, da dort eine konstitutive Expression von c-FLIP Proteinen vorliegt, die die Zellen bereits vor CD95 induzierter Apoptose schützt [162].

3.1.5 IL-21 ist an der Regulation des Chemotaxis induzierenden Proteins MIP-3 α beteiligt

Ein weiteres, aus der Literatur bekanntes, Zielgen des IL-21 Signalweges ist MIP-3 α [205]. Die Fokussierung auf dieses Zielgen in den folgenden Untersuchungen beruht auf der Eigenschaft von MIP-3 α , die Migration von T-Zellen zu fördern. Dies ist für das Verständnis der Mechanismen der Entstehung des benignen Umfeldes der HRS Zellen von Bedeutung. In RT-PCR Analysen wurde die Expression von *MIP-3 α* mRNA in den HRS Zelllinien im Vergleich zu verschiedenen Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien untersucht (**Abb. 3.15**). Dabei zeigte sich eine starke Expression in den HRS Zelllinien KM-H2, L591 und L428 sowie in geringerem Ausmaße in den HRS Zelllinien L1236 und HDLM-2. Keine *MIP-3 α* mRNA Expression wiesen die L540 und L540Cy Zelllinien und auch keine der Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien auf (**Abb. 3.15**). Für die Zelllinien KM-H2 und L591 korreliert die *MIP-3 α* Expression mit der gleichzeitigen Expression von IL-21 und IL-21R, was eine Beteiligung von IL-21 an der *MIP-3 α* Regulation vermuten ließ.

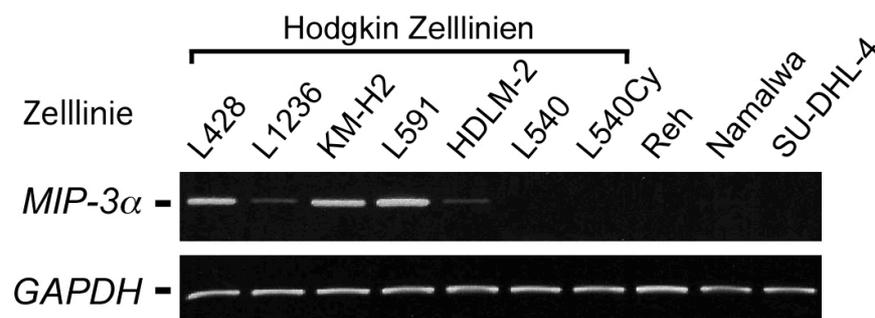


Abbildung 3.15: *MIP-3 α* ist in HRS Zellen exprimiert. Analysen der mRNA Expression von *MIP-3 α* in den HRS Zelllinien (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540, L540Cy), prä-B-Zell Leukämie Zelllinien (Reh) und Non-Hodgkin Lymphom Zelllinien (Namalwa, SU-DHL-4) mittels RT-PCR Analysen. Die Expression von *GAPDH* mRNA wurde als Kontrolle analysiert.

Mit der Blockade von IL-21 durch IL-21R:Fc in KM-H2 Zellen und anschließender RT-PCR wurde die Beteiligung von IL-21 an der Regulation von *MIP-3 α* näher untersucht. Dabei ist eine Reduktion der *MIP-3 α* mRNA festzustellen (**Abb. 3.16**).

Ergebnisse

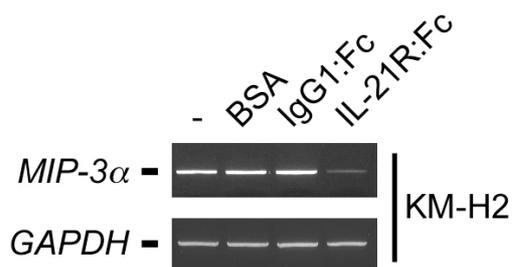


Abbildung 3.16: IL-21 reguliert *MIP-3α* Expression. Die cDNA Synthese wurde mit KM-H2 Zellen durchgeführt, die zuvor für 6 h unbehandelt, mit BSA oder mit 80 $\mu\text{g/ml}$ IL-21R:Fc bzw. der Kontrolle IgG1:Fc behandelt, inkubiert wurden. Mittels RT-PCR Analysen wurde die mRNA Expression von *MIP-3α* bestimmt. Die Analyse der Expression der *GAPDH* mRNA diente als Kontrolle.

Da *MIP-3α* in der Literatur als Chemotaxis induzierendes Protein [205] beschrieben ist, wurde die Sekretion des Proteins durch HRS Zellen in den Überstand mittels ELISA untersucht. In den KM-H2 und L591 HRS Zelllinien konnte dabei eine *MIP-3α* Sekretion identifiziert werden (**Abb. 3.17**).

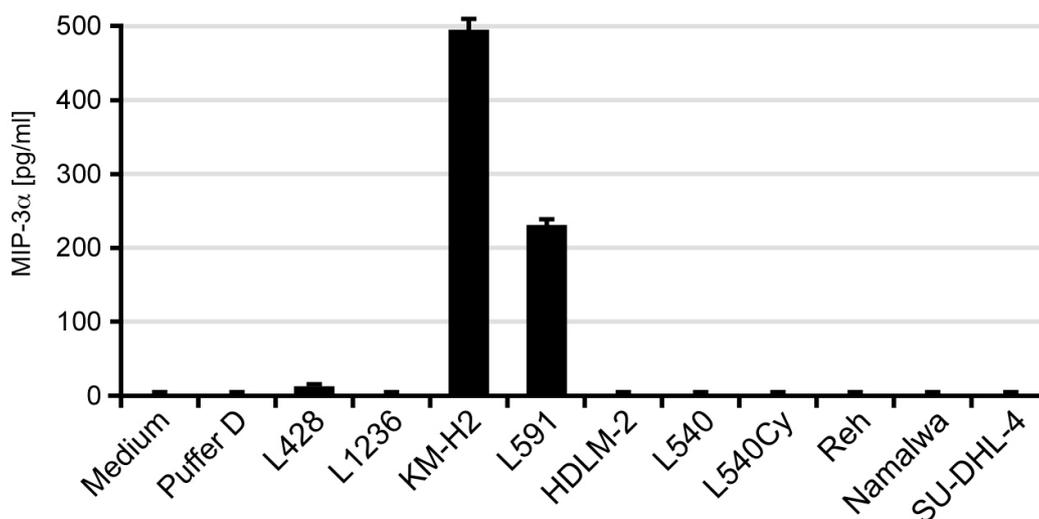


Abbildung 3.17: *MIP-3α* wird von HRS Zellen sezerniert. Die Überstände von HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540, L540Cy), prä-B-Zell Leukämie (Reh) und Non-Hodgkin Lymphom Zelllinien (Namalwa, SU-DHL-4) wurden mittels ELISA auf die *MIP-3α* Protein Sekretion untersucht. Ein repräsentatives von drei Experimenten ist dargestellt, die Standardabweichung wurde aus Duplikaten errechnet. Der Puffer für die Verdünnung der Standardreihe (Puffer D) und Medium dienen dabei als Kontrolle.

Nachdem die Expression von *MIP-3α* in HRS Zellen gezeigt wurde, sollte nun die Funktion dieser Expression näher untersucht werden. Dazu erfolgte zunächst eine Analyse der CC-Chemokin Rezeptor 6 (CCR6) Expression, da CCR6 der korrespondierende Rezeptor zu *MIP-3α* ist und eine autokrine Stimulation der HRS Zellen möglich machen könnte.

Ergebnisse

Durchflusscytometrische Analysen zeigten jedoch, dass die HRS Zellen kein CCR6 exprimieren (**Abb. 3.18**).

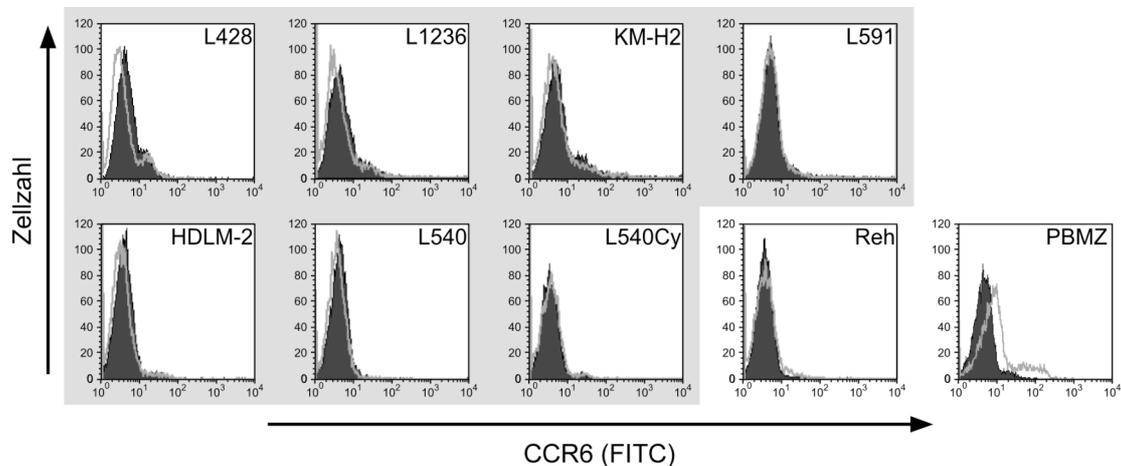


Abbildung 3.18: CCR6 ist nicht in HRS Zellen exprimiert. Durchflusscytometrische Analyse von HRS Zelllinien (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy; grau hinterlegt) sowie einer prä-B-Zell Leukämie Zelllinie (Reh) mit einem spezifischen Antikörper für CCR6 (offener hellgrauer Graph) bzw. dessen Isotypkontrolle (gefüllter, dunkelgrauer Graph). Die Färbung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMZ) diente als Positivkontrolle des Antikörpers.

Die Untersuchung der Funktion von MIP-3 α beschränkte sich aufgrund dieser Tatsache auf die Wirkung des sezernierten Proteins auf das Umfeld der HRS Tumorzellen.

3.1.6 MIP-3 α induziert Chemotaxis von regulatorischen T-Zellen

Wie bereits erwähnt, induziert MIP-3 α hauptsächlich die Chemotaxis von T-Zellen [205]. Daher konzentrierten sich die folgenden Analysen auf die Migrationsinduktion durch MIP-3 α . Im Zusammenhang mit dem Hodgkin Lymphom ist dies ein interessanter Aspekt, da bisher kaum geklärt ist, wie das inflammatorische, benigne Umfeld der HRS Zellen im Tumor, welches ca. 99 % der Tumormasse ausmacht, zustande kommt.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde zunächst mit rhMIP-3 α ein Migrationsassay etabliert. Als Kontrolle ist ein inhibitorischer Antikörper gegen MIP-3 α eingesetzt worden. Es zeigte sich, dass MIP-3 α die Migration von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMZ) induziert und dieser Effekt durch den spezifischen Antikörper gegen MIP-3 α inhibiert werden kann (**Abb. 3.19a**).

Ergebnisse

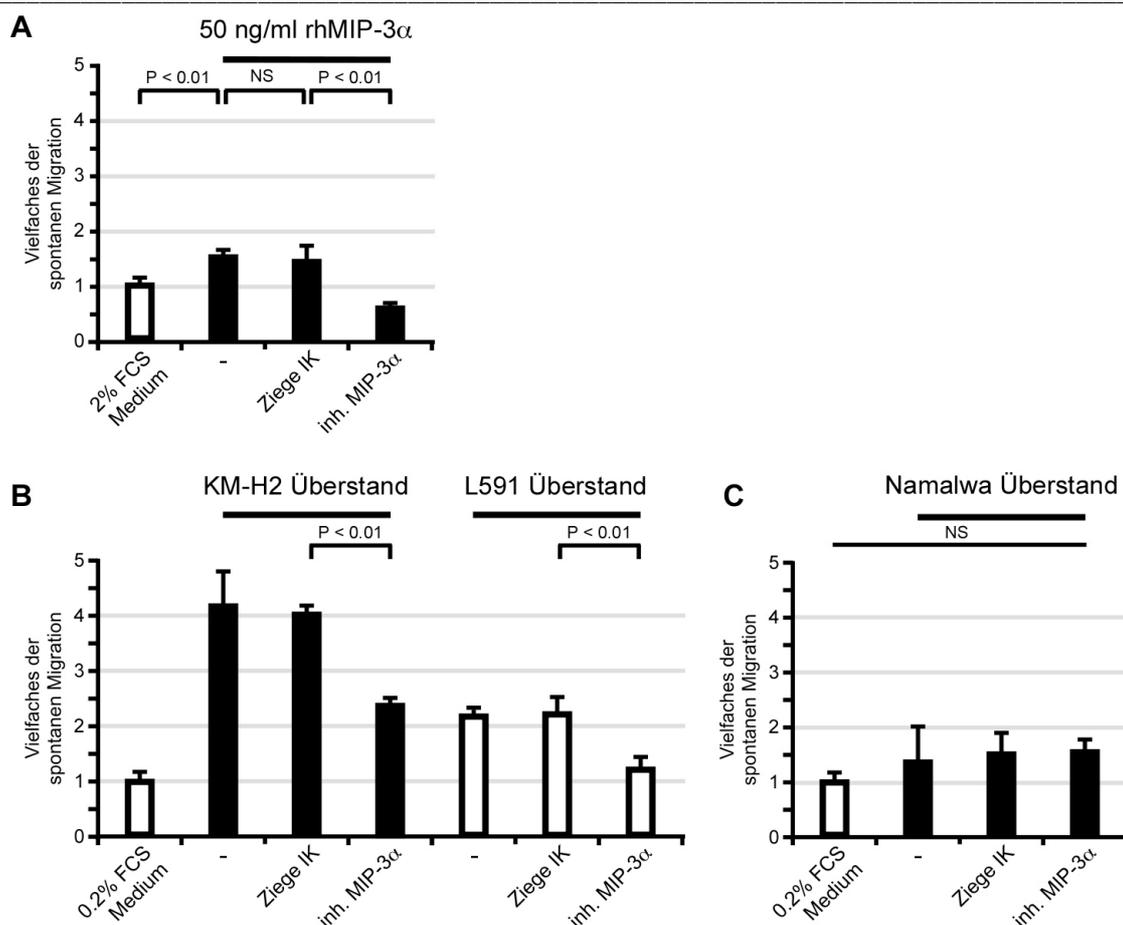


Abbildung 3.19: MIP-3 α induziert Migration von PBMZ. Für diese Migrationsversuche wurden PBMZs von freiwilligen Spendern eingesetzt. Die PBMZs migrierten in Transwells durch eine Membran mit Porendurchmessern von 3 μ m in die Richtung von Medium ohne und mit 50ng/ml rhMIP-3 α (**A**) oder gegen Zellkulturüberstand von HRS (KM-H2, L591) (**B**) und Non-Hodgkin Lymphom Zelllinien (Namalwa) (**C**). Als weitere Kontrolle wurde ein inhibitorischer Antikörper zusätzlich ins Medium bzw. den Zellkulturüberstand gegeben. Ziege Isotypkontrolle (IK) diente als Isotypkontrolle dieses Antikörpers. Alle Werte wurden auf die Spontanmigration der Zellen gegen Medium ohne alles bezogen. Die Standardabweichungen wurden aus den Triplikaten errechnet. Jeweils ein repräsentatives von drei Experimenten ist dargestellt. Die statistischen Analysen (P) wurden mit einem Zweistichproben t-Test gleicher Varianzen durchgeführt. NS – nicht signifikant

Anschließend wurde der Zellkulturüberstand von KM-H2 und L591 Zellen für die Migrationsanalyse genutzt und als Kontrolle ebenfalls der inhibitorische Antikörper gegen MIP-3 α eingesetzt. Es zeigte sich eine starke Induktion der Migration im Vergleich zur Spontanmigration gegen Medium. Die Migration konnte bei beiden Zelllinienüberständen durch den inhibitorischen Antikörper gegen MIP-3 α reduziert werden (**Abb. 3.19b**). Die Induktion der Migration durch HRS Zelllinienüberstand fiel deutlich höher aus als mit rhMIP-3 α , was durch die Tatsache begründet sein könnte, dass HRS Zellen auch andere Chemokine sezernieren. Die signifikante Reduktion durch den inhibitorischen Antikörper zeigt, dass MIP-3 α einen Anteil an der Migration hat. Ein weiterer Grund für die

Ergebnisse

Unterschiede zu den Versuchen mit rhMIP-3 α sind eventuelle Modifikationen des endogenen MIP-3 α oder die Abwesenheit von Ko-Stimulatoren in dem rhMIP-3 α Ansatz. Als Kontrolle wurden die Migrationsexperimente auch mit Überstand der Non-Hodgkin Lymphomzelllinie Namalwa durchgeführt, die kein MIP-3 α exprimiert. Hier zeigte sich nur eine sehr geringe, nicht signifikante, Induktion der Migration, die nicht durch den inhibitorischen MIP-3 α Antikörper beeinflusst wurde (**Abb. 3.19c**).

Eine weitere Kontrolle des spezifischen Effekts von MIP-3 α auf die Migration von PBMZs wurde mit der Analyse des Phänotyps der migrierten Zellen durchgeführt. Der korrespondierende Rezeptor für MIP-3 α ist CCR6. Für die Untersuchung sind die migrierten Zellen (**Abb. 3.20a**) in einer durchflusscytometrischen Analyse auf die Oberflächenexpression von CCR6 im Vergleich zu nicht migrierten, aber in KM-H2 Überstand inkubierten, PBMZ analysiert worden. Es zeigte sich, dass nahezu alle migrierten Zellen CCR6 positiv waren (**Abb. 3.20b**).

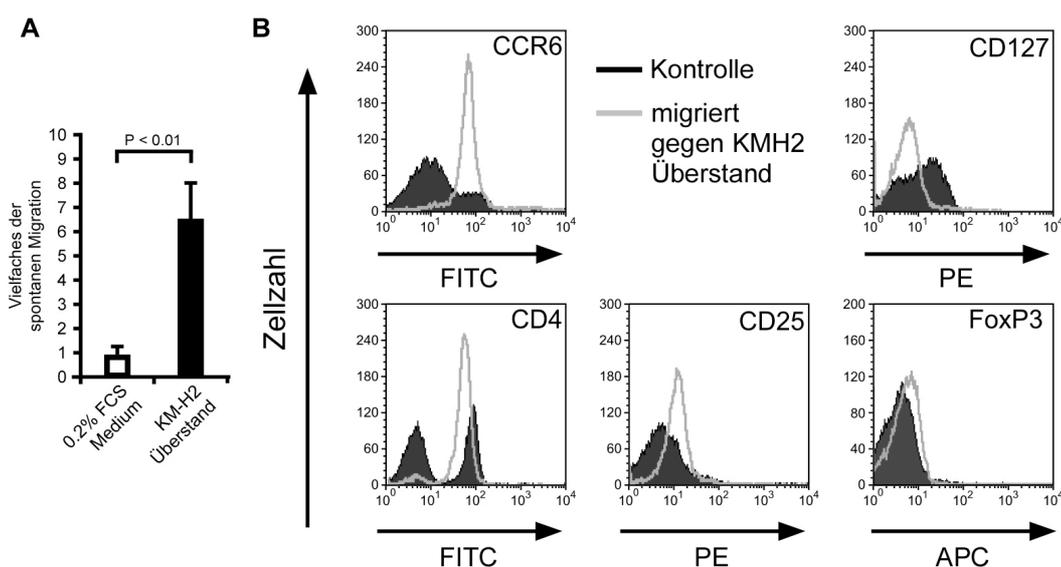


Abbildung 3.20: Zellkulturüberstand der HRS Zelllinie KM-H2 induziert Migration von regulatorischen T-Zellen. **(A)** Kontrolle der gesteigerten Migration in Richtung des KM-H2 Zellkulturüberstandes im Vergleich zur Spontanmigration in Richtung Medium. Die Triplikate wurden jeweils gemittelt und als ein Vielfaches auf den Wert der Spontanmigration bezogen. Die statistischen Analysen (P) wurden mit einem Zweistichproben t-Test mit gleichen Varianzen durchgeführt. **(B)** PBMZ, die in Richtung des KM-H2 Überstand migriert sind, wurden gesammelt und durchflusscytometrisch auf verschiedene Zelloberflächen- und intrazelluläre Marker von T_{Reg} Zellen untersucht. Der graue offene Graph stellt dabei die jeweilige Expression der migrierten Zellen dar. Der schwarze ausgefüllte Graph zeigt die Expression der Marker auf bzw. in nicht migrierten, während der Dauer der Migration in KM-H2 Überstand inkubierten, PBMZ.

Da im Hodgkin Lymphom die Anwesenheit von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) zwar bekannt [206], deren Ursache aber weitgehend ungeklärt ist, wurden weitere Analysen des Phänotyps mittels Durchflusscytometrie auf weitere Markerproteine

Ergebnisse

von T_{Reg}-Zellen durchgeführt. Die migrierten Zellen waren CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ und CD127^{niedrig} und entsprachen daher dem charakteristischen Phänotyp der regulatorischen T-Zellen (**Abb. 3.20b**). Die Färbung des FoxP3 Proteins fiel dabei schwach, jedoch reproduzierbar positiv aus.

3.1.7 IL-21 und MIP-3 α Expression in primären Lymphomen

Die Expressionsanalyse der Proteine IL-21 und MIP-3 α in primären Lymphomfällen wurden von den Pathologen Ioannis Anagnostopoulos und Korinna Jöhrens vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin (UKBF) der Charité Berlin mittels immunhistochemischer Färbungen durchgeführt. Für die Analyse von IL-21 sind verschiedene B-Zell Lymphome (10 klassische Hodgkin Lymphome, 10 B-Zell chronisch lymphatische Leukämien, 6 Mantelzell Lymphome, 10 folliculäre Lymphome und 2 Burkitt Lymphome) untersucht worden (s. **Tab. 3.1**). Dabei waren 9 von 10 Hodgkin Fällen positiv für aberrant exprimiertes IL-21. In den 42 Proben von anderen Entitäten wurde in drei Fällen eine Expression von IL-21 detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die IL-21 Expression in den untersuchten B-Zell Lymphomen und - Leukämien nahezu auf das Hodgkin Lymphom beschränkt ist (**Abb. 3.21** und **Tab. 3.1**).

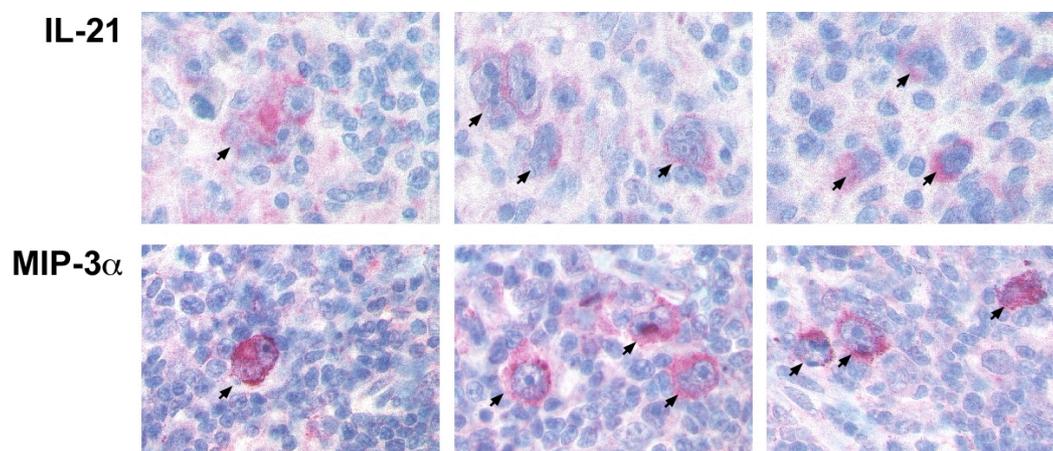


Abbildung 3.21: IL-21 und MIP-3 α werden in HRS Tumorzellen von Patientenproben exprimiert. Repräsentative immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern spezifisch für IL-21 (oben) und MIP-3 α (unten) in Lymphknoten von Hodgkin Lymphom Patienten. Die Vergrößerung beträgt 110-fach, Pfeile markieren die HRS Zellen.

Für MIP-3 α wurden zehn klassische Hodgkin Fälle gefärbt. Neun von diesen zehn Fällen zeigten eine deutliche MIP-3 α Expression, die unabhängig von dem Epstein-Barr Virus (EBV) Status des jeweiligen Falles war (**Abb. 3.21** und **Tab. 3.1**). Auch diese Daten bestätigten die zuvor gezeigten *in vitro* Daten.

Ergebnisse

Lymphome	Positiv	Negativ
IL-21 Färbung		
Klassisches Hodgkin Lymphom	9*	1
Diffus großzelliges Lymphom	1#	13
B-Zell chronisch lymphatische Leukämie	2#	8
Mantelzell Lymphom	0	6
Follikuläres Lymphom	0	10
Burkitt Lymphom	0	2
MIP-3α Färbung		
Klassisches Hodgkin Lymphom	9‡	1

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbungen für IL-21 und MIP-3 α in verschiedenen Lymphomen. (* in drei Fällen sind weniger als 50 % der HRS Zellen positiv; # mehr als 50 % der Zellen sind positiv, ‡ in vier Fällen sind weniger als 50 % positiv)

Zusammenfassend trägt das Cytokin IL-21 zur Pathogenese des Hodgkin Lymphoms bei. Es reguliert mit STAT3 einen essentiellen Signalweg im Hodgkin Lymphom [174,207] und schützt HRS Zellen möglicherweise auch *in vivo* vor CD95 induzierter Apoptose. Durch die Regulation von MIP-3 α konnte ein indirekter Einfluss von IL-21 auf die Komposition des Tumorumfeldes gezeigt werden. MIP-3 α induziert die Migration von T_{Reg} Zellen und trägt damit wahrscheinlich zu einem immunsuppressiven Umfeld der Tumorzellen bei. In dem folgenden Kapitel werden die funktionellen Konsequenzen und die Ursachen der Expression des B-Zell fremden Cytokin/Rezeptor Systems CSF-1/CSF1R untersucht.

Ergebnisse

3.2 CSF-1/CSF1R

3.2.1 Expression von CSF-1 und CSF1R in HRS Zellen

Die Expressionsdaten von CSF-1 und CSF1R in Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphom Zelllinien wurden zum Teil schon in meiner Diplomarbeit gezeigt. In der Doktorarbeit wird nun das Spektrum der Zelllinien erweitert und durch weitere Experimente ergänzt. In einem RT-PCR Ansatz konnte die mRNA Expression von *CSF-1* in sechs von sieben Hodgkin Lymphom Zelllinien detektiert werden, während die Kontrolllinien anderer B-Zell Lymphome und Leukämien sowie primäre, aufgereinigte B-Zellen negativ waren. Letzteres traf auch auf die mRNA Expression von *CSF1R* zu, während hier alle sieben Hodgkin Lymphom Zelllinien positiv waren (**Abb. 3.22**).

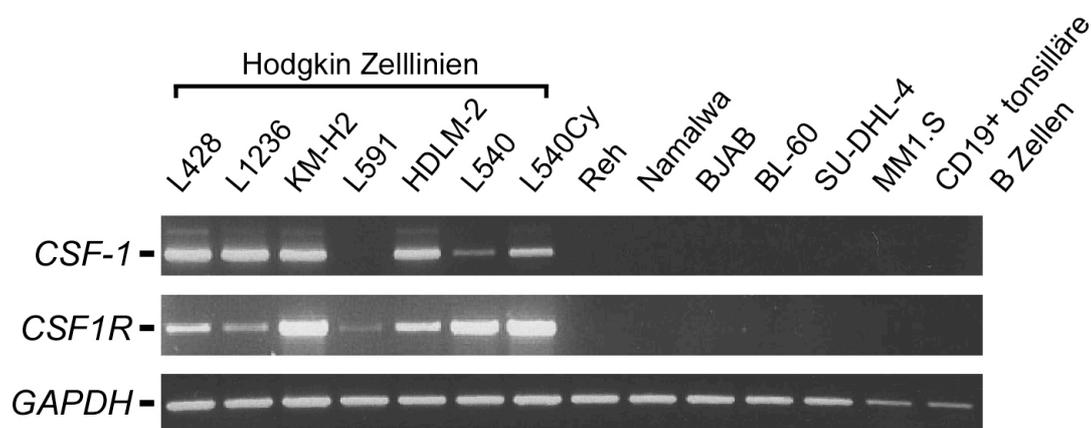


Abbildung 3.22: *CSF-1* und *CSF1R* sind differentiell in HRS Zelllinien exprimiert. Die Expression von *CSF-1* und *CSF1R* mRNA in den HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy), prä-B-Zell Leukämie (Reh), Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien (Namalwa, BJAB, BL-60, SU-DHL-4), Multiplen Myelom (MM1.S) Zelllinien sowie in CD19⁺ primären B-Zellen wurde mittels RT-PCR analysiert. Die Analyse der *GAPDH* Expression diente als Kontrolle.

In einer Northern Blot Analyse konnten diese Daten weitgehend bestätigt werden. Die Expression von *CSF1R* in L428 und L1236 Zellen ist nur sehr schwach und erst bei längerer Belichtung detektierbar. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Expression der verschiedenen Spleißvarianten von *CSF-1* gut zu detektieren ist (**Abb. 3.23**). In den HRS Zelllinien L428 und HDLM-2 sind alle drei Varianten exprimiert, während in den Linien L1236, KMH2, L540 und L540Cy nur die beiden längeren Varianten detektierbar sind. Die L591 und die B- und T-Zell Vergleichslinien sind negativ.

Ergebnisse

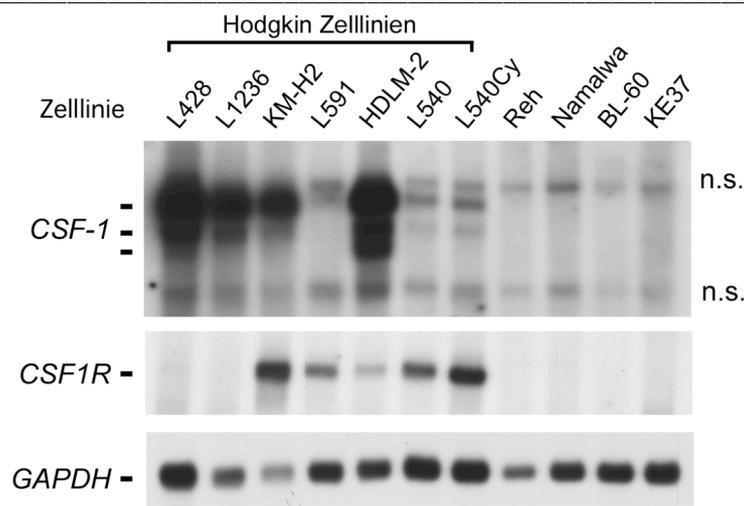


Abbildung 3.23: HRS Zellen exprimieren verschiedene *CSF-1* mRNA Spleißvarianten. In Northern Blot Experimenten mit HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy), prä-B-Zell Leukämie (Reh), Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien (Namalwa, BL-60) und akut lymphoblastische T-Zell Leukämie (KE37) Zelllinien wurde die Expression von *CSF-1* und *CSF1R* mRNA untersucht. Eine *GAPDH* Sonde diente als Kontrolle. (n.s. – nicht spezifisch)

Für die Analyse der Expression auf Proteinebene wurden verschiedene durchflusscytometrische Analysen durchgeführt. In einer intrazellulären Färbung mit fixierten und permeabilisierten Zellen konnte die Expression von CSF-1 Protein gezeigt werden (**Abb. 3.24**) und war konsistent mit den RNA Daten.

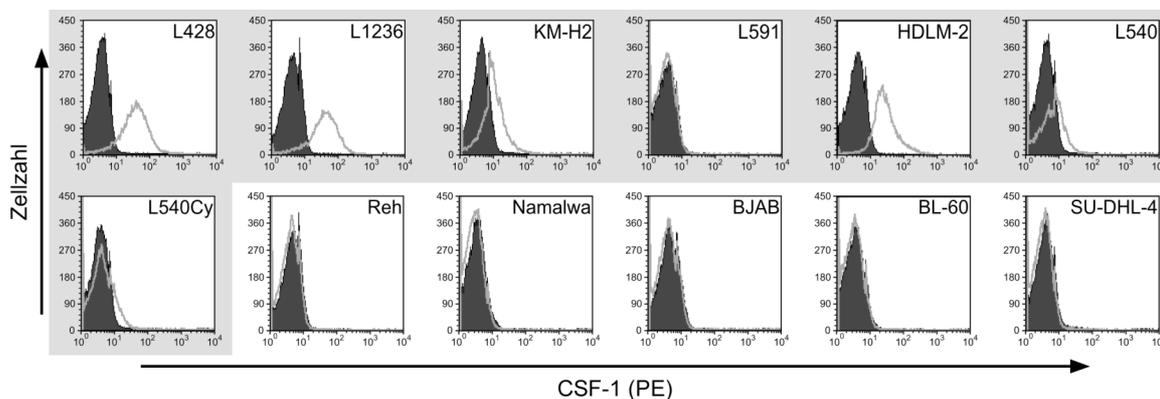


Abbildung 3.24: CSF-1 Protein Expression in HRS Zellen. HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy; grau hinterlegt), prä-B-Zell Leukämie (Reh) und Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien (Namalwa, BJAB, BL-60, SU-DHL-4) wurden zunächst fixiert und permeabilisiert, bevor sie mit einem spezifischen Antikörper gegen CSF-1 (grauer offener Graph) bzw. dessen Isotypkontrolle (schwarzer geschlossener Graph) intrazellulär gefärbt wurden. Anschließend ist eine durchflusscytometrische Analyse der Fluoreszenz der gebundenen Antikörper durchgeführt worden.

Ergebnisse

Da die Northern Blot Analyse die Expression aller drei Spleißvarianten, von denen eine membranständig ist [49], in den HRS Zellen gezeigt hat, sind die gleichen Zelllinien auch mit einem extrazellulären Ansatz untersucht worden (**Abb. 3.25**).

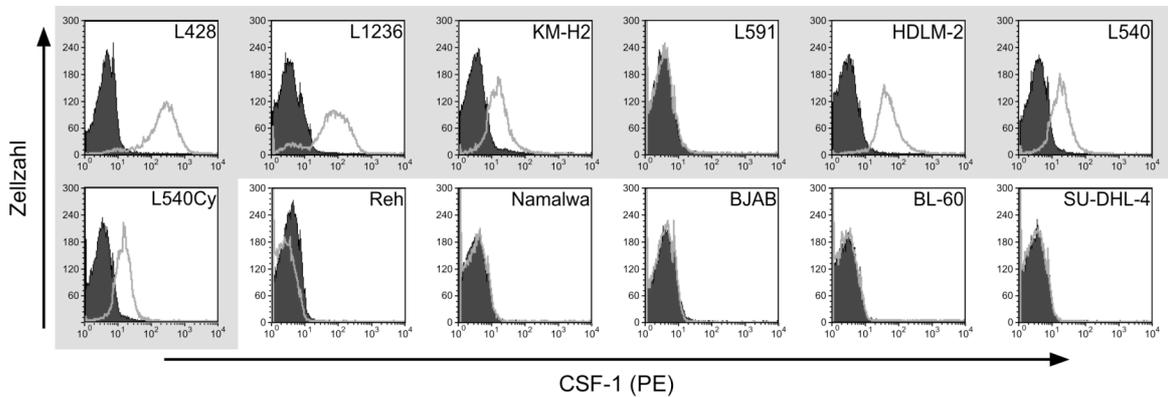


Abbildung 3.25: CSF-1 Protein Expression an der Oberfläche von HRS Zellen. Die HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy; grau hinterlegt), prä-B-Zell Leukämie (Reh) und Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien (Namalwa, BJAB, BL-60, SU-DHL-4) wurden extrazellulär mit einem spezifischen Antikörper gegen CSF-1 (grauer offener Graph) bzw. dessen Isotypkontrolle (schwarzer geschlossener Graph) gefärbt und mittels Durchflusscytometrie analysiert.

Diese Daten zeigen, dass die HRS Zelllinien CSF-1 auch an der Zelloberfläche exprimieren. Im Vergleich zu dem intrazellulären Ansatz sind die Ergebnisse konsistent.

Eine weitere Eigenschaft von CSF-1 ist die Induktion von Migration monozytischer Zellen [49]. Dazu ist es notwendig, dass das Cytokin von den Zellen sezerniert wird. Die Sekretion von CSF-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels ELISA von Zellkulturüberständen der HRS und Non-Hodgkin Lymphom Zelllinien untersucht (**Abb. 3.26**). Mit Ausnahme der L591 Zelllinie, die auch auf mRNA Ebene negativ für CSF-1 ist, und der L540 Zelllinie sezernieren alle HRS Zellen CSF-1. Eine Beurteilung, ob die L540 Zellen kein CSF-1 sezernieren oder nur unterhalb der Sensitivitätsgrenze des ELISA liegen, kann hier nicht erfolgen.

Ergebnisse

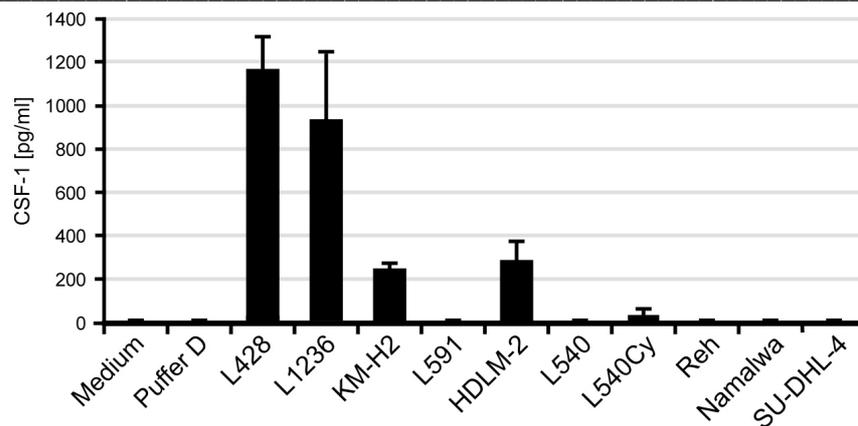


Abbildung 3.26: CSF-1 Protein wird von HRS Zellen sezerniert. Die HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy), prä-B-Zell Leukämie (Reh) und Non-Hodgkin B-Zell Lymphom Zellkulturüberstände (Namalwa, SU-DHL-4) wurden mittels ELISA auf die Sekretion von CSF-1 hin untersucht. Die Standardabweichungen wurden aus Duplikaten errechnet. Es ist ein repräsentatives von drei Experimenten dargestellt.

Zusammenfassend geht aus den Expressionsanalysen hervor, dass die Zelllinien L428, L1236, KM-H2 und HDLM-2 stark CSF-1 exprimierende Zelllinien sind, während L540 und L540Cy eine geringe und L591 keine CSF-1 Expression aufweisen. Insgesamt exprimieren die Hodgkin Lymphom Tumorzellen CSF-1 differentiell im Vergleich zu anderen B-Zelllinien oder CD19⁺ B-Zellen, die das B-linien-fremde Gen *CSF-1* erwartungsgemäß nicht exprimieren.

Neben der potentiellen Wirkung auf andere Zellen durch die Sekretion des CSF-1 Proteins ist auch eine autokrine Wirkung auf die Tumorzellen selber möglich. Dazu ist jedoch die Expression des korrespondierenden Rezeptorproteins CSF1R notwendig. Die CSF1R Expression an der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Abbildung 3.27 zeigt eine deutliche CSF1R Proteinexpression in den HRS Zelllinien KM-H2, L540 und L540Cy und eine schwache Expression in den HRS Zelllinien L428, L1236, L591 und HDLM-2, während die Non-Hodgkin B-Zelllinien keine CSF1R Expression zeigen.

Ergebnisse

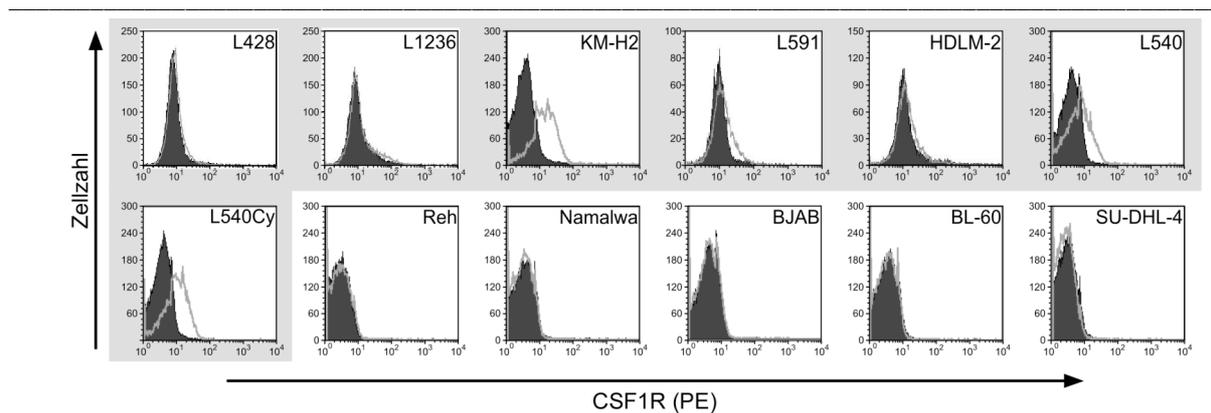


Abbildung 3.27: CSF1R Protein Expression in HRS Zellen. Extrazelluläre Durchflusscytometrie der HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy; grau hinterlegt), prä-B-Zell Leukämie (Reh) und Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien (Namalwa, BJAB, BL-60, SU-DHL-4) mit einem spezifischen Antikörper gegen CSF1R (grauer offener Graph) bzw. dessen Isotypkontrolle (schwarzer geschlossener Graph).

Die schwache Färbung des Rezeptors in den Linien L428 und L1236, die eine mRNA Expression aufweisen, kann durch die Tatsache erklärbar sein, dass beide Zelllinien viel CSF-1 exprimieren und es vermutlich zu einer ständigen Aktivierung und Internalisierung des Rezeptors kommt. Diese Probleme konnten in einem späteren Experiment vermieden werden, in dem zur Kontrolle die Expression von CSF1R Protein mittels eines Immunoblots analysiert wurde. (s. **Abb. 3.30**)

Eine wichtige Überprüfung der Zellliniendaten ist die Analyse der Expressionsdaten in primären Gewebeproben von Hodgkin Lymphom Patienten. Durch das geringe Vorkommen an Tumorzellen im Gewebe eines betroffenen Lymphknotens kann mit diesen Zellen keine funktionelle Analyse durchgeführt werden. In Zusammenarbeit mit dem Labor der Pathologie von Prof. Harald Stein des Charité Universitätsklinikums Benjamin Franklin konnte mit *in situ* Hybridisierungen eine Untersuchung der Expression CSF1R mRNA in den Tumorzellen erfolgen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 3.28** dargestellt. Für CSF1R konnte die mRNA mittels *in situ* Hybridisierung in HRS Tumorzellen detektiert werden.

Ergebnisse

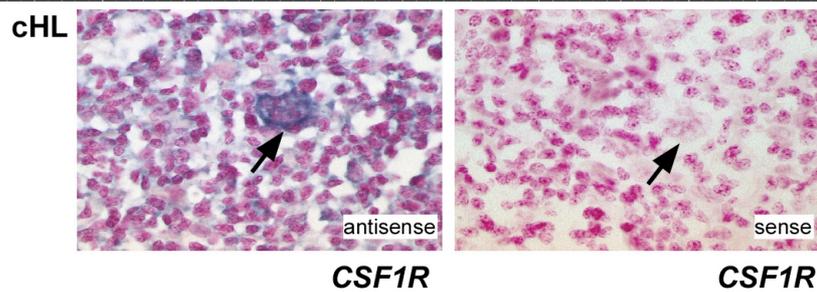


Abbildung 3.28: *CSF1R* mRNA Transkripte sind in den HRS Zellen von betroffenen Lymphknoten von Hodgkin Patienten exprimiert. (**links**) Eine repräsentative *CSF1R in situ* Hybridisierung von insgesamt zehn analysierten Fällen. (**rechts**) Die sense Probe von *CSF1R* wurde als Kontrolle hybridisiert. Pfeile markieren die HRS Tumorzellen.

Für CSF-1 konnte in der Literatur bereits eine Protein Expression in HRS Zellen von Hodgkin Patienten nachgewiesen werden [208].

Zusammenfassend kann sowohl für CSF-1 als auch für CSF1R eine differentielle Expression in den HRS Zellen des Hodgkin Lymphoms festgestellt werden. In den folgenden Abschnitten werden nun die funktionellen Konsequenzen dieser potentiellen autokrinen Schleife untersucht.

3.2.2 Funktionelle Charakterisierung von CSF-1 und CSF1R in HRS Zellen

Die Aktivierung des CSF-1 Rezeptors erfolgt nach der Bindung des Cytokins CSF-1 über eine Autophosphorylierung der verschiedenen intrazellulären Tyrosine [49]. Die Funktionalität des Rezeptors in den HRS Zellen wurde dementsprechend über die Analyse der Phosphorylierung nach Stimulation des CSF1R mit CSF-1 untersucht. Dazu wurde die Methode der Immunopräzipitation gewählt, die bereits in meiner Diplomarbeit etabliert, jedoch nicht zur Analyse der Phosphorylierung genutzt wurde. HRS Zelllinien, die wenig CSF-1 und viel CSF1R exprimieren (L540Cy), sind mit rekombinantem, humanem (rh)CSF-1 stimuliert worden. Anschließend wurde der Phosphorylierungsstatus des CSF1R mittels Immunopräzipitation und Immunoblot untersucht. Der immunpräzipitierte Rezeptor zeigte eine robuste Phosphorylierung nach Stimulation mit rhCSF-1 (**Abb. 3.29**).

Ergebnisse

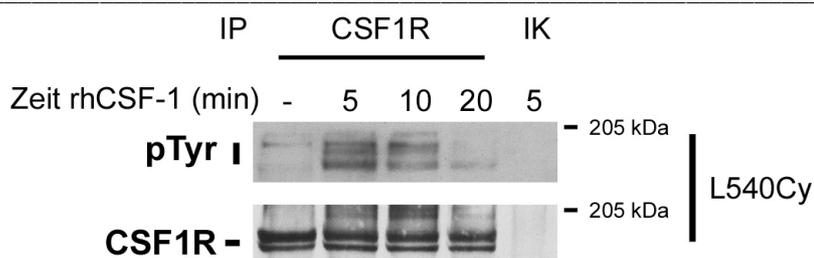


Abbildung 3.29: CSF1R wird in L540Cy HRS Zellen durch rhCSF-1 Stimulation phosphoryliert. L540Cy Zellen wurden mit 100 ng/ml rhCSF-1 für 5, 10 und 20 min stimuliert. Nach der Proteinlyse wurde eine Immunpräzipitation mit einem CSF1R spezifischen Antikörper bzw. dessen Isotypkontrolle (IK) durchgeführt. Das präzipitierte Protein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (pTyr) analysiert. Die Färbung der Membran mit einem CSF1R Antikörper diente als Kontrolle.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob Zellen, die sowohl Rezeptor als auch Cytokin exprimieren, eine konstitutive Aktivierung von Tyrosinresten am CSF1R aufweisen. Dafür wurde die Immunpräzipitation des CSF1R in unstimulierten HRS Zelllinien durchgeführt (**Abb. 3.30**). Das Ergebnis zeigte bei den HRS Zelllinien eine konstitutive Aktivierung von Tyrosinresten des immunpräzipitierte CSF1R. Besonders KM-H2 und L540 Zellen zeigen eine starke Phosphorylierung im Vergleich zu L428, L1236, L591 und HDLM-2, die allerdings auch weniger CSF1R Protein exprimieren.

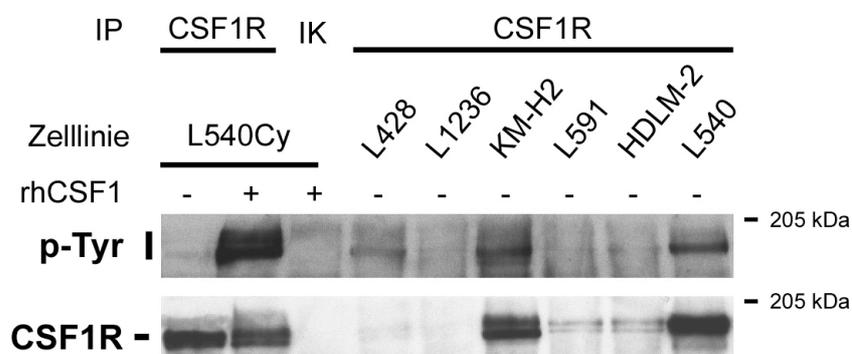


Abbildung 3.30: Der CSF1R ist konstitutiv phosphoryliert in HRS Zelllinien. Für die Immunpräzipitation (s. **Abb. 3.29**) des CSF1R wurde Gesamtprotein von unstimulierten HRS Zelllinien verwendet. Der immunpräzipitierte Rezeptor wurde dann in einer Western Blot Analyse auf die Phosphorylierung des Rezeptors hin untersucht. Die Stimulation von L540Cy Zellen mit rhCSF1 für 5 min wie in **Abb. 3.29**, die Isotypkontrolle (IK) und die Färbung der Membran mit einem Antikörper gegen CSF1R dienen als Kontrolle.

In Proliferationsassays, die ich bereits in meiner Diplomarbeit gezeigt habe, konnte demonstriert werden, dass die Inkubation von L540Cy Zellen mit rhCSF-1 zu einer Stimulation der Proliferation führte. Mit verschiedenen Ansätzen sollte versucht werden, die Interaktion zwischen CSF-1 und CSF1R in HRS Zelllinien, die beides exprimieren, zu

Ergebnisse

unterbrechen und die Konsequenzen daraus zu untersuchen. In meiner Diplomarbeit wurden bereits siRNA gegen CSF-1 und CSF1R sowie inhibitorische Antikörper gegen CSF-1 und CSF1R getestet. Beides zeigte nur geringe Effekte auf das Wachstum der HRS Zellen. In der Doktorarbeit wurden nun zwei weitere Ansätze gewählt, die eine effektive Inhibition der Interaktion zwischen CSF-1 und CSF1R ermöglichen sollten. Als erstes wurde ein chimäres Rezeptormolekül (CSF1R:Fc) eingesetzt, das um die Bindung von CSF-1 kompetiert. Es besteht aus dem CSF-1 bindenden Teil des CSF1R mit einer Domäne des Immunglobulins G (IgG). Die Fähigkeit dieses Konstruktes CSF-1 zu inhibieren wurde mit der anaplastisch großzelligen Lymphomzelllinie (ALCL) DEL getestet, die ebenfalls eine hohe CSF1R Expression aufweisen [209]. DEL Zellen wurden mit rhCSF-1 stimuliert, welches zuvor mit CSF1R:Fc inkubiert wurde. Die Phosphorylierung des CSF1R durch CSF-1 konnte in den DEL Zellen durch CSF1R:Fc inhibiert werden (**Abb. 3.31**), d.h. dass der CSF1R Signalweg mit dem CSF1R:Fc Konstrukt blockiert werden kann.

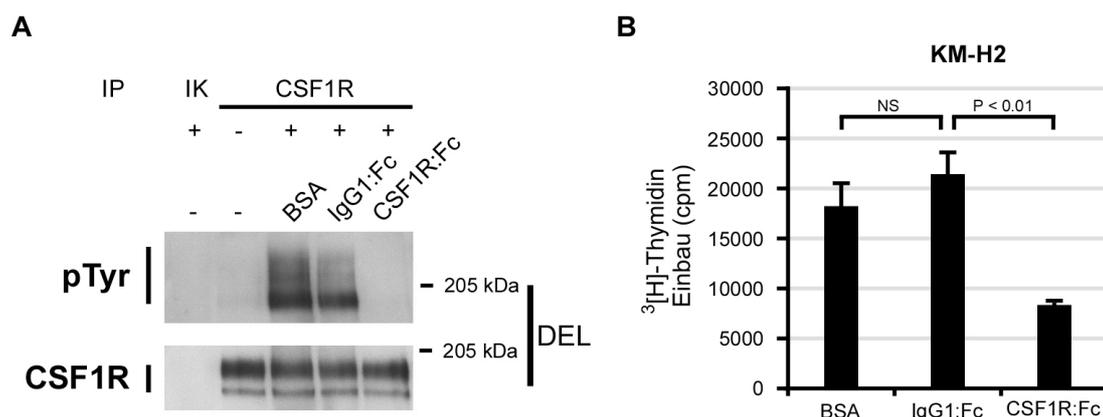


Abbildung 3.31: CSF1R:Fc inhibiert die CSF-1 induzierte Stimulation des CSF1R in DEL Zellen und führt zu einer Reduktion der DNA Synthese in KM-H2 Zellen. **(A)** 100 ng/ml rhCSF-1 wurden 90 min vor der Stimulation mit 80 µg/ml des chimären Rezeptorkonstruktes CSF1R:Fc vorinkubiert. Nach einer 5 min Stimulation der DEL Zellen mit Cytokin allein und in Kombination mit CSF1R:Fc wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mittels CSF1R spezifischen Antikörper bzw. dessen Isotypkontrolle (IK) durchgeführt. Das immunpräzipitierte Protein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Immunoblot mit spezifischem Phosphotyrosin (pTyr) Antikörper analysiert. Die Vorinkubation von rhCSF-1 mit BSA oder IgG1:Fc, unstimulierte DEL Zellen sowie die Färbung der Membran mit spezifischem CSF1R Antikörper dienten als Kontrolle. **(B)** KM-H2 Zellen sind für 48 h mit 80 µg/ml CSF1R:Fc bzw. der Kontrolle IgG1:Fc inkubiert worden. Für die letzten 24 h wurden die Zellen zusätzlich mit ³[H] – Thymidin inkubiert. Nach 48h wurde der Einbau von ³[H] – Thymidin in neu synthetisierte DNA gemessen und im Vergleich zu BSA stimulierten Zellen analysiert. Statistische Analysen wurden mit einem Zweistichproben t-Test gleicher Varianzen durchgeführt. (NS – nicht signifikant)

Nachdem die Wirksamkeit von CSF1R:Fc bei der Blockade der CSF-1 induzierten Aktivierung des CSF1R gezeigt werden konnte, sollten die Konsequenzen einer solchen Blockade bei der autokrinen Stimulation von CSF-1 in HRS Zellen untersucht werden.

Ergebnisse

Dazu wurden HRS Zellen (KM-H2), die sowohl CSF-1 als auch CSF1R exprimieren, mit CSF1R:Fc inkubiert. Das Wachstum der Zellen mit CSF1R:Fc wurde indirekt über den Einbau von radioaktivem Tritium Thymidin in neu synthetisierte DNA untersucht. Dabei konnte eine signifikant geringere DNA Syntheserate der mit CSF1R:Fc inkubierten Zellen festgestellt werden (**Abb. 3.31b**).

Ein zweiter Ansatz, die autokrine Schleife von CSF-1 und CSF1R zu unterbrechen, waren CSF1R inhibierende Moleküle, die von der Firma Cytopia in Australien bereitgestellt wurden [210,211]. Diese Moleküle wurden zunächst in ihrer Fähigkeit, die Aktivierung von CSF1R durch rhCSF1 in HRS Zellen (L540Cy) zu inhibieren, getestet. Alle drei getesteten Moleküle zeigten eine vollständige Inhibition der Phosphorylierung von CSF1R nach Zugabe von rhCSF-1 (**Abb. 3.32a**).

Die CSF1R inhibierenden Moleküle wurden nun mit CSF1R exprimierenden HRS und nicht-exprimierenden Non-Hodgkin Zelllinien inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Annexin V/PI Färbung und durchflusscytometrischer Analyse hinsichtlich der Apoptoserate untersucht. Doppelt negative Zellen wurden dabei als viable Zellen definiert. Die HRS Zellen KM-H2, HDLM-2 und L540 zeigten eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den Non-Hodgkin Zelllinien Reh und Namalwa. Es zeigten sich Unterschiede in der Rate dieser Apoptoseinduktion. Der Effektivste der drei Inhibitoren war das Molekül CYC10268, welches in den L540 Zellen zu einer maximalen Sterberate von fast 100 % führte, während die Moleküle CYC12200 und CYC12752 eine geringere Reduktion der Viabilität der HRS Zelllinien verursachten (**Abb. 3.32b**).

Ergebnisse

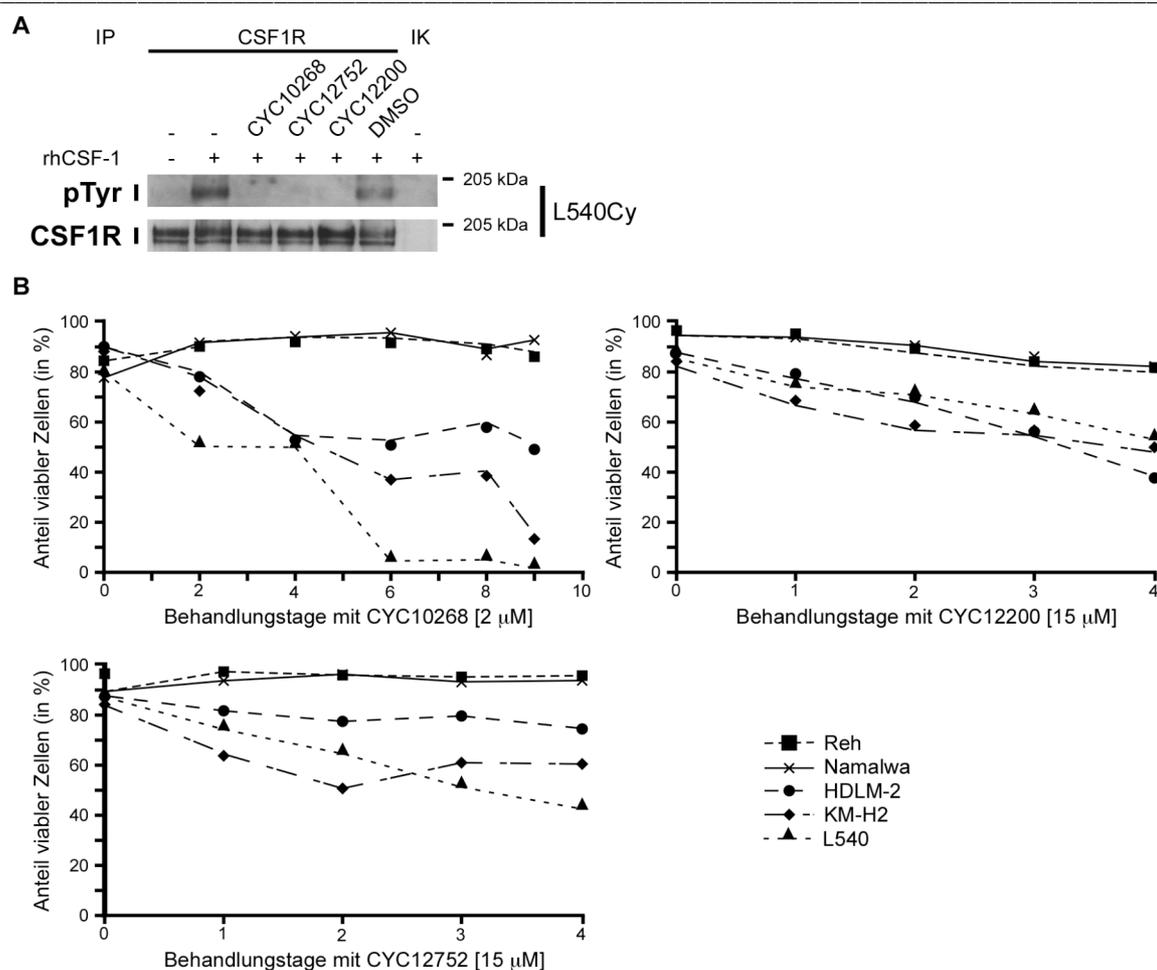


Abbildung 3.32: CSF1R inhibierende Moleküle induzieren Apoptose in HRS Tumorzellen. (A) 100 ng/ml rhCSF-1 wurden für 90 min ohne und mit 2 μ M CYC10268, 15 μ M CYC12752 oder 15 μ M CYC12200 vorinkubiert. Anschließend wurde damit die HRS Zelllinie L540Cy für 5 min stimuliert. Es folgten eine Immunopräzipitation und Western Blot Analyse wie in **Abb. 3.29**. Die Isotypkontrolle (IK) sowie die Stimulation mit rhCSF-1 und DMSO dienten als Kontrolle. (B) Kinetiken der Inkubation von HRS Zellen (KM-H2, HDLM-2 und L540) und Non-Hodgkin B-Zelllinien (Reh und Namalwa) mit den CSF1R inhibierenden Molekülen CYC10268, CYC12752 und CYC12200. Zu den angegebenen Zeitpunkten fanden durchflusscytometrische Analysen von Annexin V/PI Färbungen der Zellen statt. Doppelt negative Populationen wurden als viable Zellen definiert.

Zusammenfassend ergänzen diese Ergebnisse die Arbeiten aus meiner Diplomarbeit und zeigen, dass eine Inhibition der Interaktion zwischen CSF-1 und CSF1R zu einer verringerten Wachstumsrate und zum Zelltod der Tumorzellen führt. Zusammen mit den Ergebnissen einer Proliferationssteigerung durch die rhCSF-1 Stimulation von HRS Zellen in der Diplomarbeit, kann eine autokrine Wachstumsschleife sowie der Schutz vor Zelltod durch die Expression von CSF-1 und CSF1R in HRS Tumorzellen vermutet werden.

Ergebnisse

3.2.3 Stabile ektope Expression von CSF1R in Non-Hodgkin B- und T-Zelllinien

Die Expression des B-linien-fremden myeloid-spezifischen Proteins CSF1R in HRS Zellen bietet den Zellen einen Wachstumsvorteil bei gleichzeitiger Stimulation mit dem Cytokin CSF-1. Um zu klären, ob die Expression linien-fremder Gene auch in anderen Non-Hodgkin Tumorentitäten Auswirkungen auf die Zellen haben kann, wurden verschiedenen Non-Hodgkin B- und T-Zell Lymphom bzw. Leukämie Zelllinien mit einem Expressionvektor, der das *CSF1R* Gen enthält, transfiziert und durch Antibiotikaselektion stabile Klone generiert. Durchflusscytometrische Analysen zeigten eine deutliche Expression von CSF1R in den *CSF1R* Klonen der diffus großzelligen B-Zell Lymphomzelllinie SU-DHL-4 und den T-Zell Leukämie Linien H9 und Molt-14 (**Abb. 3.33 links**).

Immunpräzipitationen des Rezeptors nach rhCSF-1 Stimulation in den *CSF1R* Klonen der Zelllinien SU-DHL-4, H9 und Molt-14 zeigten eine Phosphorylierung des Rezeptors nach Stimulation mit rhCSF-1 und in den H9 *CSF1R* Klonen Zellen zusätzlich eine geringe konstitutive Phosphorylierung von CSF1R (**Abb. 3.33 rechts**).

Ergebnisse

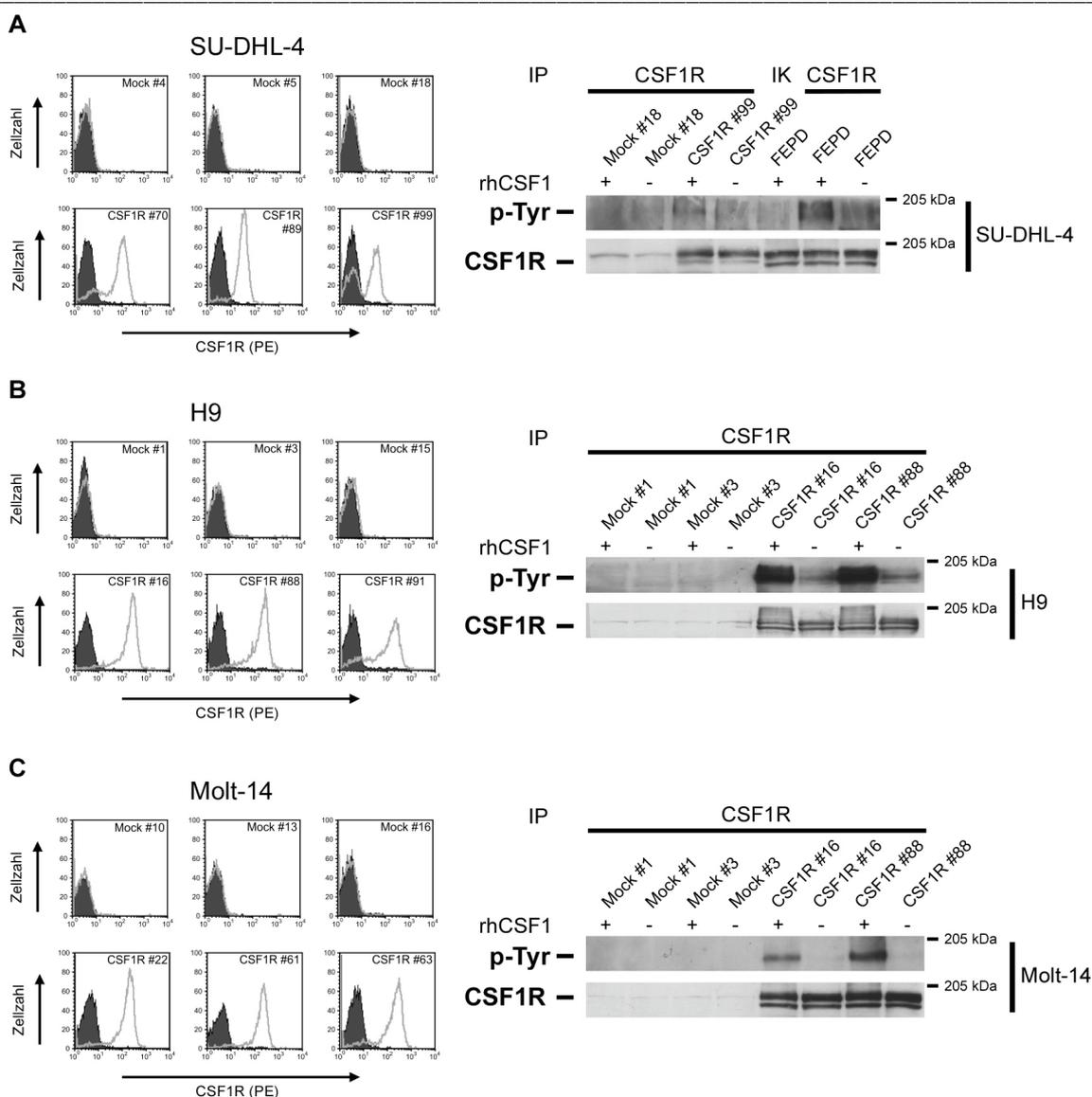


Abbildung 3.33: CSF1R kann in B- und T-Zelllinien stabil und funktionsfähig exprimiert werden. (**links**) Durchflusszytometrische Analyse der stabilen Expression von CSF1R in SU-DHL-4 (**A**), H9 (**B**) und Molt-14 (**C**) Non-Hodgkin Zelllinien im Vergleich zu Mock transfizierten Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen CSF1R (grauer offener Graph) bzw. dessen Isotypkontrolle (schwarzer geschlossener Graph). (**rechts**) Immunopräzipitation des mit rhCSF-1 stimulierten CSF1R in den Klonen der Non-Hodgkin Zelllinien SU-DHL-4 (**A**), H9 (**B**) und Molt-14 (**C**) und anschließender Western Blot Analyse der Phosphorylierung von CSF1R wie in **Abb. 3.29**. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Klone. Die Stimulation der ALCL Zelllinie FEPD, die eine hohe endogene CSF1R Expression hat [209], diente als Kontrolle. Die Isotypkontrolle (IK) und die Färbung der Membran mit einem CSF1R Antikörper dienten ebenfalls als Kontrolle.

Die Oberflächenexpression und die Aktivierung des CSF1R zeigte die Funktionalität des Rezeptors in den stabilen Klonen. Es folgte die Analyse, ob die stabil CSF1R exprimierenden Zellen einen Wachstumsvorteil nach rhCSF-1 Stimulation haben. Dies wurde indirekt mit der Messung des Tritium Thymidin Einbaus in neu synthetisierte DNA ermittelt. Diese Analysen ergaben in der DNA Syntheserate weder einen Unterschied

Ergebnisse

zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen, noch zwischen Mock Klonen und CSF1R exprimierenden Klonen (**Abb. 3.34**). Neben den Auswirkungen auf Wachstum und Überleben durch CSF1R ist auch die Änderung des Expressionmusters von nicht-myeloiden Zellen durch CSF-1 Signale eine Möglichkeit der Konsequenz der stabilen Expression von CSF1R. Für die Untersuchung, ob B- oder T-Zelllinien *CSF1R* Klone durch die CSF1R Expression in die Richtung der myeloiden Zelltypen reprogrammiert werden können, bedarf es einer detaillierten Analyse der Veränderung des Genexpressionsmusters der Klone nach rhCSF-1 Stimulation. Diese weiterführenden Arbeiten wurden im Rahmen meiner Doktorandenzeit nicht mehr durchgeführt.

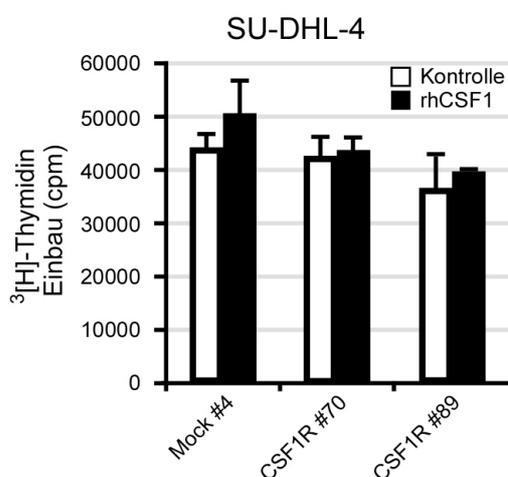


Abbildung 3.34: Ektope Expression von CSF1R in Non-Hodgkin Lymphom B-Zellen bietet keinen Wachstumsvorteil für die Zellen. Klone der Zelllinie SU-DHL-4, stabil transfiziert mit einem leeren Vektor (Mock) oder mit einem CSF1R codierenden Plasmid, wurden für 48 h mit und ohne rhCSF-1 inkubiert. Die letzten 24 h der Inkubation wurden den Zellen zusätzlich noch 1 μ Ci/Well 3 [H] - Thymidin zugegeben. Nach 48 h wurde die Menge an in neu synthetisierte DNA eingebautem 3 [H] - Thymidin gemessen. Kontrolle - Stimulation mit H_2O

3.2.4 Regulation der CSF-1 Expression in HRS Zellen

Nachdem die funktionellen Auswirkungen der aberranten Expression von Cytokinen und deren Rezeptoren für die HRS Zellen des Hodgkin Lymphoms untersucht wurden, soll in den folgenden Abschnitten die Regulation von CSF-1 und CSF1R in HRS Zellen und damit die Ursache für deren aberrante Expression analysiert werden.

Die Regulation von Cytokinen in Zellen hängt stark von ihrer Funktion und dem jeweiligen Zelltyp ab. Wird ein Cytokin nur im Falle einer Entzündungsreaktion exprimiert, um eine Immunantwort zu steuern, so muss diese Expression streng reguliert und auch wieder abschaltbar sein [212]. Die Regulation wird unter anderem auf der Ebene der Transkription durch Transkriptionsfaktoren erreicht. Für CSF-1 ist eine

Ergebnisse

Regulation durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B bekannt. Der Promotorbereich von CSF-1 enthält NF- κ B Bindungsstellen. Eine Regulation von CSF-1 durch NF- κ B wurde bereits in zellulären Systemen gezeigt [213,214,215].

Die konstitutive Aktivierung von NF- κ B im Hodgkin Lymphom [216,217] ist somit eine mögliche Erklärung für die Expression von CSF-1. Um diese Vermutung zu überprüfen, ist die NF- κ B Aktivität in HRS Zelllinien mit einer mutierten Version des 'Inhibitor von NF- κ B α ' (I κ B α) Proteins reduziert worden. Dem mutierten I κ B α Konstrukt (I κ B α Δ N) fehlen die 70 aminoterminalen Aminosäuren, in denen Tyrosin- und Serinreste enthalten sind, die bei der Aktivierung des NF- κ B Signalweges phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierung kommt es zur Degradation von I κ B α , daher ist der aminoterminal Bereich von I κ B α für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich. I κ B α Δ N ist in der Lage NF- κ B zu binden, es kann durch die fehlende Tyrosin- bzw. Serinphosphorylierungen am N-Terminus aber nicht proteasomal degradiert werden und somit NF- κ B nicht in den aktiven Status entlassen [218]. Die Fähigkeit von I κ B α Δ N zur Reduktion der NF- κ B Aktivität in HRS Zelllinien beizutragen, wurden in Arbeiten der Forschungsgruppen von Prof. Bernd Dörken und Prof. Claus Scheidereit durchgeführt [216,217,219].

Die Reduktion der NF- κ B Aktivität durch die Expression von I κ B α Δ N in HRS Zelllinien (L428 und KM-H2) wurde genutzt, um die Regulation der CSF-1 Expression in Abhängigkeit der NF- κ B Aktivität zu untersuchen. KM-H2 und L428 Zellen wurden mit I κ B α Δ N und GFP ko-transfiziert und die GFP positiven Zellen durchflusscytometrisch auf die CSF-1 Expression analysiert. Im Vergleich zur Mock Kontrolle zeigte sich eine deutliche Reduktion der CSF-1 Expression in L428 und KM-H2 Zellen. In den KM-H2 Zellen konnte die Reduktion von CSF-1 Protein nach 24 h in den I κ B α Δ N transfizierten Zellen beobachtet werden. In den L428 Zellen begann die Abnahme der CSF-1 Proteinmenge nach 48 h (**Abb. 3.35a und b**). Für beide Zelllinien konnte auch noch nach 72 h eine geringere CSF-1 Expression in den I κ B α Δ N transfizierten Zellen detektiert werden. Die Expressionskontrolle nach 72 h zeigte eine robuste Expression von I κ B α Δ N (**Abb. 3.35a und b**).

Ergebnisse

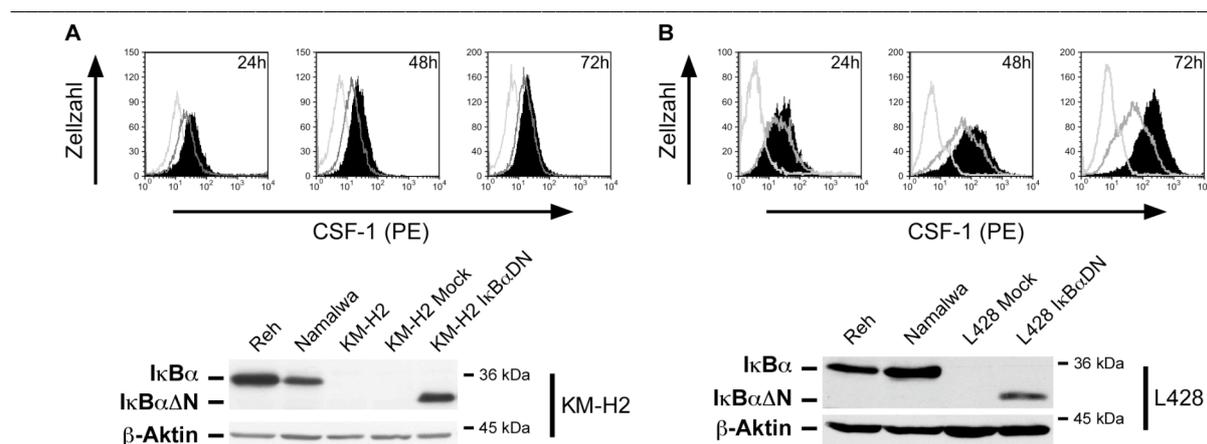


Abbildung 3.35: Die CSF-1 Expression ist abhängig von der NF- κ B Aktivität. Die HRS Zelllinien KM-H2 (**A**) und L428 (**B**) wurden mit I κ B α Δ N und GFP ko-transfiziert und nach 24, 48 sowie 72 h fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen intrazellulär durchflusscytometrisch auf die Expression von CSF-1 Protein untersucht. Die Histogramme zeigen jeweils die lebenden, GFP positiven Zellen. Es wurden jeweils die Fluoreszenzintensitäten der CSF-1 Färbung zwischen den Mock transfizierten Zellen (schwarzer ausgefüllter Graph) mit denen der CSF-1 Färbung der I κ B α Δ N transfizierten Zellen (dunkelgrauer Graph) und der Isotypkontrolle (hellgrauer Graph) verglichen. Nach 72 h wurde zusätzlich auch Gesamtprotein von den Zellen präpariert und mittels Western Blot und einem Immunoblot mit einem spezifischem Antikörper gegen I κ B α analysiert. Die Western Blot Analysen zeigen die Expression der transfizierten Zellen nach 72 h im Vergleich mit endogenem I κ B α in Non-Hodgkin Zelllinien (Reh, Namalwa).

Abschließend kann für die Regulation von CSF-1 eine Beteiligung von NF- κ B postuliert werden. In den nächsten Abschnitten geht es um die Regulation des korrespondierenden Rezeptors CSF1R in HRS Tumorzellen.

3.2.5 Regulation der CSF1R Expression in HRS Zellen

Die Regulation des *CSF1R* Gens ist in den letzten Jahren sehr detailliert erforscht worden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist dabei der Transkriptionsfaktor PU.1 entscheidend für die Regulation des Gens verantwortlich. In B-Zellen ist PU.1 auf einem niedrigen Niveau exprimiert, während *CSF1R* bereits epigenetisch abgeschaltet ist. In den von B-Zellen abstammenden Zellen des Hodgkin Lymphoms werden eine Reihe von B-Zell-fremden Transkriptionsfaktoren exprimiert [121], die für die Expression linienfremder Proteine verantwortlich sein könnten. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in HRS Zellen PU.1 nicht exprimiert ist [220]. Dieses Ergebnis ist hier auf Zelllinienebene noch einmal bestätigt worden (**Abb. 3.36**). Eine Expression von PU.1 in den HRS Zelllinien konnte lediglich in der L591 Zelllinie detektiert werden, während alle Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien positiv für die Expression von PU.1 waren.

Ergebnisse

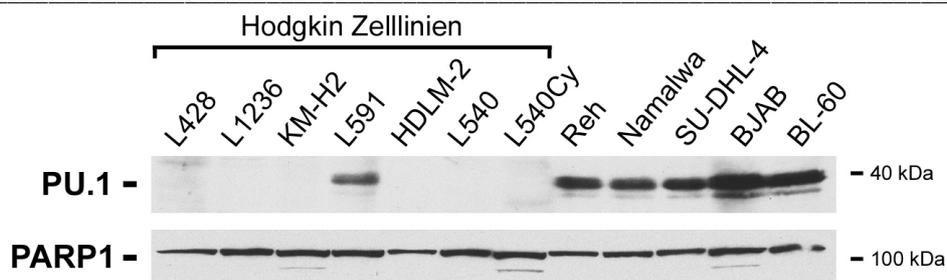


Abbildung 3.36: PU.1 ist in HRS Zelllinien nicht exprimiert. Kernprotein der HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy), prä-B-Zell Leukämie (Reh) und Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien (Namalwa, SU-DHL-4, BJAB, BL-60) wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Immunoblot mit einem Antikörper spezifisch für PU.1 analysiert. Die Expression des Kernproteins PARP1 diente als Ladekontrolle.

Der Transkriptionsfaktor PU.1 ist also wahrscheinlich nicht für die Expression von CSF1R in HRS Zellen verantwortlich.

3.2.5.1 Der klassische CSF1R Promotor ist nicht aktiv in HRS Zelllinien

In Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität des *CSF1R* Promotors sollten Hinweise auf die Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren zur Expression von CSF1R in HRS Zellen gefunden werden. Dazu wurden DNaseI *in vivo* Footprint Analysen in Kooperation mit dem Labor von Prof. Constanze Bonifer in Leeds, UK durchgeführt. Mit *in vivo* Footprint Analysen werden Positionen in einem gewünschten DNA Bereich kartiert, die für die Anlagerung von Proteinen (Enzymen oder Transkriptionsfaktoren) zugänglich sind. Durch elektrophoretische Auftrennung mittels Polyacrylamidgel und einer radioaktiv markierten Sonde, können diese Fragmente für den gewünschten Teilbereich des Genoms sichtbar gemacht werden. Dabei weist dicht kondensierte DNA, die nicht zugänglich für Transkriptionsfaktoren ist, eine geringere Dichte an DNA Fragmenten auf dem Gel auf. Als Positivkontrolle diente in diesen Versuchen die myeloide Zelllinie HL-60, die *CSF1R* exprimiert und eine hohe Dichte an DNA Fragmenten bei der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde mit der Sequenz des klassischen *CSF1R* Promotors aufwies (**Abb. 3.37a**).

Für die Analyse der Situation in Hodgkin Lymphom Zelllinien wurden die HRS Zelllinien L428, L540Cy, KM-H2 und L591 mit der Non-Hodgkin B-Zell Lymphom Zelllinie Namalwa, die *CSF1R* nicht exprimiert, verglichen. Ähnlich der nicht-myeloiden Zelllinie Namalwa zeigte sich im *CSF1R* Promotorbereich der HRS Zelllinien eine unerwartet geringe Bandenintensität. Dies bedeutete, dass an den entscheidenden Transkriptionsfaktor-

Ergebnisse

bindungsstellen im klassischen *CSF1R* Promotorbereich in den HRS Zellen, im Gegensatz zu den HL-60 Zellen, kein offenes Chromatin vorlag. (**Abb. 3.37a**).

Ein weiterer Hinweis für transkriptionell aktives Chromatin ist die Tri-Methylierung von Lysin 4 des Histons 3 (H3K4me3). Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) von DNA mit einem Antikörper gegen H3K4me3 und anschließender PCR Analyse mit Primern, die in der Promotorregion binden, ermöglichen die Analyse dieser Modifizierung. Für die H3K4me3 ChIP Experimente wurde genomische DNA von Hodgkin Lymphom Zelllinien (L428, L591, L540Cy und KM-H2), der Non-Hodgkin B-Zell Lymphomzelllinie Namalwa und der myeloiden Zelllinie HL-60 hergestellt. Die myeloide HL-60 Zelllinie zeigte eine deutliche Präzipitation des klassischen *CSF1R* Promotors mit dem Antikörper gegen H3K4me3 im Vergleich zur Präzipitation mittels Isotypkontrolle. Die präzipitierte Menge von Sequenzen des klassischen *CSF1R* Promotorbereichs in den HRS Zelllinien war dagegen geringfügig höher als in der jeweiligen Isotypkontrolle. Dieser Anstieg war vergleichbar mit dem in der *CSF1R* nicht exprimierenden Zelllinie Namalwa (**Abb. 3.37b**).

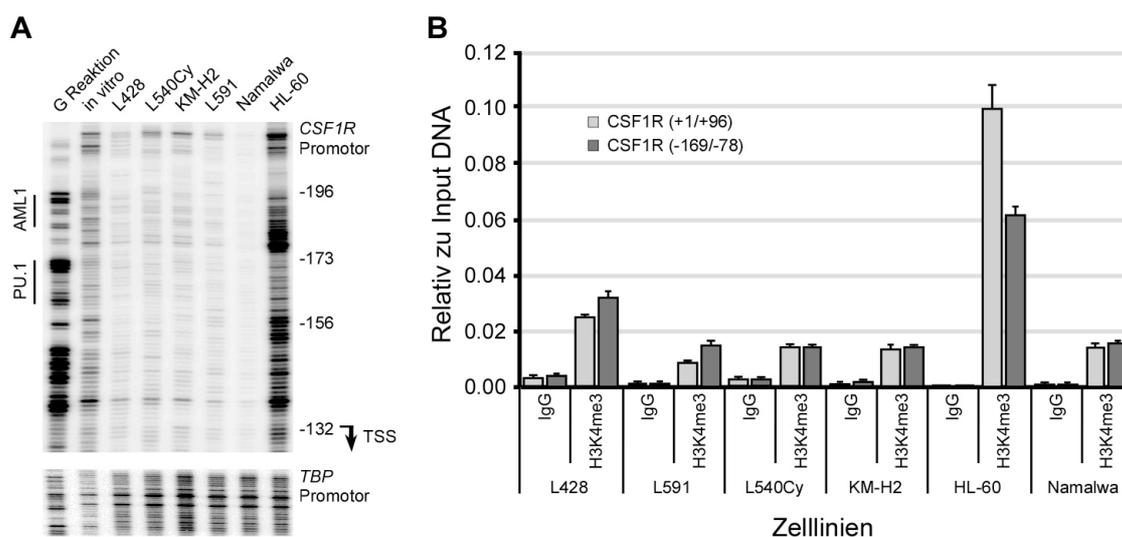


Abbildung 3.37: Der klassische *CSF1R* Promotor in HRS Zelllinien ist nicht zugänglich für die Transkriptionsinitiation. (**A**) DNase Footprint Analysen des klassischen *CSF1R* Promotors in den HRS Zelllinien (L428, L540Cy, KM-H2 und L591), Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien (Namalwa) und einer *CSF1R* exprimierenden myeloiden Leukämie Zelllinie (HL-60). Die Analyse des TBP Promotors in diesen Zelllinien diente als Kontrolle. (**B**) Quantitative Real-Time PCR Analysen der H3K4me3 ChIP Experimente mit den HRS Zelllinien (L428, L591, L540Cy und KM-H2), einer myeloiden Leukämie Zelllinie (HL-60) und einer Non-Hodgkin Lymphom Zelllinie (Namalwa). Analysiert wurden die beiden angegebenen Bereiche des *CSF1R* Promotors; die Zahlenangaben sind relativ zum ATG Startcodon. IgG bezeichnet die Isotypkontrolle der ChIP Experimente. Beide Experimente wurden im Labor von Prof. Constanze Bonifer in Leeds, UK durchgeführt.

Gemeinsam betrachtet, zeigten die DNase Footprint Analysen und H3K4me3 Experimente einen inaktiven Chromatinzustand am klassischen *CSF1R* Promotor in den HRS Zelllinien.

Ergebnisse

Der Chromatinzustand in HRS Zellen unterschied sich nicht zu dem in Non-Hodgkin B-Zell Lymphomzelllinie, die keine *CSF1R* mRNA Expression aufweist. Um eine Vorstellung über den Startbereich des *CSF1R* Transkripts in HRS Zellen zu bekommen, wurde im Labor von Prof. Constanze Bonifer das mRNA Transkript von *CSF1R* näher analysiert.

3.2.5.2 Das *CSF1R* Transkript in HRS Zellen unterscheidet sich von dem in myeloiden Zellen

Nach den Analysen des klassischen *CSF1R* Promotors in **Kapitel 3.2.5.1** ist dieser wahrscheinlich nicht das regulatorische Element der *CSF1R* mRNA Expression in den HRS Zellen. Aus der Literatur ist bekannt, dass in Trophoblastenzellen die Expression von *CSF1R* mRNA durch einen Promotor reguliert wird, der im Genom 25 kb stromaufwärts des klassischen Promotors lokalisiert ist [57]. Mit Hilfe von quantitativen Real-Time PCR Analysen sollte untersucht werden, ob sich das *CSF1R* mRNA Transkript in HRS Zellen im 5'-Bereich von dem myeloiden Transkript unterscheidet. Dazu wurden Primer genutzt, die verschiedene Bereiche in der Umgebung des Translationsstartes ATG der *CSF1R* mRNA amplifizieren (s. Schema in **Abb. 3.38**).

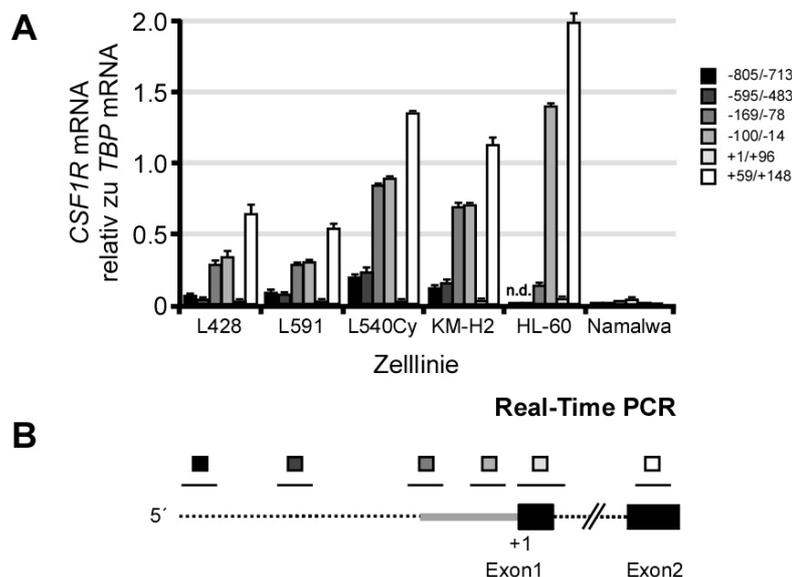


Abbildung 3.38: Der 5'-Bereich des *CSF1R* Transkripts in HRS Zellen unterscheidet sich von dem in myeloiden Zellen. **(A)** Quantitative Real-Time PCR Analysen von mRNA aus HRS (L428, L591, L540Cy und KM-H2) und myeloiden (HL-60) Zelllinien. Die Primerpaarbezeichnungen sind relativ zum A des ATG Startcodons des *CSF1R* mRNA Transkripts (+1). Die Transkriptmenge ist jeweils bezogen auf *TBP* mRNA. Die Analyse der mRNA von Namalwa Zellen diente als Negativkontrolle (n.d. – nicht detektierbar). **(B)** Das Schema zeigt die Positionen der jeweiligen Primerpaare auf dem 5'-Bereich der *CSF1R* genomischen bzw. mRNA Sequenz. Der hellgraue Streifen ist dabei die 5'-untranslatierte Region (UTR), die schwarzen Balken sind translatierte Bereiche. Die gestrichelte Linie symbolisiert genomische DNA Bereiche, die nicht im klassischen prozessierten *CSF1R* mRNA Transkript vorkommen. Die Experimente wurden im Labor von Prof. Constanze Bonifer in Leeds, UK durchgeführt.

Ergebnisse

Die Primerpaare -805/-713, -595/-483 und -169/-78 lagen dabei stromaufwärts außerhalb des Transkriptionsstartes der myeloiden *CSF1R* mRNA. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob sich die Herkunft und Länge des Transkripts in Hodgkin Lymphom Zelllinien von dem in myeloiden Zellen unterscheidet. Als interne Kontrolle der Verunreinigung mit genomischer DNA wurde bei jeder Zelllinie eine PCR durchgeführt, deren sense Primer in einem Exon lag, der antisense Primer in einem Intron (+1/+96). Die Nummern der Primer beziehen sich dabei jeweils auf die Positionen der Nukleotide relativ zum A des ATG Startcodons. In allen Zelllinien konnte mit diesem Primerpaar kein Amplifikat identifiziert werden.

Das Primerpaar +59/+148 liegt im Exon 2 des klassischen Transkripts und wurde sowohl in den HRS Zelllinien (L428, L591, L540Cy, KM-H2) als auch in der myeloiden Zelllinie (HL-60) amplifiziert. Auch das Primerpaar -100/-14 wurde in diesen Zelllinien gefunden, da es eine -132 bp lange 5'-untranslatierte Region (UTR) in dem klassischen *CSF1R* Transkript gibt. Die übrigen drei Primerpaare (-169/-78; -595/-483; -805/-713) ergaben dagegen nur in den vier HRS Zelllinien ein Amplifikat und nicht in der myeloiden HL-60 Zelllinie (**Abb. 3.38**).

Mittels eines 5'-RACE Experiments wurde mit einem weiteren Ansatz das 5'-Ende des *CSF1R* Transkripts in Hodgkin Lymphom Zelllinien und myeloiden Zellen untersucht. Dabei wird an das unbekanntes 5'-Ende der mRNA ein Adapter ligiert, der eine Primersequenz enthält, welche als sense Primer in einer PCR Reaktion genutzt wird. Der antisense Primer ist Gen-spezifisch und lag in diesem Fall in der 5'-UTR des *CSF1R* Gens. Mit dem Amplifikat wurde dann eine zweite PCR mit weiter intern liegenden Primern durchgeführt, um die Menge an Amplifikat zu steigern. Im Vergleich zu der myeloiden HL-60 Zelllinie, konnte in den beiden Hodgkin Lymphom Zelllinien KM-H2 und L540Cy ein ca. 200 bp längeres Produkt identifiziert werden (**Abb. 3.39**).

Ergebnisse

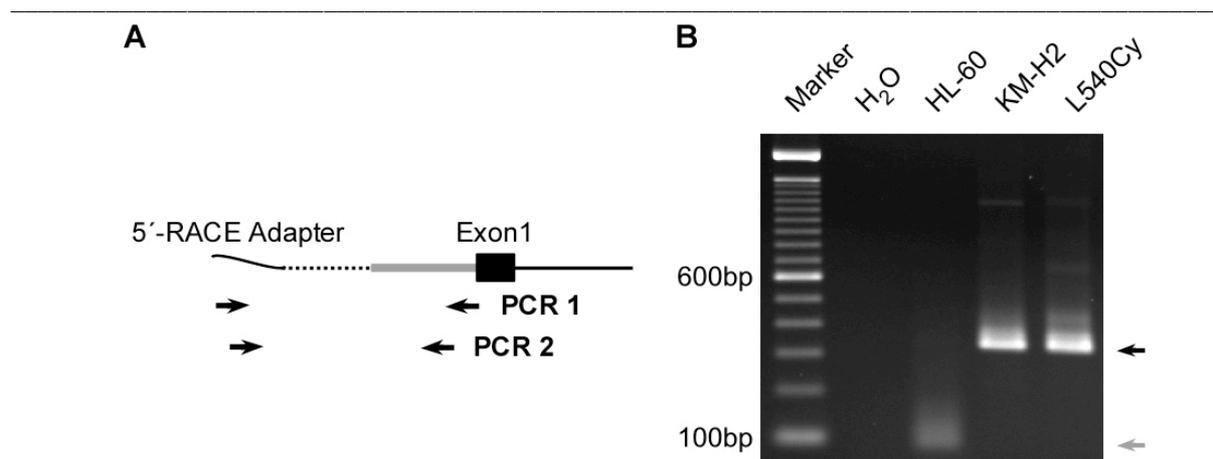


Abbildung 3.39: Der 5'-Bereich des *CSF1R* Transkripts ist länger als in myeloiden Zellen. **(A)** Schema der PCR Reaktionen für die 5'-RACE PCR mit mRNA, an die am 5'-Ende ein Adapter ligiert wurde. In der ersten PCR Reaktion wurde ein Primer in diesen Adapter gelegt, der reverse Primer war *CSF1R* Gen-spezifisch. In der zweiten PCR Reaktion war die Lage des Primerpaares etwas weiter intern. **(B)** Ergebnis der 5'-RACE PCR Analysen der mRNA von HRS Zelllinien L540Cy und KM-H2 im Vergleich zur myeloiden Zelllinie HL-60. Die Transkripte der *CSF1R* mRNA 5'-UTR in den HRS Linien (schwarzer Pfeil) sind etwa 200 bp länger als das in HL-60 Zellen (grauer Pfeil). Die 5'-RACE PCR wurde im Labor von Prof. Constanze Bonifer in Leeds, UK durchgeführt.

In zwei verschiedenen Ansätzen wurde hier gezeigt, dass das *CSF1R* Transkript der Hodgkin Lymphom Zelllinien im Vergleich zu myeloiden Zellen in dem Bereich der 5'-UTR länger ist. Es folgte eine Analyse der Herkunft dieses längeren Transkripts.

3.2.5.3 Das *CSF1R* Transkript im Hodgkin Lymphom initiiert -6.5 kb stromaufwärts des myeloiden Promotors

Die amplifizierten Produkte aus den 5'-RACE PCR Experimenten wurden aufgereinigt und jeweils sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind schematisch in **Abbildung 3.40** gezeigt. Die Sequenzierung des HL-60 Produkts ergab die erwartete 132 bp lange 5'-UTR des klassischen *CSF1R* Gens, im Folgenden als kanonisches Transkript bezeichnet (**Abb. 3.40 unten**). Ein überraschendes Ergebnis ergab die Sequenzierung der PCR Produkte aus den beiden Hodgkin Lymphom Zelllinien. Das *CSF1R* Transkript startete weder am klassischen Transkriptionsstart des myeloiden Gens, noch an dem aus Trophoblastenzellen bekannten Startbereich -25 kb stromaufwärts des klassischen Transkriptionsstartes. Stattdessen begann die 5'-UTR des *CSF1R* Transkripts von HRS Zelllinien -6.5 kb stromaufwärts des ATG Startcodons, beinhaltete zwei Introns und bestand in der prozessierten Form aus 373 bp. Im Folgenden wird das *CSF1R* Transkript aus den HRS Zelllinien als nicht-kanonisches Transkript bezeichnet (**Abb. 3.40 oben**).

Ergebnisse

Da beide Transkripte im Bereich des ATG Startcodons identisch sind, scheint eine normale Translation des CSF1R auch durch das nicht-kanonische Transkript möglich.

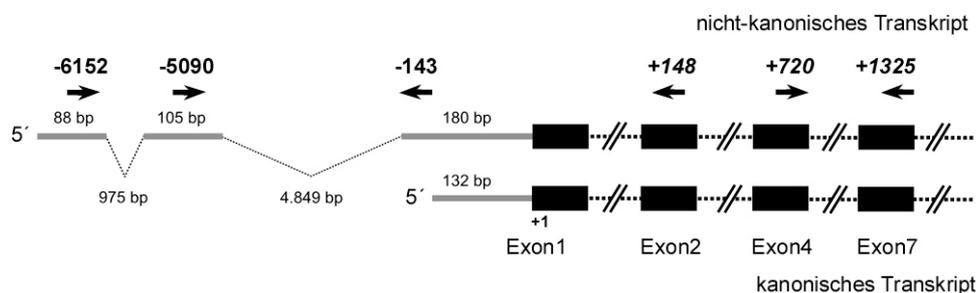


Abbildung 3.40: Schema der *CSF1R* Transkripte abgeleitet aus der Sequenzierung der 5'-RACE PCR Produkte und einem Vergleich mit der humanen genomischen Sequenz. Das nicht-kanonische Transkript stammt aus der Sequenzierung der Produkte aus den HRS Zelllinien KM-H2 und L540Cy, das kanonische Transkript aus der Sequenzierung der Produkte der myeloiden Zelllinie HL-60 (s. **Abb. 3.39**). Zusätzlich sind die Primerpositionen für die folgenden PCR Analysen eingezeichnet.

Kursive Ziffern beziehen sich auf die Position in der cDNA (NM_005211), während sich gerade Ziffern auf die genomische Sequenz von *CSF1R* beziehen, beides relativ zum A des ATG Translationsstartes. Graue Balken stellen untranslatierte Regionen dar, während schwarze Balken translatierte Sequenzen repräsentieren. Gestrichelte Linien sind intronische Sequenzen.

In **Abbildung 3.40** sind die Positionen von Primern eingezeichnet, die für die folgende Validierung der Ergebnisse in Zelllinien und primären Zellen genutzt wurden. Die Ziffern in der Primerbezeichnung geben die Position relativ zum A des ATG Startcodons an. Zunächst wurden die HRS Zelllinien (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2 und L540) mit den Non-Hodgkin Zelllinien (Reh, Namalwa) und aufgereinigten CD33⁺ myeloiden Zellen (CD33_#1-#5) von PBMZs freiwilliger Spender verglichen. Die erste Primerkombination (+720/+1325) liegt dabei in der translatierten Region zwischen Exon 4 und Exon 7 und damit vollständig im kanonischen und nicht-kanonischen Transkript. Die HRS Zelllinien und die CD33⁺ Zellen waren positiv für das kanonische Transkript, während die Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien kein PCR Produkt aufwiesen. Die Kombination -5090/+148 deckt die mRNA Sequenz des nicht-kanonischen Transkripts aus den HRS Zellen bis zur codierenden Region des *CSF1R* Gens im Exon 2 ab. Hier waren nur die HRS Zelllinien positiv und weder in den myeloiden Zellen, noch in den Non-Hodgkin B-Zelllinien tauchte dieses Transkript auf. Genauso verhielt es sich mit der dritten Kombination (-6152/-143), die ausschließlich in der nicht-kanonischen 5'-UTR des Hodgkin Lymphoms liegt (**Abb. 3.41**).

Ergebnisse

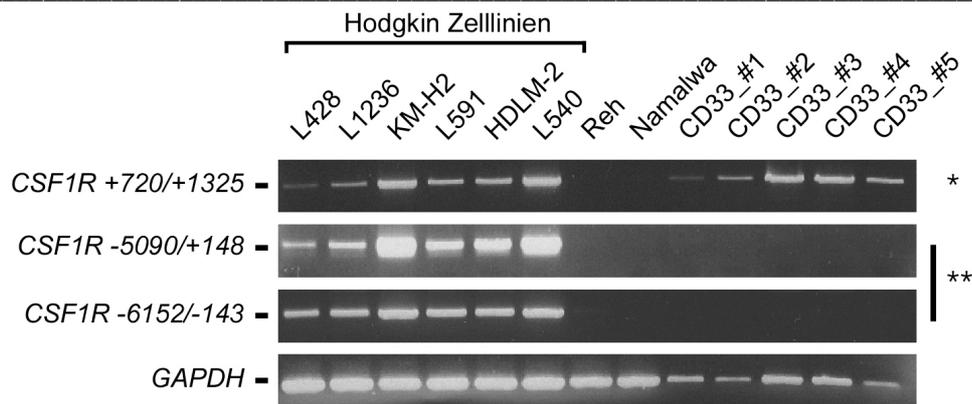


Abbildung 3.41: Die Expression des kanonischen und des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts in HRS Zelllinien und primären myeloiden Zellen. Mit den HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2 und L540), Non-Hodgkin Zelllinien (Reh, Namalwa) und aus PBMZs aufgereinigte CD33⁺ myeloide Zellen wurde eine cDNA Synthese durchgeführt. Anschließend wurden RT-PCR Analysen mit verschiedenen Primerkombinationen für das *CSF1R* Transkript durchgeführt. Die Positionen der Primer sind in **Abb. 3.40** dargestellt. Die Analyse der mRNA Expression von *GAPDH* diente als Kontrolle. (* - kanonisches Transkript; ** - nicht-kanonisches Transkript)

Diese Daten sollten nun auch auf Patientenproben validiert werden. Dazu wurde RNA aus Gefrierschnitten betroffener Lymphknoten aus Hodgkin Lymphom Patienten präpariert und mit RNA aus Gefrierschnitten von Tonsillen nicht malign erkrankten Patienten verglichen (alle RNA Proben von primären Tumorfällen, die in den folgenden Analysen genutzt wurden, sind von der Pathologie des Charité Universitätsklinikums Benjamin Franklin unter der Leitung von Prof. Harald Stein bereitgestellt worden). Die cDNA dieser Proben wurde dann mit den Primern spezifisch für die verschiedenen *CSF1R* Transkripte (schematisch dargestellt in **Abbildung 3.40**) analysiert. Die Non-Hodgkin B-Zelllinie Reh diente als Negativ-, die HRS Zelllinie KM-H2 als Positivkontrolle. Das kanonische Transkript kam in allen Proben vor, wahrscheinlich verursacht durch in den jeweiligen Geweben vorhandenen Makrophagen. Die nicht-kanonischen Transkripte konnten dagegen nur in den Hodgkin Proben identifiziert werden (**Abb. 3.42**).

Ergebnisse

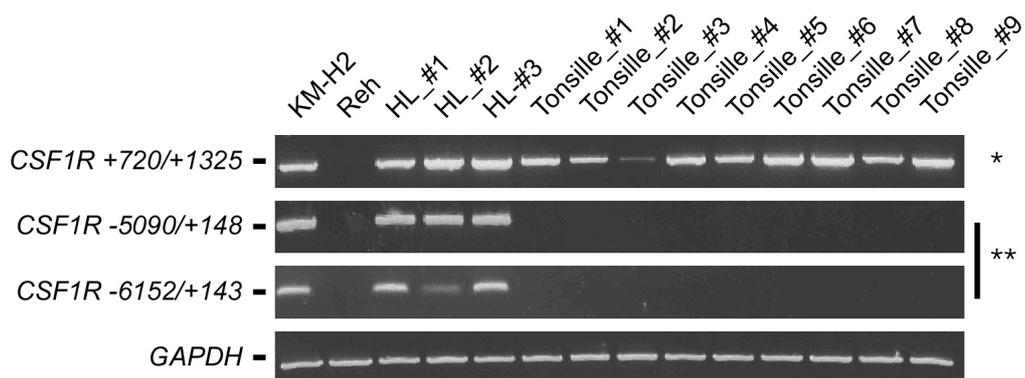


Abbildung 3.42: Das nicht-kanonische *CSF1R* Transkript ist in befallenen Lymphknoten von Hodgkin Patienten exprimiert. Analysiert wurden cDNAs synthetisiert aus RNA befallener Lymphknoten von Hodgkin Patienten (HL_#1-#3) und Tonsillen von nicht malig erkrankten Patienten (Tonsille_#1-#9) mittels RT-PCR Analysen mit verschiedenen Primerkombinationen für das *CSF1R* Transkript. Die Positionen der Primer sind in **Abb. 3.40** dargestellt. Die Analyse von mRNA aus KM-H2 und Reh Zellen diente als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Die Analyse der Expression von *GAPDH* diente als Kontrolle. (* - kanonisches Transkript; ** - nicht-kanonisches Transkript)

Da die Expression von *CSF1R* auch in Tumorzellen des mehrheitlich aus T-Zellen abstammenden anaplastisch großzelligen Lymphoms (ALCL) beschrieben ist [209], stellte sich als nächstes die Frage, welche der Transkripte in diesem Lymphom exprimiert werden. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurde mRNA aus befallenen Lymphknoten von ALCL Patienten des Universitätsklinikums Benjamin-Franklin untersucht. Als Positivkontrolle diente die HRS Zelllinie KM-H2. Als Negativkontrolle diente die prä-B-Zell Leukämie Zelllinie Reh. Die drei benutzten Primerpaare (s. **Abb. 3.40**) ergaben ein Produkt in vier von fünf ALCL Proben; hier ist also *CSF1R* als T-Zell fremdes Gen ebenfalls von einer alternativen Startsequenz aus exprimiert. (**Abb. 3.43**).

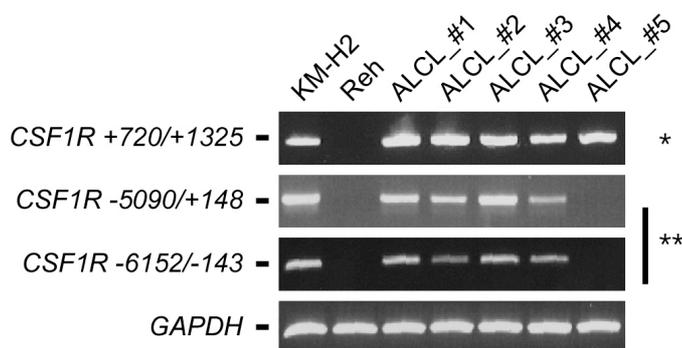


Abbildung 3.43: Das nicht-kanonische *CSF1R* Transkript wird in Lymphknoten von ALCL Patienten exprimiert. Jeweils 1 µg RNA aus Gefrierschnitten befallener Lymphknoten von ALCL Patienten (ALCL_#1-#5) wurde für die cDNA Synthese eingesetzt. Die RT-PCR Analysen wurden mit mehreren Primerkombinationen für das *CSF1R* Transkript durchgeführt. Die Positionen der Primer sind in **Abb. 3.40** dargestellt. Die Analyse von mRNA aus KM-H2 und Reh Zellen diente als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Die Analyse der Expression von *GAPDH* diente als Kontrolle. (* - kanonisches Transkript; ** - nicht-kanonisches Transkript)

Ergebnisse

In weiteren RT-PCR Experimenten wurde mRNA von B- und T-Zelllymphomen und -leukämien, bei denen keine aberrante *CSF1R* Expression bekannt ist, analysiert. Sowohl die mRNA von Zelllinien (**Abb. 3.44a**) als auch Proben von Patienten (**Abb. 3.44b,c**) waren negativ für das nicht-kanonische Transkript. Die Patientenproben wiesen eine Expression des kanonischen Transkripts auf, was vermutlich durch das Vorkommen von Makrophagen in dem entnommenen Material begründet ist.

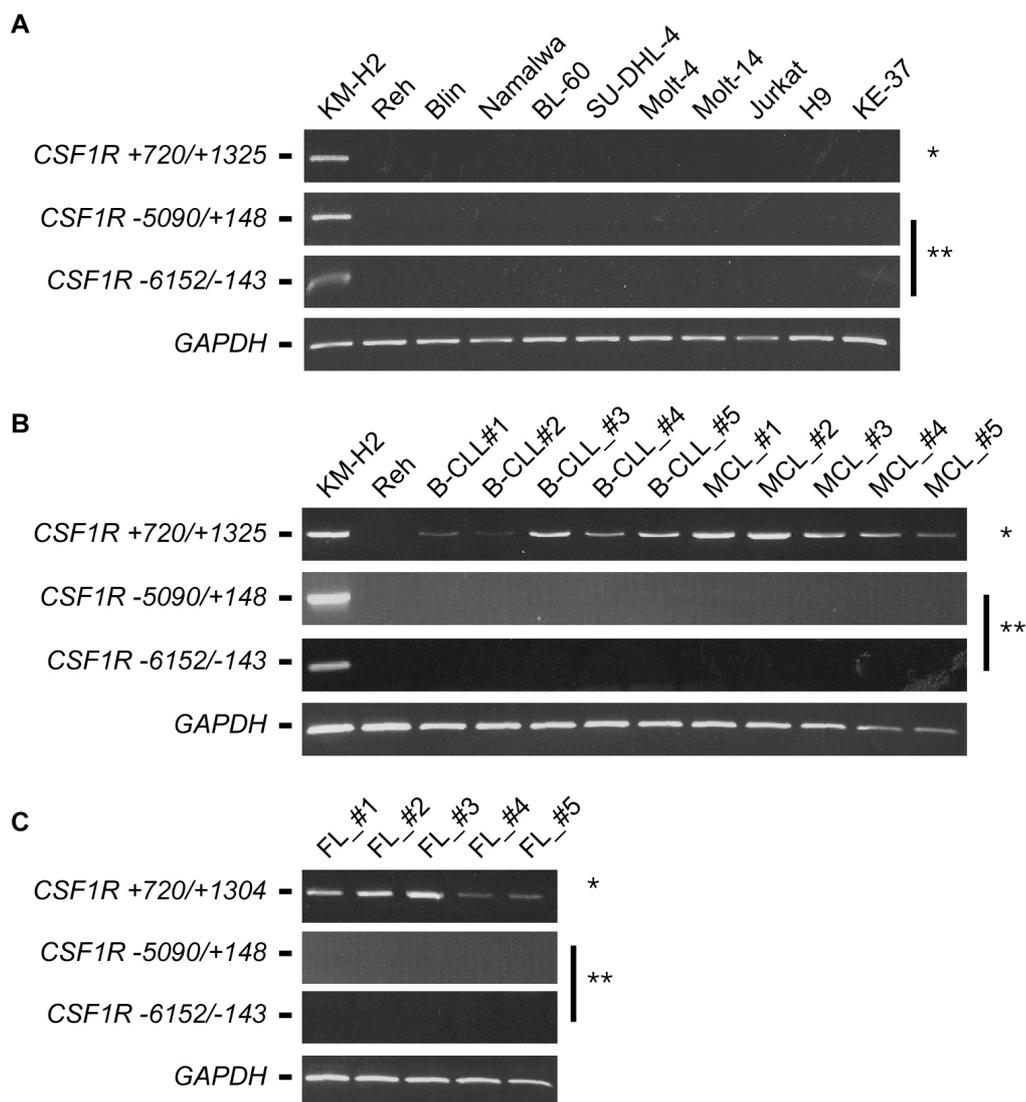


Abbildung 3.44: Das nicht-kanonische *CSF1R* Transkript wird nicht in verschiedenen B- und T-Zell abstammenden Tumorentitäten exprimiert. Analysiert wurde cDNA von Non-Hodgkin B-Zelllinien (Reh, Blin, Namalwa, Daudi, BL-60, SU-DHL-4), T-Zell Tumorzelllinien (Molt-4, Jurkat, H9, KE37) (**A**), Gefrierschnitten aus Geweben von Patienten mit B-Zell chronisch lymphoide Leukämie (B-CLL_#1-#5), Mantel Zell Lymphom (MCL_#1-#5) (**B**) und follikulärem Lymphom (FL_#1-#5) (**C**). Die RT-PCR Analyse erfolgte mit verschiedenen Primerkombinationen für das *CSF1R* Transkript. Die Positionen der Primer sind in **Abb. 3.40** dargestellt. Analysen von mRNA der Zelllinien KM-H2 und Reh dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Die Analyse der Expression von *GAPDH* diente als Kontrolle. (* - kanonisches Transkript; ** - nicht-kanonisches Transkript)

Ergebnisse

Die Expression des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts konnte in den Tumorentitäten gezeigt werden, bei denen die *CSF1R* Expression eine potentiell pathogene Bedeutung hat. In den nächsten Abschnitten geht es um die Untersuchung der regulatorischen Elemente, die die Expression des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts verursachen.

3.2.5.4 Die Expression des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts wird von einer LTR Region reguliert

Nach der Identifikation des Ursprungs des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts wurden nun die regulatorischen Elemente näher untersucht. Die Region des nicht-kanonischen Transkriptionsstartes liegt -6.5 kb stromaufwärts des normalen, myeloiden Transkriptionsstartes. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Constanze Bonifer wurde mittels DNase Hypersensibilitätsexperimenten untersucht, ob diese Region im Hodgkin Lymphom zugänglich für Transkriptionsfaktoren ist. Dabei zeigte sich, dass zwei DNaseI Restriktionsstellen nur in Hodgkin Lymphom Zelllinien zugänglich sind, da sie eine höhere Bandenintensität aufwiesen (**Abb. 3.45**).

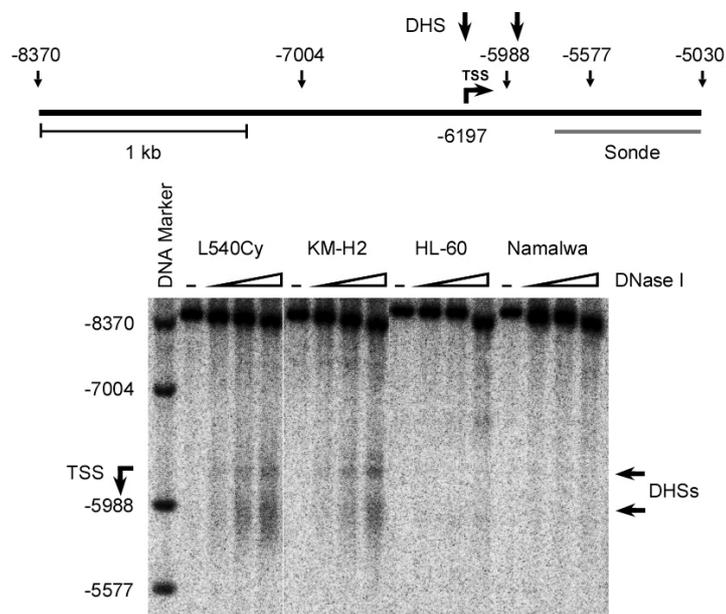


Abbildung 3.45: Die Region des nicht-kanonischen Transkriptionsstartes in HRS Zellen enthält zwei DNaseI Hypersensibilitätsstellen (DHS). DHS Analysen der chromosomalen Regionen rund um den Transkriptionsstart des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts in HRS (L540Cy, KM-H2), myeloiden (HL-60) und der Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinie Namalwa. Die Zelllinien wurden jeweils mit steigenden Konzentrationen der DNase I behandelt. Das oben dargestellte Schema skizziert die Position der Restriktionsstellen der verwendeten Restriktionsenzyme, der Transkriptionsstartstelle (TSS) des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts und die Position der radioaktiv markierten Sonde. Die Ziffern sind dabei relativ zum ATG Translationsstart der *CSF1R* Sequenz im genomischen Kontext. Die DHS Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Constanze Bonifer in Leeds, UK angefertigt.

Ergebnisse

In HL-60 Zellen und in Namalwa Zellen ist das Chromatin in dem Bereich des Transkriptionsstarts des nicht-kanonischen Transkripts dagegen dicht gepackt und für DNase und damit auch für Transkriptionsfaktoren nicht zugänglich.

Die untersuchte Sequenz -6.5 kb stromaufwärts des myeloiden Transkriptionsstarts wurde mit dem humanen Genom verglichen. Die Analyse ergab, dass sich unmittelbar in der Umgebung der Startstelle des nicht-kanonischen Transkripts ein 'Long-Terminal Repeat' (LTR) Element der MaIR Familie – namentlich THE1B – befindet (**Abb. 3.46**). LTR Elemente sind Sequenzen von endogenen Retroviren oder Retrotransposons und weisen auf frühere Integrationsstellen hin [221]. Obwohl LTR Elemente in mehreren tausend Kopien im Genom vorkommen, ist über Ihre Funktion bisher wenig bekannt. Sie besitzen funktionale Promotorelemente und werden in normalen Zellen durch verschiedene Mechanismen still gelegt [222]. Sequenzanalysen des THE1B Elements im Bereich der nicht-kanonischen Startstelle von *CSF1R* im Hodgkin Lymphom zeigten, dass sich dort mehrere potentielle Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren befinden, welche im Hodgkin Lymphom konstitutiv aktiv sind (z.B. NF- κ B, AP1, GATA) [121] (**Abb. 3.46**).

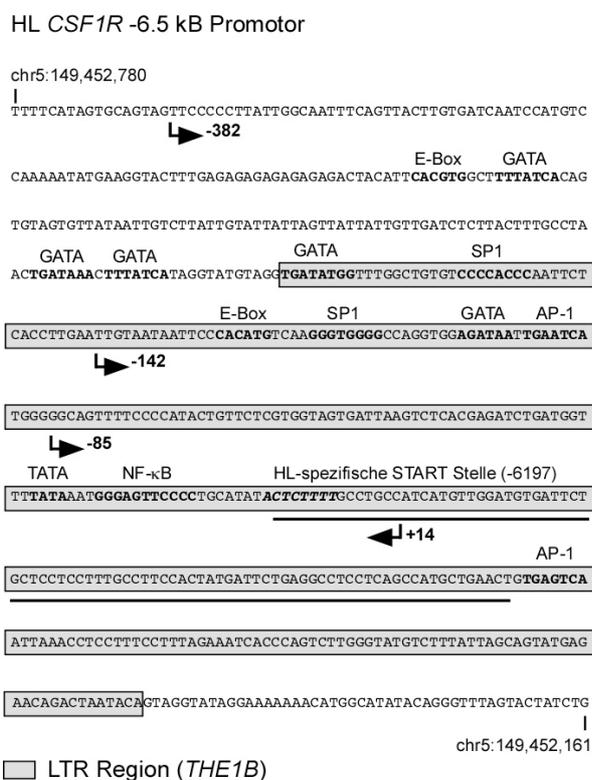


Abbildung 3.46: Sequenz des Transkriptionsstarts des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts mit den verschiedenen potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Der graue Kasten repräsentiert die THE1B LTR Sequenz. Die Pfeile markieren die Länge der drei Konstrukte, die für Reporterexperimente genutzt wurden. Die Zahlen sind dabei relativ zur Transkriptionsstartstelle des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts.

Ergebnisse

Für die Analyse der potentiellen Promotorfunktion wurden drei verschieden lange Teilbereiche des LTR Elements in einen Firefly Luciferase basierten Reportervektor kloniert. Die verschiedenen Reportergenkonstrukte enthielten eine unterschiedliche Anzahl der in der gesamten Sequenz enthaltenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Die jeweiligen Abschnitte sind in **Abbildung 3.46** mit Pfeilen markiert.

Die drei Reportergenkonstrukte wurden in verschiedene Hodgkin Lymphom Zelllinien transfiziert. Das Expressionsplasmid 'pGL2 Promotor' diente als Positivkontrolle und enthielt den SV40 Promotor und zeigte in allen verwendeten HRS Zelllinien (L428, KM-H2, L591, L540Cy) eine Aktivierung der Luciferase Expression. Die maximale Aktivierung der Luciferase Expression konnte in allen vier HRS Zelllinien mit dem mittleren Konstrukt (-142/+14; Zahlen relativ zum Transkriptionsstart des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts) beobachtet werden (**Abb. 3.47**).

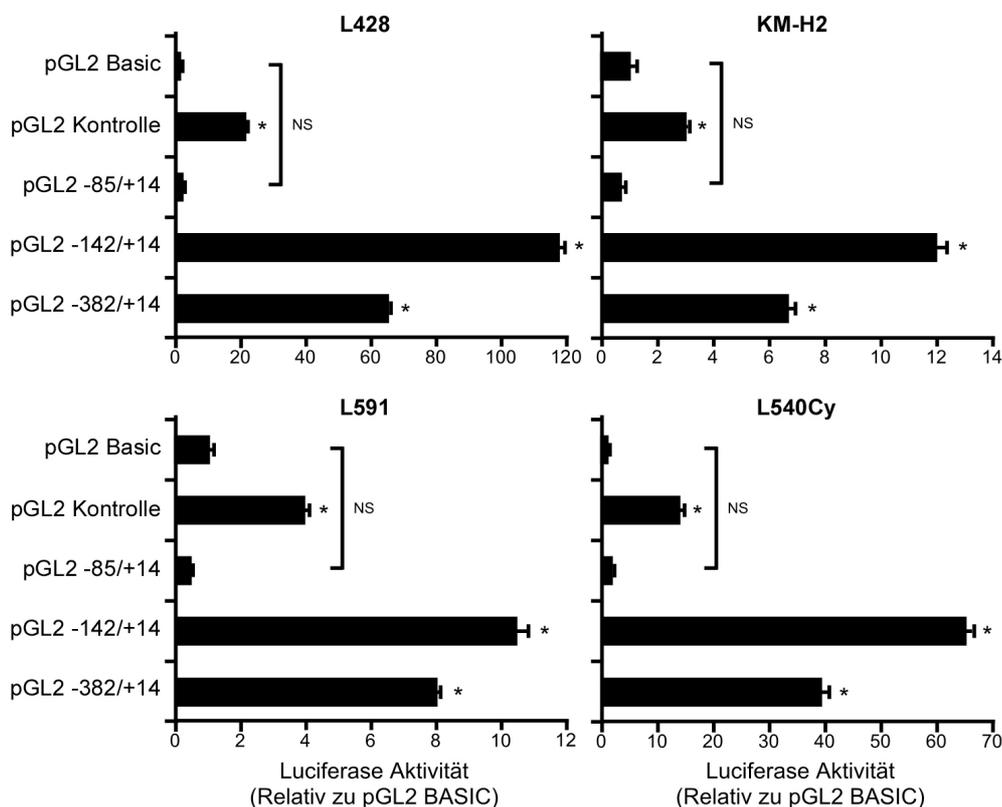


Abbildung 3.47: Die LTR Region des Transkriptionsstarts des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts hat eine Promotorfunktion. Für die Analyse der Promotoraktivität des THE1B LTRs wurden verschiedene lange Teilbereiche der THE1B LTR Sequenz in den pGL2 Basic Firefly Luciferase Vektor kloniert (s. **Abb. 3.46**). Anschließend wurden diese Vektoren zusammen mit einem Plasmid, welches das Gen für eine Renilla Luciferase enthält, in HRS Zelllinien (L428, KM-H2, L591 und L540Cy) ko-transfiziert. Nach 48 h sind die Zellen lysiert und die Mengen der beiden Luciferase indirekt über photometrische Messungen bestimmt worden. Die Triplikate der Firefly Lumineszenzmessungen wurden auf die Renilla Luciferase normalisiert. Werte des leeren pGL2 Basic Vektors sind auf 1 gesetzt und alle anderen Werte als ein Vielfaches davon dargestellt worden. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen der Triplikate. (* – $P < 0.001$ im Vergleich zu leerem pGL2 Control Vektor; NS – nicht signifikant)

Ergebnisse

Die kürzere Variante zeigte keine signifikante Steigerung der Luciferaseinduktion, während das längere Konstrukt eine moderate Steigerung zeigte. Die Ergebnisse waren in allen Zelllinien vergleichbar, unterschieden sich nur in der Ausprägung der Luciferaseinduktion (**Abb. 3.47**).

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, welchen Anteil die einzelnen Transkriptionsfaktorbindungsstellen an der LTR regulierten Expression haben. Dazu wurden in dem Konstrukt mit der maximal aktivierten Promotoraktivität (-142/+14) einige dieser Bindungsstellen durch Punktmutationen einzeln oder in Kombination still gelegt (s. Schema **Abb. 3.48 links**). Die mutierten Konstrukte wurden in L428 und KM-H2 Zellen transfiziert und auf die Expression von Luciferase hin untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Luciferaseexpression bei allen Einzelmutationen, die sich in den L428 Zellen durch die Kombinationen von zwei Faktoren noch synergistisch verstärkte (**Abb. 3.48 rechts**). Unterschiede bestanden zwischen KM-H2 und L428 Zellen in der Höhe der Aktivierung des Reportergens und in der Intensität der Reduktion dieser Aktivierung durch die einzelnen Mutationen. Während in L428 Zellen die Mutation von AP1 alleine die größte Reduktion der Reportergenaktivierung bei den Einzelmutationen verursachte, ist in den KM-H2 Zellen NF- κ B der Faktor mit dem größten Einfluss. Die Kombinationen von Mutationen in der NF- κ B, AP1 bzw. SP1 Bindungsstelle führten zu keiner weiteren Verstärkung der Reduktion der Reportergenaktivierung über das Niveau der NF- κ B Einzelmutation hinaus. In den KM-H2 und L428 Zellen konnte eine synergistische Inhibition der dreifachen Mutation der SP1, AP1 und GATA Bindungsstellen identifiziert werden (**Abb. 3.48 rechts**).

Ergebnisse

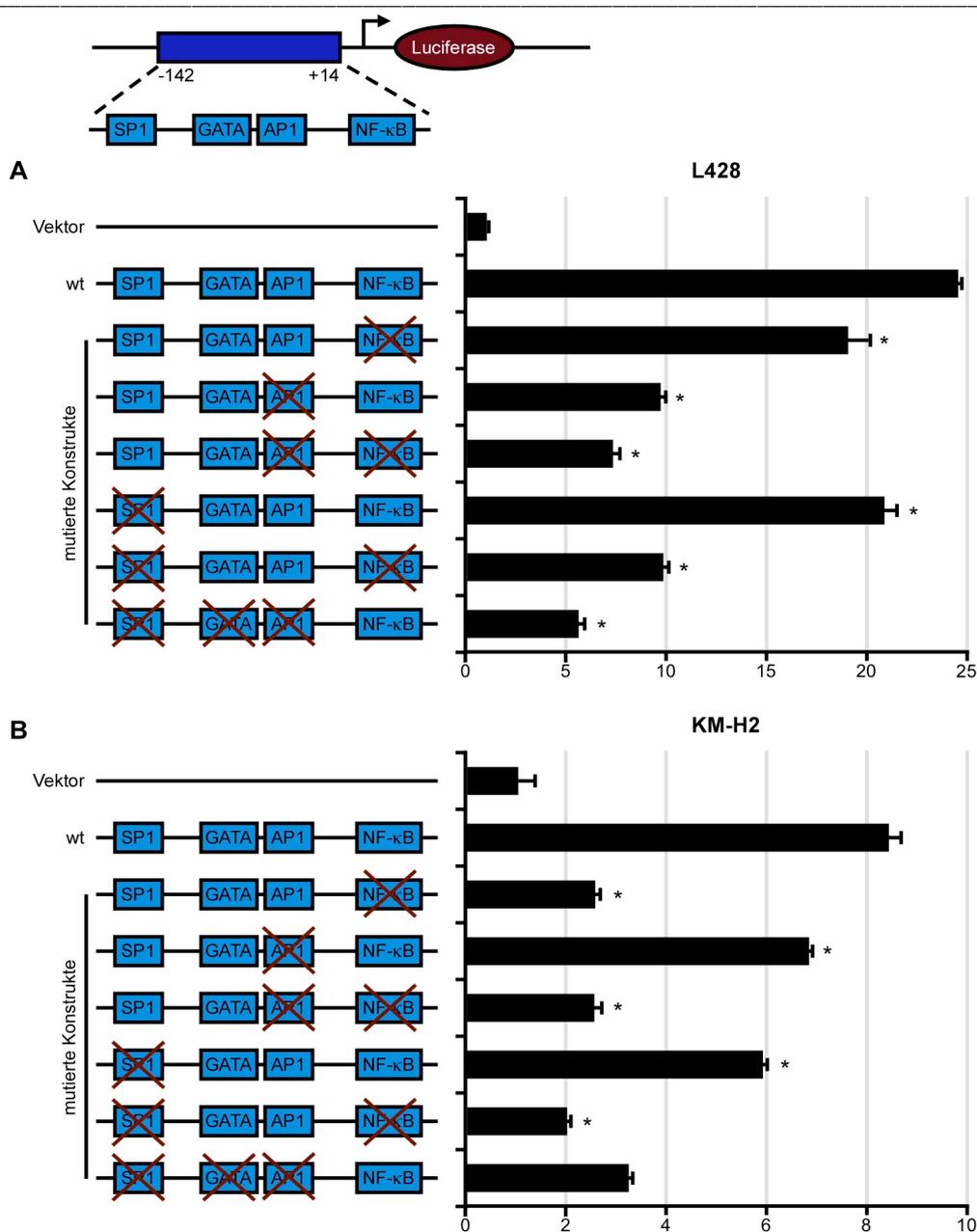


Abbildung 3.48: Die Transkriptionsfaktorbindungsstellen innerhalb der LTR Sequenz des -142/+14 Konstruktes haben Einfluss auf die Reporterogenaktivierung. Für diese Analysen wurden einzelne Transkriptionsfaktorbindungsstellen in der THE1B LTR Region des -142/+14 (s. **Abb. 3.46**) pGL2 Firefly Luciferase Konstruktes mutiert. Diese Konstrukte wurden zusammen mit einem Renilla Luciferase Expressionsplasmid in die HRS Zelllinien L428 (**A**) und KM-H2 (**B**) ko-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und indirekt auf die Expression der beiden Luciferasen photometrisch untersucht. Auf der linken Seite ist die jeweilige Art der Mutation skizziert. Die Triplikate der Firefly Lumineszenzmessungen sind normalisiert auf die Renilla Luciferase. Die Werte des pGL2 Basic Vektors sind jeweils 1 gesetzt und alle anderen Werte als ein Vielfaches davon dargestellt worden. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichung der Triplikate. (* - $P < 0.001$ im Vergleich zu nicht mutiertem Konstrukt; NS - nicht signifikant)

Ergebnisse

3.2.5.5 Epigenetische Modifikationen führen zu einer Aktivierung des LTR getriebenen *CSF1R* Transkripts in Non-Hodgkin Zelllinien

In normalen Zellen sind LTR Elemente unter anderem durch epigenetische Faktoren (DNA Methylierung, Histon Deacetylierungen u.ä.) reprimiert [223]. Daher wurde untersucht, ob epigenetische Veränderungen zu einer Aktivierung des THE1B LTR Elements bzw. zur *CSF1R* Expression in Non-Hodgkin Zelllinien führt. Non-Hodgkin Zelllinien (Reh, Namalwa) sind mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC), einem Inhibitor der DNA Methylierung, und Trichostatin A (TSA), einem Inhibitor von Histon Deacetylasen, allein und in Kombination behandelt worden. In beiden Zelllinien konnte nach der Behandlung eine Induktion des *CSF1R* Transkripts (*CSF1R* +720/+1325) beobachtet werden (**Abb. 3.49**).

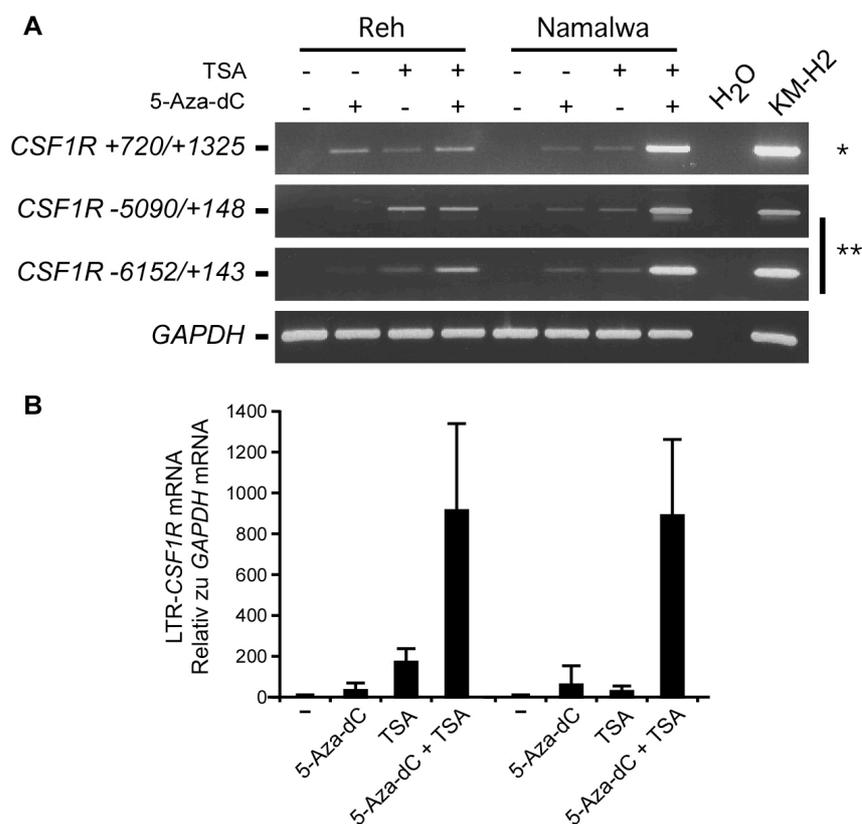


Abbildung 3.49: Die Behandlung von Non-Hodgkin Zellen mit 5-Aza-dC und TSA führt zur Aktivierung des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts. Die Non-Hodgkin Zelllinien Reh und Namalwa wurden mit 5-Aza-dC und/oder mit TSA behandelt. Anschließend wurden jeweils cDNA Synthese durchgeführt. **(A)** In RT-PCR Analysen wurde mit verschiedenen Primerkombinationen die Expression des *CSF1R* mRNA Transkripts untersucht. * - kanonisches *CSF1R* Transkript; ** - nicht-kanonisches *CSF1R* Transkript. H₂O und KM-H2 sind Negativ- bzw. Positivkontrollen. *GAPDH* wurde als Ladekontrolle analysiert. **(B)** Quantitative Real-Time PCR Analysen der (oben) beschriebenen cDNA von behandelten Reh und Namalwa Zellen sind mit dem Primerpaar (-6152/-143) angefertigt worden. Die jeweilige Transkriptmenge wurde dabei auf die *GAPDH* Expression normalisiert. Fehlerbalken repräsentieren ein 95 %-Konfidenzintervall.

Ergebnisse

Die beiden Primerpaare, die spezifisch das nicht-kanonische *CSF1R* Transkript amplifizieren (-5090/+148; -6152/-143), ergaben eine Induktion der *CSF1R* mRNA, sowohl in der RT-PCR als auch in der quantitativen Real-Time PCR für das Primerpaar *CSF1R* -6152/-143. Dabei konnten die *CSF1R* Transkripte in den Ansätzen mit 5-Aza-dC bzw. TSA allein und synergistisch in dem Kombinationsansatz (5-Aza-dC/TSA) identifiziert werden (**Abb. 3.49**).

Die Behandlung mit 5-Aza-dC und/oder TSA wurde zur Kontrolle auch mit einigen Hodgkin Lymphom Zelllinien (L428, L1236, KM-H2, L591 und L540) durchgeführt. Dabei gab es nur eine geringe Induktion des *CSF1R* Transkripts in den Zelllinien, die nur eine geringe *CSF1R* Expression aufweisen (L428, L1236, L591). Die Zellen mit einer hohen konstitutiven *CSF1R* Expression (KM-H2, L540) zeigten keine Veränderung der Expressionsmenge im Vergleich zu unstimulierten Zellen. (**Abb. 3.50**).

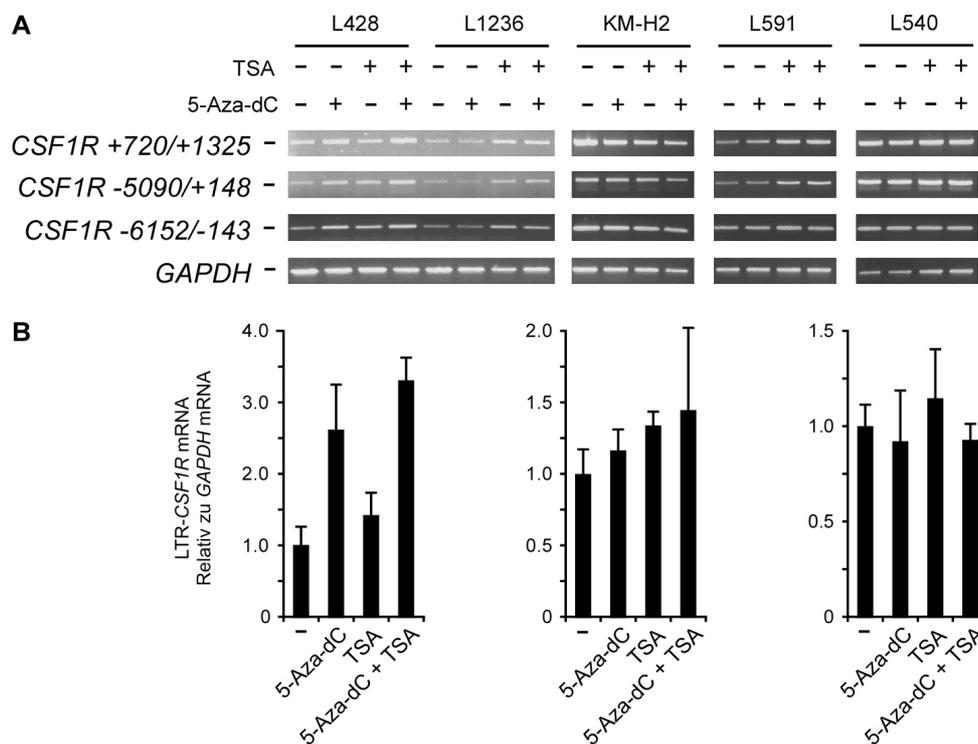


Abbildung 3.50: Die Behandlung von HRS Zellen mit 5-Aza-dC und TSA führt zu geringen Veränderungen der Menge der *CSF1R* Transkripte. Die HRS Zelllinien L428, L1236, KM-H2, L591 und L540 wurden mit 5-Aza-dC und/oder mit TSA behandelt. Anschließend sind jeweils cDNA Synthesen durchgeführt worden. (**A**) In RT-PCR Analysen wurde mit verschiedenen Primerkombinationen die Expression des *CSF1R* mRNA Transkripts untersucht. * - kanonisches *CSF1R* Transkript; ** - nicht-kanonisches *CSF1R* Transkript. *GAPDH* wurde als Ladekontrolle analysiert. (**B**) Quantitative Real-Time PCR Analysen der (oben) beschriebenen cDNA von behandelten L428, KM-H2 und L540 Zellen sind mit dem Primerpaar (-6152/-143) angefertigt worden. Die jeweilige Transkriptmenge wurde dabei auf die *GAPDH* Expression normalisiert. Fehlerbalken repräsentieren ein 95 %-Konfidenzintervall.

Ergebnisse

Durch die Ergebnisse der 5-Aza-dC/TSA Experimente wurde ein Defekt der epigenetischen Repression des THE1B Elements in HRS Zellen vermutet. Daher wurden Daten aus der Literatur und Genchip Experimente analysiert, um evtl. differentiell exprimierte Faktoren zu finden, die an der epigenetischen Modulation beteiligt sind. Analytierte Proteine sind zum Beispiel Mitglieder der HDAC Familie, N-CoR, LSH, DNMT Familienmitglieder, MTG Proteine und Sin3 Familienmitglieder. Von diesen Faktoren war nur das MTG Familienmitglied CBFA2T3 differentiell exprimiert (**Abb. 3.52**). Die Expression von CBFA2T3 und die Konsequenzen daraus werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

3.2.6 Der Verlust der CBFA2T3 Expression ist verantwortlich für die De-Repression des THE1B LTR Elements und die Expression von *CSF1R* im Hodgkin Lymphom

Um die genaue Position der beiden Isoformen von CBFA2T3 (CBFA2T3a und CBFA2T3b) im Western Blot zu identifizieren, wurden die beiden Varianten kloniert und anschließend in HEK293 Zellen transfiziert. In einem weiteren Western Blot sind beide ektoexprimierten Varianten mit endogen exprimiertem CBFA2T3 der Zelllinien SU-DHL-4 und Reh verglichen worden (**Abb. 3.51**). In den folgenden Experimenten wurden diese Ergebnisse genutzt um die endogene Expression der beiden CBFA2T3 Isoformen in weiteren Zelllinien zu beurteilen.

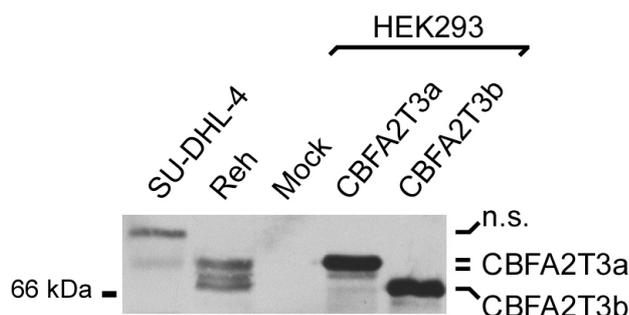


Abbildung 3.51: Positionierung der beiden CBFA2T3 Isoformen im Western Blot. HEK293 Zellen wurden jeweils mit einer der beiden Isoformen von CBFA2T3 transfiziert und 30 µg Gesamtprotein 48 h nach der Transfektion im Western Blot auf die Expression von CBFA2T3 Protein mit einem spezifischen Antikörper analysiert. Die CBFA2T3 exprimierenden Zelllinien SU-DHL-4 und Reh wurden als Vergleich aufgetragen. Eine Transfektion der HEK293 Zellen mit leerem Vektor (Mock) diente als Negativkontrolle.

Die Expression des *CBFA2T3* Gens wurde auf mRNA Niveau in verschiedenen Hodgkin Lymphom und Non-Hodgkin Zellen untersucht. Es ergab sich eine deutliche Reduktion

Ergebnisse

(KM-H2, L591) oder sogar ein Verlust des Transkripts in den HRS Zellen (L428, L1236, HDLM-2, L540, L540Cy). In den Non-Hodgkin B-Zelllinien (Reh, Namalwa, BL-60, BJAB, SU-DHL-4), der multiplen Myelom Zelllinie MM1.S und primären CD19⁺ B-Zellen konnte eine deutliche Expression von *CBFA2T3* mRNA detektiert werden. Das Ergebnis konnte auf Proteinebene in einem Western Blot Experiment mit einem Antikörper spezifisch für beide *CBFA2T3* Isoformen bestätigt werden (**Abb. 3.52**).

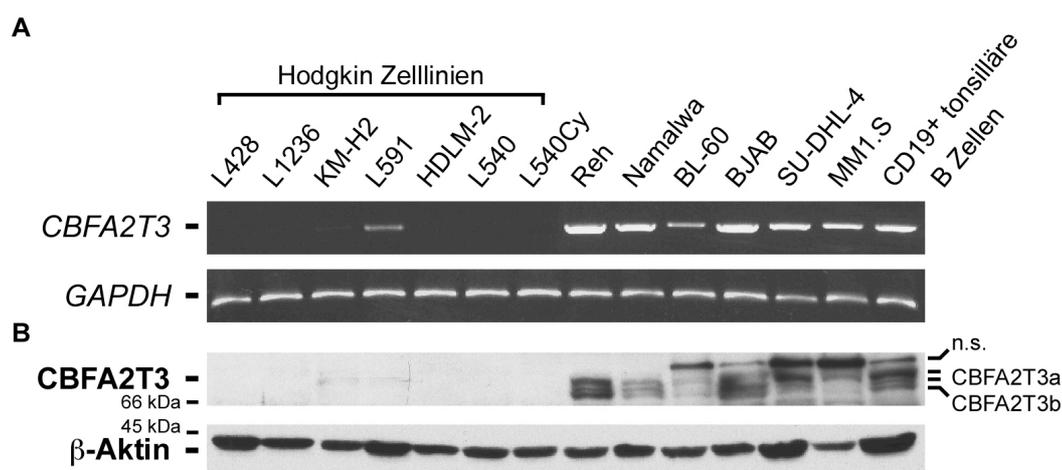


Abbildung 3.52: *CBFA2T3* Expression ist differentiell reduziert in HRS Zelllinien. **(A)** RT-PCR Analysen von cDNA der HRS (L428, L1236, KM-H2, L591, HDLM-2, L540 und L540Cy), prä-B-Zell Leukämie (Reh), Non-Hodgkin Lymphom B-Zelllinien (Namalwa, BJAB, BL-60, SU-DHL-4), Multiplen Myelom (MM1.S) Zelllinien sowie CD19⁺ primären B-Zellen mit Primern spezifisch für *CBFA2T3* mRNA. *GAPDH* Expression diente als Kontrolle. **(B)** Aus den (oben) beschriebenen Zelllinien wurden 30 μ g Gesamtprotein mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Mit einem spezifischen Antikörper gegen *CBFA2T3* wurde die Expression von *CBFA2T3* in den Zelllinien untersucht. Die Expression von β -Aktin wurde als Ladekontrolle analysiert.

Die Ursache für die verminderte *CBFA2T3* Expression in den HRS Zellen wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Reiner Siebert in Kiel untersucht. Dort wurden die DNA-Methylierungszustände der Promotoren beider *CBFA2T3* Isoformen analysiert. Es wurden insgesamt 29 CpG Inseln in den regulatorischen Elementen gefunden und auf ihre Methylierung hin untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass in den Linien HDLM-2, L428, L1236 und L540 mindestens 22 CpGs mit mehr als 50 % methyliert sind. In den Zelllinien KM-H2 und L591, die eine schwache *CBFA2T3* Expression aufwiesen, ist der Promotorbereich der kurzen Variante methyliert, während die lange Variante weniger stark methyliert ist (**Abb. 3.53**).

Ergebnisse

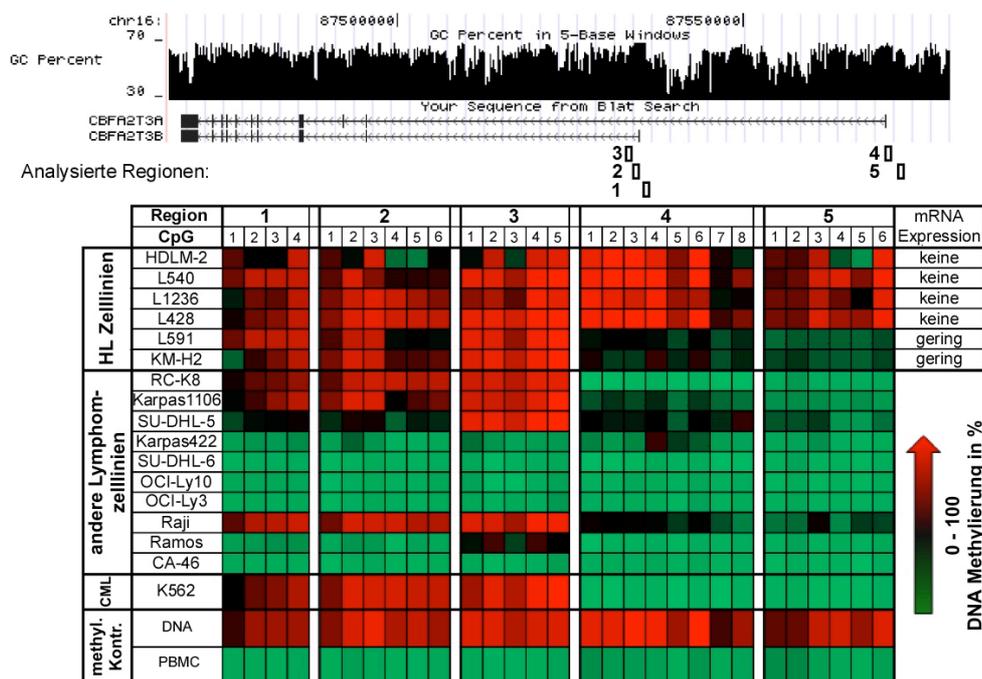


Abbildung 3.53: Die Promotorbereiche der CBFA2T3 Isoformen weisen eine starke DNA-Methylierung in den HRS Zelllinien auf. (**unten**) Bisulfit Pyrosequenzierung der CpG Inseln in dem Promotorbereich der kurzen und der langen CBFA2T3 Isoform in verschiedenen lymphatischen und leukämischen Zelllinien. Die insgesamt 29 CpG Inseln wurden in fünf Regionen analysiert, von denen die Regionen eins bis drei für die Expression der kurzen Variante verantwortlich sind und vier und fünf die lange Variante regulieren (s. Schema **oben**). Die Methylierungskontrolle DNA stellt die durchschnittlich mögliche Methylierung an dieser DNA Sequenz dar. Die Methylierungskontrolle PBMC ist der durchschnittliche Methylierungszustand in gesammelten PBMC von freiwilligen Spendern an dieser Sequenz. Die Bisulfit Pyrosequenzierung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Reiner Siebert in Kiel durchgeführt.

Als Kontrolle wurden Non-Hodgkin Zelllinien untersucht, die fast alle unmethylierte Promotorbereiche aufwiesen. Ausnahmen waren hier die Linien RC-K8, Karpas 110, Raji, K562 und SU-DHL-5, bei denen in der kurzen Variante eine mittlere bis starke Methylierung detektiert werden konnte (**Abb. 3.53**). Diese Analysen zeigten, dass die Expression von *CBFA2T3* im Hodgkin Lymphom wahrscheinlich durch eine Hypermethylierung reprimiert ist. In den anderen Tumorentitäten ist die Expression zumindest der langen Variante noch möglich.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Harald Stein wurde die Expression von *CBFA2T3* in mehreren Proben von Lymphompatienten untersucht. Diese Analysen bestätigten die Daten aus den Zelllinien und zeigten keine Expression von *CBFA2T3* in den HRS Zellen der Hodgkin Fälle. Eine robuste Expression konnte in diffus großzelligem B-Zell Lymphom (DLBCL), B-Zell chronische lymphoblastische Leukämie (B-CLL) und Mantel Zell Lymphom (MCL) Patienten sowie in Tonsillen Proben detektiert werden (**Abb. 3.54**).

Ergebnisse

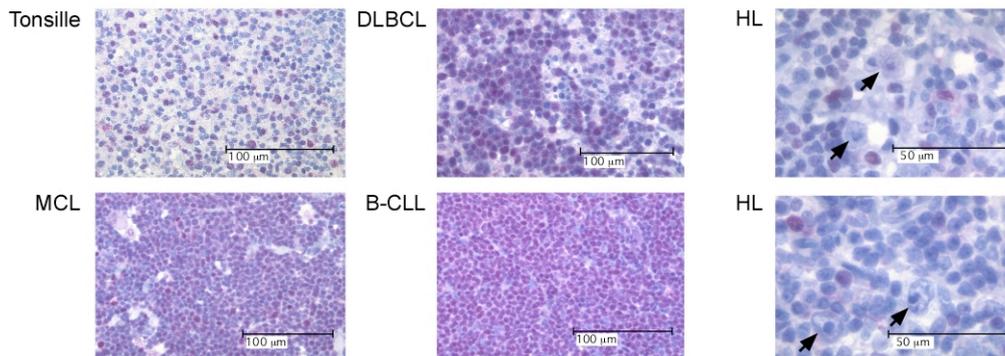


Abbildung 3.54: CBFA2T3 ist in den Tumorzellen von primären Hodgkin Lymphom Fällen nicht exprimiert. Immunhistochemische Analysen der CBFA2T3 Expression in Tonsillen, DLBCL, MCL, B-CLL und zwei Hodgkin Lymphom (HL) Proben. Gefrierschnitte der verschiedenen Proben wurden dabei mit einem spezifischen Antikörper gegen CBFA2T3 gefärbt und mittels der 'Alkaline Phosphatase anti-alkaline Phosphatase' Methode und FastRed als Chromogen sichtbar gemacht. Die Pfeile markieren HRS Tumorzellen. Die Färbungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Harald Stein, Berlin durchgeführt.

Der funktionelle Zusammenhang zwischen der fehlenden Expression von CBFA2T3 und der aberranten Expression von CSF1R, getrieben durch das THE1B LTR Element, wurde in einem shRNA Experiment untersucht. Dabei ist die Non-Hodgkin prä-B-Zell Leukämie Zelllinie Reh mit einer shRNA transfiziert worden, die die Expression von CBFA2T3 inhibieren soll. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem GFP Expressionsplasmid transfiziert und die lebenden, GFP positiven Zellen wurden nach 72 h durchflusscytometrisch aufgereinigt. Zur Kontrolle der shRNA vermittelten Verminderung der CBFA2T3 Expression wurde aus diesen Zellen Protein präpariert und auf das Expressionsniveau von CBFA2T3 analysiert, welches eine robuste aber nicht vollständige Abnahme der Expression zeigte. Daten aus RT-PCR und Real-Time PCR Analysen von diesen Zellen zeigten eine schwache Induktion des THE1B LTR getriebenen *CSF1R* Transkripts (**Abb. 3.55a und d**).

Ergebnisse

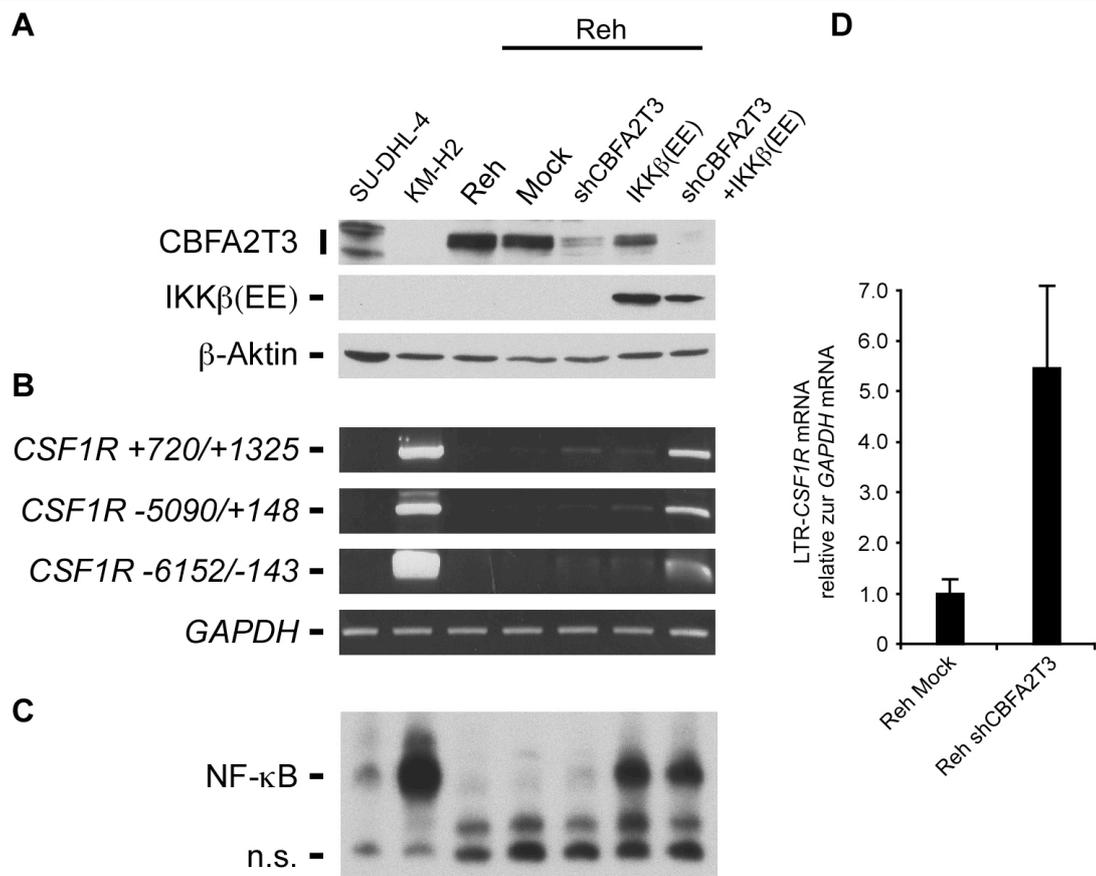


Abbildung 3.55: Die Herunterregulierung von CBFA2T3 und die Aktivierung von NF- κ B in der Non-Hodgkin B-Zell Leukämie Zelllinie Reh führt zur Expression des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts. Reh Zellen wurden mit einer shRNA gegen beide Isoformen von *CBFA2T3* und mit einem konstitutiv aktiven IKK β (EE) Konstrukt (enthält zusätzlich ein Flag-Tag) allein und in Kombination transfiziert. Zusätzlich wurde in alle Ansätze GFP ko-transfiziert. Nach 48 h sind die lebenden, GFP positiven Zellen durchflusscytometrisch aufgereinigt worden. Die Zellen der Mock Kontrolle wurden mit einer unspezifischen shKontrolle bzw. leerem Vektor transfiziert. **(A)** Western Blot Analysen mit 25 μ g Gesamtprotein der aufgereinigten Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen CBFA2T3 und dem Flag-Tag zum Nachweis der CBFA2T3 bzw. IKK β (EE) Expression. Die Expression von β -Aktin wurde als Ladekontrolle analysiert. **(B)** Mittels RT-PCR Analysen wurde die cDNA der aufgereinigten Zellen mit verschiedenen Primerkombinationen auf die Expression der *CSF1R* mRNA hin untersucht (Primerpositionen s. **Abb. 3.40**). *GAPDH* Expression diente als Ladekontrolle. **(C)** Die NF- κ B Aktivität wurde mittels EMSA analysiert. Dazu wurden 10 μ g Gesamtprotein der jeweiligen Ansätze mit einer radioaktiv markierten Sequenz der NF- κ B Bindungsstelle inkubiert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht (n.s. – nicht spezifisch). Die SU-DHL-4, KM-H2 und Reh Zelllinien wurden jeweils als Kontrollen mitgeführt. **(D)** Die cDNA der Reh Zellen, transfiziert mit shCBFA2T3 allein, wurde in quantitativen Real-Time Analysen mit einem Primerpaar spezifisch für die Expression des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts (Primerpaar *CSF1R*-6152/-143) analysiert. Als Vergleich diente cDNA der Reh Zellen transfiziert mit der Kontroll-siRNA. Die *CSF1R* Transkripte wurden mit der Messung der *GAPDH* Expression normalisiert. Die Standardabweichung repräsentiert ein 95 %-Konfidenzintervall.

Für eine vollständige Aktivierung des THE1B LTR Lokus sind verschiedene Transkriptionsfaktoren nötig, wie die Reporterstudien in **Kapitel 3.2.5.4** gezeigt haben. Einer der konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktoren in HRS Zellen ist NF- κ B [121].

Ergebnisse

Durch Klonierung und Mutation der I κ B Kinase β (IKK β) wurde eine konstitutiv aktive IKK β (EE) erzeugt, die zu einer Induktion der NF- κ B Aktivität in den transfizierten Zellen führt [199]. IKK β (EE) wurde allein und zusätzlich zur shRNA gegen CBFA2T3 in die Reh Zellen transfiziert. Die Expression von IKK β (EE) ist über einen FLAG Tag in einem Western Blot kontrolliert und die Aktivität von NF- κ B in einem EMSA analysiert worden. In dem Doppelansatz konnte dadurch in den Reh Zellen eine Situation erzeugt werden, wie sie zumindest für NF- κ B und CBFA2T3 auch in Hodgkin Zellen vorliegt (vgl. KMH2 Zellen mit Reh shCBFA2T3+ IKK β (EE) in **Abb. 3.55a - c**). RT-PCR Analysen zeigten in den Reh Zellen durch die Transfektion von shCBFA2T3 und IKK β (EE) eine synergistische Aktivierung des THE1B LTR getriebenen *CSF1R* Transkripts (**Abb. 3.55a**). Quantitative Real-Time PCR Experimente bestätigten die Aktivierung des nicht-kanonischen Transkripts durch die Verminderung der CBFA2T3 shRNA allein (**Abb. 3.55d**).

Abschließend kann festgestellt werden, dass für die Expression von *CSF1R* im Hodgkin Lymphom eine aberrante Aktivierung des THE1B LTR Elements verantwortlich ist. Die Abwesenheit von CBFA2T3 als Ko-Repressor ist an der Aktivierung dieser THE1B LTR Region beteiligt.

4 Diskussion

Die aberrante Expression von Cytokinen und deren Rezeptoren wird in verschiedenen Tumorentitäten als eine der Ursachen für die Transformation, das Überleben und die Metastasierung von entarteten Zellen beschrieben [224,225,226,227,228]. Ein besonderes Beispiel der Expression von linien-fremden Cytokinen ist das klassische Hodgkin Lymphom. Die ursprünglich von B-Zellen abstammenden Tumorzellen exprimieren eine Vielzahl von B-Zell-fremden Cytokinen und Rezeptoren, während B-Zell-spezifische Gene nicht mehr exprimiert werden [121,192].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die pathologischen Konsequenzen sowie die Ursachen der Expression linien-fremder Cytokin-/Rezeptorsysteme in HRS Zellen des Hodgkin Lymphoms untersucht. Dabei wurden das T-Zell-spezifische Cytokin IL-21 und das myeloide Cytokin-/Rezeptorsystem CSF-1/CSF1R näher charakterisiert. Aufgrund der Seltenheit der HRS Zellen im Tumorgewebe ist es technisch schwierig, eine ausreichend große Population von Tumorzellen für Experimente zur funktionellen Charakterisierung von Cytokin-/Rezeptorsystemen zu isolieren. Auch Experimente mit Mäusen konnten nicht durchgeführt werden, da ein geeignetes Modell für das Hodgkin Lymphom nicht zur Verfügung steht. Zur funktionellen Charakterisierung der Expression linien-fremder Gene im Hodgkin Lymphom sind daher in dieser Arbeit überwiegend Zelllinien genutzt worden. Wenn möglich, wurden die Ergebnisse aus Expressionsstudien in Tumorproben von Hodgkin Lymphom Patienten validiert. Die Diskussion der einzelnen Ergebnisse erfolgt aus Übersichtsgründen getrennt für beide Cytokine.

4.1 Pathologische Konsequenzen linien-fremder Signalwege im Hodgkin Lymphom

4.1.1 IL-21/IL-21R

In dieser Arbeit konnte die linien-fremde differentielle Expression von IL-21 in dem von B-Zellen abstammenden Hodgkin Lymphom demonstriert werden. Die Expression von IL-21 in den HRS Zellen wurde parallel auch in anderen Arbeiten bestätigt [172]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-21 in den betroffenen Lymphknoten von Hodgkin Patienten auf die Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms beschränkt ist. Die gleichzeitige Expression des IL-21R in den HRS Zellen war nicht ausschließlich auf die HRS Zellen beschränkt, deutet jedoch auf eine potentiell autokrine Aktivierung von IL-21R Signalwegen im Hodgkin Lymphom hin. Durch Stimulation mit rekombinantem IL-21

Diskussion

in Zelllinien, die nur eine geringe oder keine Cytokinexpression aufwiesen, konnte eine Funktionalität des Signalweges durch die Phosphorylierung von STAT3 sowie die Induktion von verschiedenen Zielgenen durch rhIL-21 nachgewiesen werden. Die autokrine Stimulation von IL-21 ist wahrscheinlich eine der Ursachen für die konstitutive Phosphorylierung von STAT3 in Zellen, die IL-21 und IL-21R exprimieren, wie durch Experimente mit einem IL-21R:Fc Konstrukt gezeigt werden konnte. Die spezifische Blockade von IL-21 durch IL-21R:Fc in HRS Zellen, die Cytokin und Rezeptor exprimieren, führte zu einer Reduzierung der konstitutiven STAT3 Aktivität und einer verminderten Expression der STAT3 Zielgene *MCL-1* und *IL-6*. Die Ergebnisse verstärken damit die These der autokrinen Stimulation von IL-21 in HRS Zellen. Die IL-21 vermittelte Aktivierung von STAT3 Zielgenen mit einer anti-apoptotischen Funktion, wie *MCL-1* [229], deutete auf eine Funktion von IL-21 bei Wachstum und Überleben der HRS Zellen hin. Für eine HRS Zelllinie (HDLM-2) konnte ein Schutz der HRS Zellen vor CD95 induzierter Apoptose durch die Überleben sichernde Funktion für IL-21 nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Beitrag zum Schutz vor der induzierten Apoptose der HRS Zellen *in vivo* kann hier nur vermutet werden.

Eine weitere Ebene der Betrachtung von linien-fremden Proteinen im lymphatischen System, neben der Wirkung auf die Tumorzellen selber, ist der Effekt auf die umgebenen Zellen. In dieser Arbeit konnte neben der Sekretion von IL-21 auch die Sekretion der IL-21 Zielgene IL-6 und MIP-3 α gezeigt werden. Für IL-6 und MIP-3 α sind pleiotrope Effekte auf ihre Zielzellen bekannt, die im Folgenden kurz erläutert und auf ihre mögliche Funktion für die HRS Zellen betrachtet werden.

IL-6 hat durch die Aktivierung von Signalwegen wie STAT3 proliferative Effekte auf hämatopoetische Vorläuferzellen, Megakaryozyten, T-Zellen, aber auch auf Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems. IL-6 ist zusätzlich an der Differenzierung von Makrophagen und cytotoxischen B-Zellen beteiligt [230,231]. Für IL-6 ist eine IL-6 Rezeptorexpression auf den HRS Zellen gezeigt [232]. Eine autokrine Schleife durch IL-6 in den HRS Zellen konnte bisher *in vitro* nicht nachgewiesen werden, was eine Aktivierung *in vivo* zum Beispiel von STAT3 im Zusammenhang mit anderen Ko-Faktoren (wie z.B. IL-21) jedoch nicht ausschließt [174]. Über eine Funktion von IL-6 bei der Komposition des zellulären Umfeldes der HRS Zellen im Hodgkin Lymphom kann hier nur spekuliert werden. Der hohe Anteil gutartiger Zellen im Umfeld von HRS Zellen könnte eventuell auch durch die proliferationsstimulierende Funktion von IL-6 verursacht werden [231].

Das Chemokin MIP-3 α induziert Chemotaxis von verschiedenen T-Zell-Populationen und hat in einigen Tumorentitäten eine autokrine proliferative Wirkung auf Tumorzellen, die

Diskussion

den korrespondierenden Rezeptor CCR6 exprimieren [233,234]. CCR6 wird in den HRS Zellen nicht exprimiert, daher steht hier die extrazelluläre Wirkung auf das Umfeld des Hodgkin Lymphoms im Vordergrund. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MIP-3 α von HRS Zelllinien sezerniert wird und eine Chemotaxis-induzierende Wirkung auf CCR6⁺ T-Zellen hat. Eine Charakterisierung der migrierten Zellen ergab einen T-regulatorischen (T_{Reg}) Phänotyp. T_{Reg}-Zellen im Umfeld der HRS Zellen könnten die Tumorzellen vor einer inflammatorischen Reaktion des Immunsystems schützen. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass T_{Reg}-Zellen häufig in der Nähe von HRS Zellen zu identifizieren sind [206]. Proteine wie IL-7 und Galectin-1, die von den HRS Zellen exprimiert werden, verursachen eine Expansion von T_{Reg}-Zellen [190,235,236]. Gemeinsam mit den Ergebnissen der Chemotaxis-induzierenden Wirkung auf T_{Reg}-Zellen von HRS Zellen durch MIP-3 α in der vorliegenden Arbeit kann also angenommen werden, dass die Zusammensetzung des anti-inflammatorischen Umfeldes der HRS Zellen über die Attraktion und Stimulation des Wachstums von T_{Reg}-Zellen durch verschiedene Cytokine erfolgt. Ein weiterer Hinweis auf die Verschiebung des Gleichgewichts von inflammatorischen zu immunsuppressiven Stromazellen des Hodgkin Lymphoms ist in der Betrachtung der cytotoxischen T-Zellen zu finden. Cytotoxische T-Zellen werden vermutlich durch die CD95L exprimierende HRS Zellen der Apoptose zugeführt. CD95, der korrespondierende Rezeptor zu CD95L, wird zwar auch von HRS Zellen exprimiert, sie sind jedoch vor der Apoptose durch eine erhöhte c-FLIP Expression [162,163] bzw. durch IL-21 und IL-21R Expression geschützt, wie in dieser Arbeit zumindest in einer Zelllinie gezeigt werden konnte.

Über die Funktion von IL-21 selber, bei der Migration von Zellen in das benigne Umfeld der HRS Zellen, kann hier nur aufgrund der Literaturlage spekuliert werden. Für IL-21 ist eine weitere indirekte Induktion der Migration von CD4⁺ T-Zellen durch die Aufrechterhaltung der Expression des Chemokine Rezeptors CCR7 bekannt. CCR7 ist verantwortlich für die, durch das Chemokine CCL21 induzierte, Migration von T-Zellen in die sekundären lymphoiden Organe [237].

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Blockade von IL-21 durch spezifische Antikörper bei einer Spender-gegen-Empfänger-Reaktion ('Graft versus Host disease' (GVDH)) zu einer Verringerung der Sterblichkeitsrate [238] führt. Die Blockade durch inhibitorische Antikörper oder IL-21R:Fc Konstrukte in humanen *ex vivo* Modellen führt beim Morbus Crohn oder der Zöliakie zu einer Verringerung der Symptome [239,240]. Für das Hodgkin Lymphom können die Ergebnisse in dieser Doktorarbeit zur Wirkung von IL-21 auf die HRS Zellen selber, als auch dessen Wirkung auf das zelluläre Umfeld, zu spezifischeren Therapieansätzen führen. Die Inhibition des IL-21 Signalweges, die zur

Diskussion

Herunterregulation von *IL-6*, *MCL-1* und *MIP-3 α* führt, stellt einen Ansatzpunkt für eine therapeutische Anwendung dar. Wenn die *MIP-3 α* Sekretion durch eine Inhibition des IL-21 Signalweges reduziert werden kann, könnte das Verhältnis von T_{Reg} zu Th1 Zellen im Umfeld der Tumorzellen zugunsten der cytotoxischen Th1 Zellen verändert werden. Dies würde vermutlich eine anti-tumorale Reaktion des Immunsystems begünstigen.

4.1.2 CSF-1/CSF1R

Auch für CSF-1 und den korrespondierenden CSF1R konnte eine Expression der B-Zell-fremden Proteine in den HRS Zelllinien gezeigt werden. Die Expression von *CSF1R* mRNA in betroffenen Lymphknoten von Hodgkin Lymphom Patienten wurde ebenfalls in dieser Arbeit demonstriert, während die CSF-1 Expression in primären HRS Zellen des Hodgkin Lymphoms bereits bekannt war [208].

Die Funktionalität von CSF1R in HRS Zellen wurde durch die Phosphorylierung des CSF1R mittels rhCSF-1 Stimulation von HRS Zelllinien, die wenig endogenes CSF-1 exprimieren, demonstriert. Durch die endogene Expression von CSF-1 in den HRS Zelllinien und im primären Patientenmaterial hat die Aktivierung von CSF1R HRS Zellen potentiell eine autokrine Ursache. In dieser Doktorarbeit konnte in den HRS Zelllinien, die CSF-1 und CSF1R exprimieren, ein Hinweis auf eine autokrine Schleife in der konstitutiven Phosphorylierung des CSF1R gefunden werden. Die Steuerung von Proliferation und Überleben als Funktion der CSF-1/CSF1R Expression in HRS Zellen konnte ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt werden. Durch die Stimulation der Proliferation mit rhCSF-1 bzw. die Induktion von Wachstumsarrest und Apoptose durch die Inhibition des CSF-1/CSF1R Signalweges konnte nachgewiesen werden, dass zumindest eine wichtige Aufgabe des fehlenden B-Zell Rezeptors von B-linien-fremden Proteinen *in vitro* in HRS Zellen übernommen werden könnte. In der Literatur wird diskutiert, dass die BZR Funktion in den EBV positiven HRS Zellen durch das EBV Protein LMP2A übernommen werden kann [133,134]. In EBV negativen Fällen könnten Rezeptortyrosinkinasen den BZR ersetzen [121]. Da in den HRS Zellen bisher keine Mutationen in den Genen der Rezeptortyrosinkinasen gefunden werden konnten, wird eine autokrine und/oder parakrine Stimulation vermutet [121]. Die Daten zur Proliferationsinduktion durch CSF-1, zusammen mit der Induktion von Apoptose durch Inhibition des CSF-1/CSF1R Signalweges in HRS Zelllinien in dieser Doktorarbeit, könnten ein Beispiel für die autokrine Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase CSF1R im Hodgkin Lymphom darstellen. Eine Bestätigung dieser These muss aber zum Beispiel durch den Nachweis von

Diskussion

phosphoryliertem CSF1R in HRS Zellen betroffener Lymphknoten von Hodgkin Lymphom Patienten noch erfolgen.

Die Analyse der genauen Signalkaskade des CSF-1/CSF1R im Hodgkin Lymphom ist Aufgabe zukünftiger Studien. Die Aufklärung der Signalkaskade kann Hinweise auf die durch CSF1R regulierten Gene geben und eventuelle weitere therapeutische Ziele aufzeigen. Fehlende Mitglieder in der Signalkaskade in Non-Hodgkin Zelllinien können auch eine Erklärung für die fehlenden Konsequenzen bei den, in dieser Arbeit generierten, Non-Hodgkin Zelllinien mit einer stabilen Expression von CSF1R sein.

Die Sekretion von CSF-1 durch HRS Zellen lässt auf eine Funktion auf das Umfeld der Tumorzellen schließen. Über die Funktion von CSF-1 bei der Migration von Zellen in das benigne Umfeld der HRS Zellen kann hier nur aufgrund von Literaturdaten spekuliert werden. Für CSF-1 ist in diversen Studien gezeigt, dass es eine direkte Induktion der Migration auf myeloide Zellen bewirkt [49,241,242]. Neuere Studien zeigen eine deutlich schlechtere Prognose in Hodgkin Lymphom Fällen mit einem hohen Anteil an Makrophagen im Tumorgewebe [243]. Ob dieser erhöhte Anteil an Makrophagen auf die Sekretion von CSF-1 durch HRS Zellen zurückzuführen ist, muss jedoch noch experimentell gezeigt werden.

Die Ergebnisse der Experimente dieser Doktorarbeit bezüglich CSF-1 und CSF1R könnten auch in zukünftigen Therapieansätzen des Hodgkin Lymphoms Anwendung finden. Die Induktion von Apoptose in HRS Zellen durch Inhibition des CSF-1/CSF1R Signalweges könnte auch bei Hodgkin Lymphom Patienten zu einer Reduktion des Tumors führen. Eine Anwendung von CSF1R inhibierenden Molekülen ist in der Brustkrebstherapie und im Zusammenhang mit tumorassoziierten Makrophagen bei soliden Tumoren in Mausmodellen bereits erfolgreich getestet worden [244,245,246].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IL-21/IL-21R und CSF-1/CSF1R als linien-fremd exprimierte Gene einen Vorteil für HRS Zellen bezüglich Überleben und Wachstum darstellen. Die Beteiligung von IL-21 und CSF-1 an der Komposition des Umfeldes der HRS Zellen im Hodgkin Lymphom ist aufgrund einiger Experimente dieser Doktorarbeit bezüglich des IL-21 Zielgens MIP-3 α , der Literaturlage und der Tatsache, dass beide Cytokine von den HRS Zellen sezerniert werden, sehr wahrscheinlich.

Neben der Erforschung der Konsequenzen einer B-Zell-fremden Expression von Cytokinen und Rezeptoren in HRS Zellen ist es ebenfalls wichtig, die Ursache für die Expression der linien-fremden Gene zu ergründen, um spezifischere Therapien zu entwickeln. Daher beschäftigt sich das folgende Kapitel der Diskussion mit der Regulation

Diskussion

der Expression linien-fremder Proteine im lymphatischen System. In der Doktorarbeit lag der Fokus auf der Regulation der Gene *CSF-1* und *CSF1R* und wird in folgendem Abschnitt diskutiert.

4.2 Regulation der Expression linien-fremder Proteine im Hodgkin Lymphom

Bei der Suche nach der Ursache einer aberranten Expression von Genen, ist die Betrachtung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren dieser Gene ein erster Anhaltspunkt. Die Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Promotorbereich der jeweiligen Gene kann dabei erste Hinweise auf die verantwortlichen Transkriptionsfaktoren liefern. Im Promotorbereich des Gens für das Cytokin CSF-1 sind u.a. NF- κ B Bindungsstellen bekannt [213,215]. Eine konstitutive NF- κ B Aktivität ist ein Merkmal der HRS Zellen des Hodgkin Lymphoms und daher wurde NF- κ B als potentieller Transkriptionsfaktor für die CSF-1 Expression untersucht. Dabei konnte NF- κ B als einer der Faktoren für die CSF-1 Expression identifiziert werden. Die bereits bekannte Assoziation dieses Transkriptionsfaktors mit dem *CSF-1* Gen bei der Regulation von Immunantworten [214] konnte in HRS Zellen durch eine Verringerung der CSF-1 Expression nach Reduzierung der konstitutiven NF- κ B Aktivität bestätigt werden. Die Reduktion der CSF-1 Expression war in keiner der beiden HRS Zelllinien (L428 und KM-H2) vollständig. Dies kann in der restlichen NF- κ B Aktivität oder in der Stabilität des CSF-1 Proteins begründet sein. Auch eine Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren an der Regulation von CSF-1 ist nicht ausgeschlossen, da der Promotorbereich neben NF- κ B auch Bindungsstellen von SP1, AP1, C/EBP, NF-IL6 und weiteren Faktoren enthält [215], von denen einige auch in HRS Zellen aktiviert sind [121].

Die Expression von CSF1R als linien-fremdes Gen war dagegen nicht mit der in der Literatur bekannten Expression der entsprechenden Transkriptionsfaktoren zu erklären. Der Transkriptionsfaktor PU.1, einer der wichtigen Regulatoren für die Expression von *CSF1R*, ist im Hodgkin Lymphom nicht exprimiert [220]. Der Repressor des *CSF1R* Gens PAX5 dagegen ist in einigen Hodgkin Lymphom Zelllinien und in 28 von 31 primären Fällen exprimiert [146,149]. Diese beiden Fakten sprachen gegen eine klassische Regulation der Expression des CSF1R Proteins, wie sie in der Literatur für myeloide Zellen bisher beschrieben ist. Um einen Anhaltspunkt für die potentiell neue Regulation des *CSF1R* Gens zu bekommen, erfolgte die Analyse des Chromatins von HRS Zelllinien im Bereich des klassischen *CSF1R* Promotors hinsichtlich DNase Hypersensibilitätsstellen (DHS) in HRS Zellen. Das Chromatin des CSF1R Promotors der HRS Zellen zeigte einen

Diskussion

inaktiven und für Transkriptionsfaktoren und Faktoren der RNA Transkriptionsinitiation nicht zugänglichen Zustand. Durch Sequenzierung der 5' Enden der *CSF1R* mRNA im Hodgkin Lymphom konnte gezeigt werden, dass das *CSF1R* Transkript im Hodgkin Lymphom nicht von seinem normalen Promotor initiiert wird, sondern 6.5 kb stromaufwärts startet und von einem LTR Element der 'Mammalian apparent LTR Retrotransposon' (MaLR) Familie reguliert wird.

LTR Elemente sind Sequenzen, die bei einer Integration von Retroviren oder Retrotransposons im Genom übrig geblieben sind. Das menschliche Genom besteht zu 7 % - 8 % aus nahezu kompletten, aber nicht infektiösen retroviralen Elementen, die neben zwei LTR Regionen die Gene für den Virusbau *gag*, *pro*, *pol* und *env* enthalten [247,248]. Die heute im menschlichen Genom vorkommenden Viren nennt man endogene Retroviren (HERV) und sie sind evolutionär bis zu mehreren Millionen Jahren zurückzuverfolgen. In einigen Fällen können Proteine von HERVs während dieser Zeit auch eine Funktion für den menschlichen Organismus übernommen haben. Das Gen für das Protein Syncytin-1 wird im Trophoblasten exprimiert und ist für die Formation des Syncytiums in der Plazenta verantwortlich. *Syncytin-1* ist das *env* Gen einer stabilen, endogenen, retroviralen Integration, die bereits seit 44 Mio. Jahren existiert [249].

Bei einem Transposonereignis kann es auch zu einer Rekombination von zwei LTR Elementen kommen, wobei am Ursprungsort ein einzelnes LTR übrig bleibt [248]. Die LTR Regionen sind für den Virus ein wichtiger Bestandteil bei der Genregulation. Sie können zum Beispiel Sequenzen enthalten, die homolog zu Transkriptionsfaktor-bindungsstellen sowie TATA Boxen im menschlichen Genom sind und zur Initiation der Expression von viralen Genen im Wirtsgenom führen [248]. Das eukaryotische Genom ist gegen die ungewollte Genregulation durch LTR Elemente über verschiedene Mechanismen geschützt. Dazu zählen epigenetische Mechanismen, wie zum Beispiel die DNA Methylierung, aber auch RNA Interferenz und Repeat induzierte Punktmutation [250,251]. In der Literatur wird diskutiert, ob die Methylierungsmaschinerie ihren evolutionären Ursprung in der Funktion der Kontrolle von HERVs hat [252].

Systembiologische Analysen haben gezeigt, dass retrovirale Sequenzen und LTR Elemente weniger innerhalb und in unmittelbarer Umgebung von Genen zu finden sind, als im Vergleich zu anderen Teilen des Genoms. Integrationen in der Nähe von Genen sind überwiegend junge Integrationen, die erst seit wenigen Generationen bestehen [221]. In der Literatur wird daher ein Selektionsdruck postuliert, der dafür sorgt, dass nur solche Elemente im Genom stabil über eine lange Zeit integriert bleiben, die sich vorteilhaft oder zumindest nicht nachteilig auf die normale Genexpression auswirken [248].

Diskussion

Seit mehr als 30 Jahren wird die Beteiligung von viralen Elementen an der Entstehung und Pathogenese von Krankheiten diskutiert. Die Entdeckung von Viren als potentielle Ursachen für bestimmte Tumorarten, wie zum Beispiel humane Papillomaviren beim Zervixkarzinom [253], aber auch EBV im Hodgkin Lymphom [121], führte dazu, dass auch eine Beteiligung von endogenen Retroviren an der Entstehung von Tumoren vermutet wurde [254]. Bei allen, bisher im Zusammenhang mit Tumorentitäten gefundenen, HERV Proteinexpressionen konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die HERV Proteine Ursache oder Konsequenz der Erkrankung bzw. Fehldiagnosen waren [248,254].

Die Regulation von Genen bzw. von Spleißvarianten durch LTR Elemente ist dagegen in einigen Fällen in der Literatur beschrieben [248]. Dabei können die LTR Elemente sowohl als Promotoren dienen, wie im Falle der Amylaseproduktion in Speicheldrüsen [255] oder auch als Enhancer Elemente für den eigentlichen Promotor, wie bei dem Apolipoprotein C-I [256]. Solche Regulationen von Genen können auch über einen großen genomischen Abstand hinweg erfolgen (mehr als 100 kb) [222]. Eine Aktivierung von Proto-Onkogenen im humanen Genom ist jedoch bis jetzt nicht bekannt [248].

Das in dieser Arbeit detektierte LTR Element THE1B ist seit 1993 in der MaLR Familie von LTR Elementen klassifiziert und kommt mit tausenden Kopien im gesamten Genom vor [257]. Es enthält keinerlei virale Proteine, einige LTRs umschließen jedoch einen ORF der für eine Integrase von Retrotransposons codiert. Als Retrotransposons werden verstümmelte Retroviren bezeichnet, die nicht in der Lage sind komplette infektiöse Virions zu bilden. Sie nutzen die LTR Region sowohl als Integrationsstellen durch homologe Rekombination als auch als Promotoren [257]. In dieser Doktorarbeit konnte eine Kopie der THE1B Sequenz im Bereich des nicht-kanonischen Transkriptionsstarts des *CSF1R* Gens in HRS Zellen identifiziert werden. Luciferasereporterexperimente demonstrierten eine Promotoraktivität der THE1B Region in den HRS Zelllinien. Durch die Mutation der entsprechenden Bindungsstellen in der THE1B Sequenz konnten die, an der Expression beteiligten, Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Es hat sich gezeigt, dass die im Hodgkin Lymphom aktiven Faktoren NF- κ B, AP-1 und SP1 die Aktivität des THE1B LTR Promotors in den HRS Zellen hochregulieren. Sie tragen damit vermutlich auch zur aberranten Expression der *CSF1R* mRNA in HRS Zellen von diesem LTR Promotor aus bei.

Die differenzierte Expression des aberranten *CSF1R* Transkripts in den HRS Zellen wurde in dieser Arbeit durch den Vergleich von primären Tonsillen aus Hodgkin Patienten mit Tonsillen aus Patienten ohne maligne Erkrankungen sowie primären myeloiden CD33⁺ Zellen aus gesunden Spendern gezeigt. Die Tonsillen von Patienten mit keiner malignen Erkrankung enthalten eine ähnliche Zellkomposition wie Tonsillen von Hodgkin Patienten

Diskussion

mit Ausnahme der HRS Zellen, während die myeloiden CD33⁺ Zellen die klassische Regulation des *CSF1R* Gens aufweisen. So kann demonstriert werden, ob die aberrante Regulation des *CSF1R* Transkripts einzigartig in den HRS Zellen ist oder auch bei der klassischen Regulation in einer der in Tonsillen vorkommenden Zelltypen vertreten ist. In den RNA Proben aus tonsillären Zellen von Patienten ohne maligne Erkrankung und in RNA aus frisch isolierten und aufgereinigten CD33⁺ Zellen konnten kanonische *CSF1R* Transkripte, reguliert durch den klassischen Promotor, identifiziert werden. Es wurden jedoch keine nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripte, die durch die THE1B LTR Region reguliert wurden, nachgewiesen. Dies verstärkte die These, dass die Aktivierung des *CSF1R* Transkripts durch die THE1B LTR Region im Hodgkin Lymphom auf die Tumorzellen beschränkt ist und ein Merkmal der HRS Zellen darstellt.

Eine linien-fremde Expression des CSF1R Proteins konnte im anaplastisch großzelligen Lymphom (ALCL) gezeigt werden [209]. Bei dieser Entität wird die Expression zumindest teilweise durch das THE1B LTR Element reguliert, was durch die Expression des nicht-kanonischen Transkripts demonstriert wurde (**Abb. 3.43**). Trotzdem bleibt die Expression auf distinkte Lymphomarten beschränkt. Andere getestete Lymphome wie follikuläres Lymphom, diffus großzelliges Lymphom und Mantelzell Lymphom waren dagegen negativ für das aberrante CSF1R Transkript. Bei der klinischen Diagnose phänotypisch ähnlicher Entitäten könnten solche unterschiedlichen Transkripte ein entscheidendes und leicht zu detektierendes Unterscheidungsmerkmal darstellen.

Bei der Suche nach der Ursache für die Deregulation des THE1B LTR Elementes in malignen Zellen kommen mehrere Mechanismen in Betracht. Neben der RNA Interferenz sind auch Repeat induzierte Mutationen und epigenetische Mechanismen für die Stilllegung von LTR Regionen im Genom verantwortlich [250,251]. Die alleinige Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und SP1 ist nicht ausreichend, um die Aktivierung des LTR Transkripts zu erklären, da diese Faktoren zumindest teilweise in anderen Entitäten aktiv sind. Eine NF- κ B Aktivität ist zum Beispiel für Subtypen des diffus großzelligen B-Zell Lymphoms (DLBCL) gezeigt [258], aberrante CSF1R Transkripte sind in dieser Entität nicht zu detektieren. In einem ersten Ansatz wurden in der Doktorarbeit epigenetische Ursachen für die Aktivierung des THE1B LTR Elements gesucht. Die Experimente, bei denen Non-Hodgkin B-Zelllinien mit den Inhibitoren von DNA Methylierungen (5-Aza-dC) und Histon Deacetylierungen (TSA) behandelt wurden, zeigen zumindest indirekt, dass epigenetische Modulationen verantwortlich für die Stilllegung des THE1B LTR Elements sind. Besonders in der synergistischen Wirkung von beiden Inhibitoren zusammen war eine deutliche Aktivierung des aberranten CSF1R Transkripts zu detektieren. Ob eine epigenetische Regulation direkt in der THE1B LTR Region

Diskussion

stattfindet, konnte nicht gezeigt werden. Es ist ebenso möglich, dass durch die Behandlung mit 5-Aza-dC und/oder TSA, Proteine, die eine LTR aktivierende Funktion haben, hochreguliert bzw. Proteine, die LTR Regionen reprimieren, herunterreguliert werden.

Für die epigenetische Inaktivierung von Chromatinbereichen ist eine Reihe von Proteinen verantwortlich, die für die entsprechenden Modulationen des Chromatins und deren Aufrechterhaltung sorgen. Eine zentrale Rolle bei der Koordination der epigenetischen Modulationen spielt die Proteinfamilie der MTG Proteine [259]. Proteine der MTG Familie sind in der Lage, Netzwerke mit nukleären Ko-Repressoren (z.B. Sin3a, N-CoR und SMRT) sowie mit Chromatin modifizierenden Proteinen (z.B. Histon Deacetylasen) und DNA bindenden Transkriptionsfaktoren zu bilden. Damit sind sie entscheidend bei der Etablierung einer entwicklungs- und differenzierungs-spezifischen Genregulation beteiligt [259]. In dieser Arbeit konnte die Abwesenheit des MTG Familienmitgliedes CBFA2T3 (MTG16, Eto2) in HRS Zellen im Vergleich zu anderen B-Zell Lymphomen und primären B-Zellen gezeigt werden.

Die alleinige Reduzierung der CBFA2T3 Proteinmenge durch siRNA in Non-Hodgkin B-Zelllinien führte zu einer Hochregulation des nicht-kanonischen *CSF1R* Transkripts, welches in dem THE1B LTR initiiert. Damit konnte eine indirekte Beteiligung von CBFA2T3 an der Stabilisierung der THE1B LTR Suppression gezeigt werden. Eine synergistische Verstärkung der LTR-CSF1R Expression konnte mit zusätzlicher Aktivierung von NF- κ B erreicht werden. Die Reduktion von CBFA2T3 und die Aktivierung von NF- κ B in Non-Hodgkin Lymphom Zellen simuliert für diese beiden Faktoren eine Situation, wie sie in den HRS Zellen vorkommt und könnte ein Modell für die Entstehung des *CSF1R* Transkripts in HRS Zellen darstellen. Die Abwesenheit des epigenetischen Regulators CBFA2T3 führt zu einer Öffnung des Chromatinbereichs der THE1B LTR Region, wodurch Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF- κ B, die Transkription von aberranten Transkripten initiieren können. Die Daten in der Literatur zu *Cbfa2t3* Knockout Mäusen unterstützen dieses Modell. Die *Cbfa2t3* Knockout Mäuse weisen eine Verschiebung der Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen hin zu Granulozyten/Makrophagen auf und zeigen eine Verringerung der Megakaryocyten-erythroiden Population [260]. Des Weiteren sind in diesen Mäusen Gene hochreguliert, die auch eine entscheidende Rolle in der Hodgkin Pathogenese spielen [121], wie zum Beispiel *Stat* Proteine, *C/EBP* Proteine, *Id2* und *Csf1r* [260]. Der gleiche Mechanismus der THE1B LTR Aktivierung ist hier jedoch unwahrscheinlich, da dies LTR Region bisher nur im Genom von Primaten identifiziert wurde.

Diskussion

Die Tatsache, dass das THE1B LTR und andere Mitglieder dieser LTR Familie in tausendfacher Kopienzahl im Genom vorkommen, führt zu der Spekulation, dass auch andere Sequenzbereiche durch die Abwesenheit von CBFA2T3 einen Transkription ermöglichenden Status haben und eventuell weitere Gene aufgrund dieses Mechanismus aktiviert sind. Dies muss jedoch in zukünftigen Studien noch untersucht werden. In dieser Doktorarbeit konnte die Aktivierung eines Proto-Onkogens durch eine endogene LTR Region in einer humanen malignen Krankheit demonstriert werden – ein Mechanismus, der seit langem vermutet wurde und auch für andere Onkogene vorstellbar ist.

Anhang

Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Stephan Mathas und Herrn Prof. Dr. Bernd Dörken für die problemlose Finanzierung und Begleitung meiner Zeit als Doktorand am MDC und der Charité Universitätsmedizin. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Dr. Stephan Mathas für die herausragende Interaktion bedanken, die zu meiner wissenschaftlichen und persönlichen Entfaltung beigetragen hat.

Bei Herrn Prof. Achim Leutz möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit an der Humboldt-Universität zu Berlin und für die wissenschaftliche und administrative Unterstützung während meiner Doktorandenzeit bedanken.

Bei Herrn Dr. Stephan Kreher und Herrn Dr. Martin Janz möchte ich mich für die vielen Ideen, Diskussionen und Hilfestellungen wissenschaftlicher Art bedanken. Allgemein bedanke ich mich bei den gesamten aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Fachgruppe von Prof. Bernd Dörken für die entspannte Atmosphäre. Ganz besonders möchte ich Franziska Hummel, Simone Kressmann und Brigitte Wollert-Wulf für die exzellente technische Unterstützung danken. Katrin Ullrich möchte ich besonders für das aufmerksame Lesen und die hilfreichen Korrekturen der Dissertation danken.

Ich danke weiterhin Frau Prof. Constanze Bonifer, Herrn Dr. Korden Walter und weiteren Mitgliedern des Labors in Leeds, UK für deren fruchtbare Kommunikation und die Unterstützung bei der Charakterisierung des *CSF1R* Promotorbereiches.

Herrn Prof. Dr. Ioannis Anagnostopoulos und Frau Dr. Korinna Jöhrens sowie Herrn PD Dr. Michael Hummel aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Harald Stein möchte ich für die Färbungen und die Hybridisierungen von Gefrierschnitten aus Patientenmaterial danken. Mein Dank geht ferner an Herrn Dr. Raman Kumar für die Bereitstellung des CBFA2T3 Antikörpers und der CBFA2T3 spezifischen siRNA. Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Reiner Siebert möchte ich für die Unterstützung bei der Untersuchung der DNA-Methylierung des CBFA2T3 Promotors danken. Herrn Dr. Michael Harte und der Firma Cytopia möchte ich für die Bereitstellung der CSF1R inhibierenden Moleküle danken.

Abschließend möchte ich meiner Familie, besonders meinen Eltern und Großeltern danken, die mir in allen Lebenssituationen Rückhalt gegeben haben und die Erfüllung vieler meiner Wünsche ermöglichten. Ich möchte ausdrücklich meiner Frau Alexandra Lamprecht danken, die immer, auch in schweren Zeiten, für mich da ist.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt wurde und ich die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Diese Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt.

Berlin, den 19.07.2010

Publikationen

1. **Lamprecht, B.**; Kreher, S.; Anagnostopoulos, I.; Johrens, K.; Monteleone, G.; Jundt, F.; Stein, H.; Janz, M.; Dorken, B. und Mathas, S. (2008): *Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha*, **Blood** (Band 112), Nr. 8, Seite 3339-47
2. Schmidt, A.; Wiesner, B.; Weisshart, K.; Schulz, K.; Furkert, J.; **Lamprecht, B.**; Rosenthal, W. und Schulein, R. (2009): *Use of Kaede fusions to visualize recycling of G protein-coupled receptors*, **Traffic** (Band 10), Nr. 1, Seite 2-15
3. Mathas, S.; Kreher, S.; Meaburn, K. J.; Johrens, K.; **Lamprecht, B.**; Assaf, C.; Sterry, W.; Kadin, M. E.; Daibata, M.; Joos, S.; Hummel, M.; Stein, H.; Janz, M.; Anagnostopoulos, I.; Schrock, E.; Misteli, T. und Dorken, B. (2009): *Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma*, **Proc Natl Acad Sci USA** (Band 106), Nr. 14, Seite 5831-6
4. **Lamprecht, B.**; Walter, K.; Kreher, S.; Kumar, R.; Hummel, M.; Lenze, D.; Kochert, K.; Bouhrel, M. A.; Richter, J.; Soler, E.; Stadhouders, R.; Johrens, K.; Wurster, K. D.; Callen, D. F.; Harte, M. F.; Giefing, M.; Barlow, R.; Stein, H.; Anagnostopoulos, I.; Janz, M.; Cockerill, P. N.; Siebert, R.; Dorken, B.; Bonifer, C. und Mathas, S. (2010): *Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma*, **Nat Med** (Band 16), Nr. 5, Seite 571-9, 1p following 579

Berlin, den 19.07.2010

Quellenverzeichnis

Quellenverzeichnis

- [1] Janeway, Charles (2001): Immunobiology 5 : the immune system in health and disease, 5th. Auflage, Garland Pub., New York, ISBN: 9780815336426 (pbk.)
- [2] Arai, K. I.; Lee, F.; Miyajima, A.; Miyatake, S.; Arai, N. und Yokota, T. (1990): Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses, *Annu Rev Biochem* (Band 59), Seite 783-836
- [3] Sims, J. E. und Smith, D. E. (2010): The IL-1 family: regulators of immunity, *Nat Rev Immunol* (Band 10), Nr. 2, Seite 89-102
- [4] Spolski, R. und Leonard, W. J. (2008): Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity, *Annu Rev Immunol* (Band 26), Seite 57-79
- [5] Noguchi, M.; Yi, H.; Rosenblatt, H. M.; Filipovich, A. H.; Adelstein, S.; Modi, W. S.; McBride, O. W. und Leonard, W. J. (1993): Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans, *Cell* (Band 73), Nr. 1, Seite 147-57
- [6] Parrish-Novak, J.; Dillon, S. R.; Nelson, A.; Hammond, A.; Sprecher, C.; Gross, J. A.; Johnston, J.; Madden, K.; Xu, W.; West, J.; Schrader, S.; Burkhead, S.; Heipel, M.; Brandt, C.; Kuijper, J. L.; Kramer, J.; Conklin, D.; Presnell, S. R.; Berry, J.; Shiota, F.; Bort, S.; Hambly, K.; Mudri, S.; Clegg, C.; Moore, M.; Grant, F. J.; Lofton-Day, C.; Gilbert, T.; Rayond, F.; Ching, A.; Yao, L.; Smith, D.; Webster, P.; Whitmore, T.; Maurer, M.; Kaushansky, K.; Holly, R. D. und Foster, D. (2000): Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function, *Nature* (Band 408), Nr. 6808, Seite 57-63
- [7] Ozaki, K.; Kikly, K.; Michalovich, D.; Young, P. R. und Leonard, W. J. (2000): Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 21, Seite 11439-44
- [8] Asao, H.; Okuyama, C.; Kumaki, S.; Ishii, N.; Tsuchiya, S.; Foster, D. und Sugamura, K. (2001): Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex, *J Immunol* (Band 167), Nr. 1, Seite 1-5
- [9] Habib, T.; Senadheera, S.; Weinberg, K. und Kaushansky, K. (2002): The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3, *Biochemistry* (Band 41), Nr. 27, Seite 8725-31
- [10] Leonard, W. J.; Zeng, R. und Spolski, R. (2008): Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age, *J Leukoc Biol* (Band 84), Nr. 2, Seite 348-56
- [11] Bondensgaard, K.; Breinholt, J.; Madsen, D.; Omkvist, D. H.; Kang, L.; Worsaae, A.; Becker, P.; Schiodt, C. B. und Hjorth, S. A. (2007): The existence of multiple conformers of interleukin-21 directs engineering of a superpotent analogue, *J Biol Chem* (Band 282), Nr. 32, Seite 23326-36
- [12] Konforte, D.; Simard, N. und Paige, C. J. (2009): IL-21: an executor of B cell fate, *J Immunol* (Band 182), Nr. 4, Seite 1781-7
- [13] Kim, H. P.; Korn, L. L.; Gamero, A. M. und Leonard, W. J. (2005): Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 26, Seite 25291-7
- [14] Mehta, D. S.; Wurster, A. L.; Weinmann, A. S. und Grusby, M. J. (2005): NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 6, Seite 2016-21
- [15] Brandt, K.; Bulfone-Paus, S.; Foster, D. C. und Ruckert, R. (2003): Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation, *Blood* (Band 102), Nr. 12, Seite 4090-8
- [16] Leonard, W. J. und Spolski, R. (2005): Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation, *Nat Rev Immunol* (Band 5), Nr. 9, Seite 688-98
- [17] Ozaki, K.; Hishiya, A.; Hatanaka, K.; Nakajima, H.; Wang, G.; Hwu, P.; Kitamura, T.; Ozawa, K.; Leonard, W. J. und Nosaka, T. (2006): Overexpression of interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells, *Int J Hematol* (Band 84), Nr. 3, Seite 224-30
- [18] Ozaki, K.; Spolski, R.; Feng, C. G.; Qi, C. F.; Cheng, J.; Sher, A.; Morse, H. C., 3rd; Liu, C.; Schwartzberg, P. L. und Leonard, W. J. (2002): A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production, *Science* (Band 298), Nr. 5598, Seite 1630-4
- [19] Caruso, R.; Fina, D.; Peluso, I.; Fantini, M. C.; Tosti, C.; Del Vecchio Blanco, G.; Paoluzi, O. A.; Caprioli, F.; Andrei, F.; Stolfi, C.; Romano, M.; Ricci, V.; MacDonald, T. T.; Pallone, F. und Monteleone, G. (2007): IL-21 is highly produced in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis, *J Immunol* (Band 178), Nr. 9, Seite 5957-65
- [20] Distler, J. H.; Jungel, A.; Kowal-Bielecka, O.; Michel, B. A.; Gay, R. E.; Sprott, H.; Matucci-Cerinic, M.; Chilla, M.; Reich, K.; Kalden, J. R.; Muller-Ladner, U.; Lorenz, H. M.; Gay, S. und Distler, O. (2005): Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis, *Arthritis Rheum* (Band 52), Nr. 3, Seite 856-64

Quellenverzeichnis

- [21] Jin, H.; Carrio, R.; Yu, A. und Malek, T. R. (2004): Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis, *J Immunol* (Band 173), Nr. 1, Seite 657-65
- [22] Ozaki, K.; Spolski, R.; Ettinger, R.; Kim, H. P.; Wang, G.; Qi, C. F.; Hwu, P.; Shaffer, D. J.; Akilesh, S.; Roopenian, D. C.; Morse, H. C., 3rd; Lipsky, P. E. und Leonard, W. J. (2004): Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6, *J Immunol* (Band 173), Nr. 9, Seite 5361-71
- [23] Ettinger, R.; Kuchen, S. und Lipsky, P. E. (2008): The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease, *Immunol Rev* (Band 223), Seite 60-86
- [24] Jin, H. und Malek, T. R. (2006): Redundant and unique regulation of activated mouse B lymphocytes by IL-4 and IL-21, *J Leukoc Biol* (Band 80), Nr. 6, Seite 1416-23
- [25] Saito, T.; Kitayama, D.; Sakamoto, A.; Tsuruoka, N.; Arima, M.; Hatano, M.; Miyazaki, M. und Tokuhisa, T. (2008): Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation, *Immunobiology* (Band 213), Nr. 7, Seite 545-55
- [26] Ettinger, R.; Sims, G. P.; Fairhurst, A. M.; Robbins, R.; da Silva, Y. S.; Spolski, R.; Leonard, W. J. und Lipsky, P. E. (2005): IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells, *J Immunol* (Band 175), Nr. 12, Seite 7867-79
- [27] Calame, K. L.; Lin, K. I. und Tunyaplin, C. (2003): Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells, *Annu Rev Immunol* (Band 21), Seite 205-30
- [28] Nurieva, R.; Yang, X. O.; Martinez, G.; Zhang, Y.; Panopoulos, A. D.; Ma, L.; Schluns, K.; Tian, Q.; Watowich, S. S.; Jetten, A. M. und Dong, C. (2007): Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells, *Nature* (Band 448), Nr. 7152, Seite 480-3
- [29] Zeng, R.; Spolski, R.; Finkelstein, S. E.; Oh, S.; Kovanen, P. E.; Hinrichs, C. S.; Pise-Masison, C. A.; Radonovich, M. F.; Brady, J. N.; Restifo, N. P.; Berzofsky, J. A. und Leonard, W. J. (2005): Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function, *J Exp Med* (Band 201), Nr. 1, Seite 139-48
- [30] Toomey, J. A.; Gays, F.; Foster, D. und Brooks, C. G. (2003): Cytokine requirements for the growth and development of mouse NK cells in vitro, *J Leukoc Biol* (Band 74), Nr. 2, Seite 233-42
- [31] Coquet, J. M.; Kyriassoudis, K.; Pellicci, D. G.; Besra, G.; Berzins, S. P.; Smyth, M. J. und Godfrey, D. I. (2007): IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production, *J Immunol* (Band 178), Nr. 5, Seite 2827-34
- [32] Davis, I. D.; Skrumsager, B. K.; Cebon, J.; Nicholaou, T.; Barlow, J. W.; Moller, N. P.; Skak, K.; Lundsgaard, D.; Frederiksen, K. S.; Thygesen, P. und McArthur, G. A. (2007): An open-label, two-arm, phase I trial of recombinant human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma, *Clin Cancer Res* (Band 13), Nr. 12, Seite 3630-6
- [33] Davis, I. D.; Brady, B.; Kefford, R. F.; Millward, M.; Cebon, J.; Skrumsager, B. K.; Mouritzen, U.; Hansen, L. T.; Skak, K.; Lundsgaard, D.; Frederiksen, K. S.; Kristjansen, P. E. und McArthur, G. (2009): Clinical and biological efficacy of recombinant human interleukin-21 in patients with stage IV malignant melanoma without prior treatment: a phase IIa trial, *Clin Cancer Res* (Band 15), Nr. 6, Seite 2123-9
- [34] Eriksen, K. W.; Sondergaard, H.; Woetmann, A.; Krejsgaard, T.; Skak, K.; Geisler, C.; Wasik, M. A. und Odum, N. (2009): The combination of IL-21 and IFN-alpha boosts STAT3 activation, cytotoxicity and experimental tumor therapy, *Mol Immunol* (Band 46), Nr. 5, Seite 812-20
- [35] Gelebart, P.; Zak, Z.; Anand, M.; Dien-Bard, J.; Amin, H. M. und Lai, R. (2009): Interleukin-21 effectively induces apoptosis in mantle cell lymphoma through a STAT1-dependent mechanism, *Leukemia*
- [36] di Carlo, E.; de Toter, D.; Piazza, T.; Fabbri, M. und Ferrini, S. (2007): Role of IL-21 in immune-regulation and tumor immunotherapy, *Cancer Immunol Immunother* (Band 56), Nr. 9, Seite 1323-34
- [37] Ueda, M.; Imada, K.; Imura, A.; Koga, H.; Hishizawa, M. und Uchiyama, T. (2005): Expression of functional interleukin-21 receptor on adult T-cell leukaemia cells, *Br J Haematol* (Band 128), Nr. 2, Seite 169-76
- [38] Menoret, E.; Maiga, S.; Descamps, G.; Pellat-Deceunynck, C.; Fraslon, C.; Cappellano, M.; Moreau, P.; Bataille, R. und Amiot, M. (2008): IL-21 stimulates human myeloma cell growth through an autocrine IGF-1 loop, *J Immunol* (Band 181), Nr. 10, Seite 6837-42
- [39] Brenne, A. T.; Ro, T. B.; Waage, A.; Sundan, A.; Borset, M. und Hjorth-Hansen, H. (2002): Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells, *Blood* (Band 99), Nr. 10, Seite 3756-62
- [40] Vinuesa, C. G.; Cook, M. C.; Angelucci, C.; Athanasopoulos, V.; Rui, L.; Hill, K. M.; Yu, D.; Domasch, H.; Whittle, B.; Lambe, T.; Roberts, I. S.; Copley, R. R.; Bell, J. I.; Cornall, R. J. und Goodnow, C. C. (2005): A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity, *Nature* (Band 435), Nr. 7041, Seite 452-8
- [41] Young, D. A.; Hegen, M.; Ma, H. L.; Whitters, M. J.; Albert, L. M.; Lowe, L.; Senices, M.; Wu, P. W.; Sibley, B.; Leathurby, Y.; Brown, T. P.; Nickerson-Nutter, C.; Keith, J. C., Jr. und Collins, M. (2007):

Quellenverzeichnis

- Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (Band 56), Nr. 4, Seite 1152-63
- [42] Herber, D.; Brown, T. P.; Liang, S.; Young, D. A.; Collins, M. und Dunussi-Joannopoulos, K. (2007): IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression, *J Immunol* (Band 178), Nr. 6, Seite 3822-30
- [43] Hamilton, J. A. (2008): Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity, *Nat Rev Immunol* (Band 8), Nr. 7, Seite 533-44
- [44] Chitu, V. und Stanley, E. R. (2006): Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation, *Curr Opin Immunol* (Band 18), Nr. 1, Seite 39-48
- [45] Condeelis, J. und Pollard, J. W. (2006): Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis, *Cell* (Band 124), Nr. 2, Seite 263-6
- [46] Dai, X. M.; Zong, X. H.; Sylvestre, V. und Stanley, E. R. (2004): Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient *Csf1^{op}/Csf1^{op}* mice by transgenic expression of cell surface CSF-1, *Blood* (Band 103), Nr. 3, Seite 1114-23
- [47] Pandit, J.; Bohm, A.; Jancarik, J.; Halenbeck, R.; Kohts, K. und Kim, S. H. (1992): Three-dimensional structure of dimeric human recombinant macrophage colony-stimulating factor, *Science* (Band 258), Nr. 5086, Seite 1358-62
- [48] Ryan, G. R.; Dai, X. M.; Dominguez, M. G.; Tong, W.; Chuan, F.; Chisholm, O.; Russell, R. G.; Pollard, J. W. und Stanley, E. R. (2001): Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (*Csf1^{op}/Csf1^{op}*) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis, *Blood* (Band 98), Nr. 1, Seite 74-84
- [49] Pixley, F. J. und Stanley, E. R. (2004): CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action, *Trends Cell Biol* (Band 14), Nr. 11, Seite 628-38
- [50] Akagawa, K. S. (2002): Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages, *Int J Hematol* (Band 76), Nr. 1, Seite 27-34
- [51] Webb, S. E.; Pollard, J. W. und Jones, G. E. (1996): Direct observation and quantification of macrophage chemoattraction to the growth factor CSF-1, *J Cell Sci* (Band 109 (Pt 4)), Seite 793-803
- [52] Bartelmez, S. H.; Bradley, T. R.; Bertoncello, I.; Mochizuki, D. Y.; Tushinski, R. J.; Stanley, E. R.; Hapel, A. J.; Young, I. G.; Kriegler, A. B. und Hodgson, G. S. (1989): Interleukin 1 plus interleukin 3 plus colony-stimulating factor 1 are essential for clonal proliferation of primitive myeloid bone marrow cells, *Exp Hematol* (Band 17), Nr. 3, Seite 240-5
- [53] Stanley, E. R.; Chen, D. M. und Lin, H. S. (1978): Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor, *Nature* (Band 274), Nr. 5667, Seite 168-70
- [54] Teitelbaum, S. L. und Ross, F. P. (2003): Genetic regulation of osteoclast development and function, *Nat Rev Genet* (Band 4), Nr. 8, Seite 638-49
- [55] Wiktor-Jedrzejczak, W.; Bartocci, A.; Ferrante, A. W., Jr.; Ahmed-Ansari, A.; Sell, K. W.; Pollard, J. W. und Stanley, E. R. (1990): Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (*op/op*) mouse, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 12, Seite 4828-32
- [56] Groffen, J.; Heisterkamp, N.; Spurr, N.; Dana, S.; Wasmuth, J. J. und Stephenson, J. R. (1983): Chromosomal localization of the human *c-fms* oncogene, *Nucleic Acids Res* (Band 11), Nr. 18, Seite 6331-9
- [57] Visvader, J. und Verma, I. M. (1989): Differential transcription of exon 1 of the human *c-fms* gene in placental trophoblasts and monocytes, *Mol Cell Biol* (Band 9), Nr. 3, Seite 1336-41
- [58] Coussens, L.; Van Beveren, C.; Smith, D.; Chen, E.; Mitchell, R. L.; Isacke, C. M.; Verma, I. M. und Ullrich, A. (1986): Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene *fms* at carboxyl terminus, *Nature* (Band 320), Nr. 6059, Seite 277-80
- [59] Woolford, J.; Rothwell, V. und Rohrschneider, L. (1985): Characterization of the human *c-fms* gene product and its expression in cells of the monocyte-macrophage lineage, *Mol Cell Biol* (Band 5), Nr. 12, Seite 3458-66
- [60] Bourette, R. P. und Rohrschneider, L. R. (2000): Early events in M-CSF receptor signaling, *Growth Factors* (Band 17), Nr. 3, Seite 155-66
- [61] Sherr, C. J. (1990): Colony-stimulating factor-1 receptor, *Blood* (Band 75), Nr. 1, Seite 1-12
- [62] Kelley, T. W.; Graham, M. M.; Doseff, A. I.; Pomerantz, R. W.; Lau, S. M.; Ostrowski, M. C.; Franke, T. F. und Marsh, C. B. (1999): Macrophage colony-stimulating factor promotes cell survival through Akt/protein kinase B, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 37, Seite 26393-8
- [63] Golden, L. H. und Insogna, K. L. (2004): The expanding role of PI3-kinase in bone, *Bone* (Band 34), Nr. 1, Seite 3-12
- [64] Lee, A. W. und States, D. J. (2000): Both src-dependent and -independent mechanisms mediate phosphatidylinositol 3-kinase regulation of colony-stimulating factor 1-activated mitogen-activated protein kinases in myeloid progenitors, *Mol Cell Biol* (Band 20), Nr. 18, Seite 6779-98

Quellenverzeichnis

- [65] Yu, W.; Chen, J.; Xiong, Y.; Pixley, F. J.; Dai, X. M.; Yeung, Y. G. und Stanley, E. R. (2008): CSF-1 receptor structure/function in MacCsf1r^{-/-} macrophages: regulation of proliferation, differentiation, and morphology, *J Leukoc Biol* (Band 84), Nr. 3, Seite 852-63
- [66] Otero, K.; Turnbull, I. R.; Poliani, P. L.; Vermi, W.; Cerutti, E.; Aoshi, T.; Tassi, I.; Takai, T.; Stanley, S. L.; Miller, M.; Shaw, A. S. und Colonna, M. (2009): Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and beta-catenin, *Nat Immunol* (Band 10), Nr. 7, Seite 734-43
- [67] Williams, L. M. und Ridley, A. J. (2000): Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of Pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages, *J Immunol* (Band 164), Nr. 4, Seite 2028-36
- [68] Alonso, G.; Koegl, M.; Mazurenko, N. und Courtneidge, S. A. (1995): Sequence requirements for binding of Src family tyrosine kinases to activated growth factor receptors, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 17, Seite 9840-8
- [69] Rosenbauer, F.; Wagner, K.; Kutok, J. L.; Iwasaki, H.; Le Beau, M. M.; Okuno, Y.; Akashi, K.; Fiering, S. und Tenen, D. G. (2004): Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1, *Nat Genet* (Band 36), Nr. 6, Seite 624-30
- [70] Flick, M. B.; Sapi, E.; Perrotta, P. L.; Maher, M. G.; Halaban, R.; Carter, D. und Kacinski, B. M. (1997): Recognition of activated CSF-1 receptor in breast carcinomas by a tyrosine 723 phosphospecific antibody, *Oncogene* (Band 14), Nr. 21, Seite 2553-61
- [71] Bonifer, C. und Hume, D. A. (2008): The transcriptional regulation of the Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (csf1r) gene during hematopoiesis, *Front Biosci* (Band 13), Seite 549-60
- [72] Perrotti, D.; Iervolino, A.; Cesi, V.; Cirinna, M.; Lombardini, S.; Grassilli, E.; Bonatti, S.; Claudio, P. P. und Calabretta, B. (2000): BCR-ABL prevents c-jun-mediated and proteasome-dependent FUS (TLS) proteolysis through a protein kinase CbetaII-dependent pathway, *Mol Cell Biol* (Band 20), Nr. 16, Seite 6159-69
- [73] Krysinska, H.; Hoogenkamp, M.; Ingram, R.; Wilson, N.; Tagoh, H.; Laslo, P.; Singh, H. und Bonifer, C. (2007): A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene, *Mol Cell Biol* (Band 27), Nr. 3, Seite 878-87
- [74] Ross, I. L.; Yue, X.; Ostrowski, M. C. und Hume, D. A. (1998): Interaction between PU.1 and another Ets family transcription factor promotes macrophage-specific Basal transcription initiation, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 12, Seite 6662-9
- [75] Zhang, D. E.; Hetherington, C. J.; Chen, H. M. und Tenen, D. G. (1994): The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor, *Mol Cell Biol* (Band 14), Nr. 1, Seite 373-81
- [76] Himes, S. R.; Tagoh, H.; Goonetilleke, N.; Sasmono, T.; Oceandy, D.; Clark, R.; Bonifer, C. und Hume, D. A. (2001): A highly conserved c-fms gene intronic element controls macrophage-specific and regulated expression, *J Leukoc Biol* (Band 70), Nr. 5, Seite 812-20
- [77] Tagoh, H.; Melnik, S.; Lefevre, P.; Chong, S.; Riggs, A. D. und Bonifer, C. (2004): Dynamic reorganization of chromatin structure and selective DNA demethylation prior to stable enhancer complex formation during differentiation of primary hematopoietic cells in vitro, *Blood* (Band 103), Nr. 8, Seite 2950-5
- [78] Tagoh, H.; Himes, R.; Clarke, D.; Leenen, P. J.; Riggs, A. D.; Hume, D. und Bonifer, C. (2002): Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells, *Genes Dev* (Band 16), Nr. 13, Seite 1721-37
- [79] Nutt, S. L.; Heavey, B.; Rolink, A. G. und Busslinger, M. (1999): Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5, *Nature* (Band 401), Nr. 6753, Seite 556-62
- [80] Tagoh, H.; Ingram, R.; Wilson, N.; Salvaggio, G.; Warren, A. J.; Clarke, D.; Busslinger, M. und Bonifer, C. (2006): The mechanism of repression of the myeloid-specific c-fms gene by Pax5 during B lineage restriction, *EMBO J* (Band 25), Nr. 5, Seite 1070-80
- [81] LeBien, T. W. und Tedder, T. F. (2008): B lymphocytes: how they develop and function, *Blood* (Band 112), Nr. 5, Seite 1570-80
- [82] Blom, B. und Spits, H. (2006): Development of human lymphoid cells, *Annu Rev Immunol* (Band 24), Seite 287-320
- [83] Wilson, A. und Trumpp, A. (2006): Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches, *Nat Rev Immunol* (Band 6), Nr. 2, Seite 93-106
- [84] Ceredig, R.; Rolink, A. G. und Brown, G. (2009): Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees, *Nat Rev Immunol* (Band 9), Nr. 4, Seite 293-300
- [85] Enver, T. und Jacobsen, S. E. (2009): Developmental biology: Instructions writ in blood, *Nature* (Band 461), Nr. 7261, Seite 183-4
- [86] Ghia, P.; ten Boekel, E.; Sanz, E.; de la Hera, A.; Rolink, A. und Melchers, F. (1996): Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the

Quellenverzeichnis

- rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci, *J Exp Med* (Band 184), Nr. 6, Seite 2217-29
- [87] Herzog, S.; Reth, M. und Jumaa, H. (2009): Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling, *Nat Rev Immunol* (Band 9), Nr. 3, Seite 195-205
- [88] Oettinger, M. A.; Schatz, D. G.; Gorka, C. und Baltimore, D. (1990): RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination, *Science* (Band 248), Nr. 4962, Seite 1517-23
- [89] Schatz, D. G.; Oettinger, M. A. und Baltimore, D. (1989): The V(D)J recombination activating gene, RAG-1, *Cell* (Band 59), Nr. 6, Seite 1035-48
- [90] Welner, R. S.; Pelayo, R. und Kincade, P. W. (2008): Evolving views on the genealogy of B cells, *Nat Rev Immunol* (Band 8), Nr. 2, Seite 95-106
- [91] Klein, U. und Dalla-Favera, R. (2008): Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy, *Nat Rev Immunol* (Band 8), Nr. 1, Seite 22-33
- [92] Allen, C. D.; Ansel, K. M.; Low, C.; Lesley, R.; Tamamura, H.; Fujii, N. und Cyster, J. G. (2004): Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5, *Nat Immunol* (Band 5), Nr. 9, Seite 943-52
- [93] Hauser, A. E.; Shlomchik, M. J. und Haberman, A. M. (2007): In vivo imaging studies shed light on germinal-centre development, *Nat Rev Immunol* (Band 7), Nr. 7, Seite 499-504
- [94] Brink, R. (2007): Germinal-center B cells in the zone, *Immunity* (Band 26), Nr. 5, Seite 552-4
- [95] Schwickert, T. A.; Lindquist, R. L.; Shakhar, G.; Livshits, G.; Skokos, D.; Kosco-Vilbois, M. H.; Dustin, M. L. und Nussenzweig, M. C. (2007): In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure, *Nature* (Band 446), Nr. 7131, Seite 83-7
- [96] Allen, C. D.; Okada, T.; Tang, H. L. und Cyster, J. G. (2007): Imaging of germinal center selection events during affinity maturation, *Science* (Band 315), Nr. 5811, Seite 528-31
- [97] Klein, U.; Tu, Y.; Stolovitzky, G. A.; Keller, J. L.; Haddad, J., Jr.; Miljkovic, V.; Cattoretto, G.; Califano, A. und Dalla-Favera, R. (2003): Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 5, Seite 2639-44
- [98] Kuppers, R.; Klein, U.; Hansmann, M. L. und Rajewsky, K. (1999): Cellular origin of human B-cell lymphomas, *N Engl J Med* (Band 341), Nr. 20, Seite 1520-9
- [99] Martinez-Valdez, H.; Guret, C.; de Bouteiller, O.; Fugier, I.; Banchereau, J. und Liu, Y. J. (1996): Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2, *J Exp Med* (Band 183), Nr. 3, Seite 971-7
- [100] Muramatsu, M.; Kinoshita, K.; Fagarasan, S.; Yamada, S.; Shinkai, Y. und Honjo, T. (2000): Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme, *Cell* (Band 102), Nr. 5, Seite 553-63
- [101] Kondo, M.; Scherer, D. C.; Miyamoto, T.; King, A. G.; Akashi, K.; Sugamura, K. und Weissman, I. L. (2000): Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines, *Nature* (Band 407), Nr. 6802, Seite 383-6
- [102] Akashi, K.; Traver, D.; Miyamoto, T. und Weissman, I. L. (2000): A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages, *Nature* (Band 404), Nr. 6774, Seite 193-7
- [103] DeKoter, R. P.; Lee, H. J. und Singh, H. (2002): PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors, *Immunity* (Band 16), Nr. 2, Seite 297-309
- [104] Kee, B. L. und Murre, C. (1998): Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12, *J Exp Med* (Band 188), Nr. 4, Seite 699-713
- [105] Sigvardsson, M.; O'Riordan, M. und Grosschedl, R. (1997): EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes, *Immunity* (Band 7), Nr. 1, Seite 25-36
- [106] Jarriault, S.; Brou, C.; Logeat, F.; Schroeter, E. H.; Kopan, R. und Israel, A. (1995): Signalling downstream of activated mammalian Notch, *Nature* (Band 377), Nr. 6547, Seite 355-8
- [107] Ikawa, T.; Fujimoto, S.; Kawamoto, H.; Katsura, Y. und Yokota, Y. (2001): Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 9, Seite 5164-9
- [108] Schebesta, M.; Heavey, B. und Busslinger, M. (2002): Transcriptional control of B-cell development, *Curr Opin Immunol* (Band 14), Nr. 2, Seite 216-23
- [109] Cobaleda, C.; Schebesta, A.; Delogu, A. und Busslinger, M. (2007): Pax5: the guardian of B cell identity and function, *Nat Immunol* (Band 8), Nr. 5, Seite 463-70
- [110] Cobaleda, C.; Jochum, W. und Busslinger, M. (2007): Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors, *Nature* (Band 449), Nr. 7161, Seite 473-7
- [111] Sun, J.; Matthias, G.; Mihatsch, M. J.; Georgopoulos, K. und Matthias, P. (2003): Lack of the transcriptional coactivator OBF-1 prevents the development of systemic lupus erythematosus-like phenotypes in Aiolos mutant mice, *J Immunol* (Band 170), Nr. 4, Seite 1699-706

Quellenverzeichnis

- [112] Shapiro-Shelef, M. und Calame, K. (2005): Regulation of plasma-cell development, *Nat Rev Immunol* (Band 5), Nr. 3, Seite 230-42
- [113] Sha, W. C.; Liou, H. C.; Tuomanen, E. I. und Baltimore, D. (1995): Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses, *Cell* (Band 80), Nr. 2, Seite 321-30
- [114] Weih, D. S.; Yilmaz, Z. B. und Weih, F. (2001): Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines, *J Immunol* (Band 167), Nr. 4, Seite 1909-19
- [115] Grossmann, M.; O'Reilly, L. A.; Gugasyan, R.; Strasser, A.; Adams, J. M. und Gerondakis, S. (2000): The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression, *EMBO J* (Band 19), Nr. 23, Seite 6351-60
- [116] Franzoso, G.; Carlson, L.; Xing, L.; Poljak, L.; Shores, E. W.; Brown, K. D.; Leonardi, A.; Tran, T.; Boyce, B. F. und Siebenlist, U. (1997): Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development, *Genes Dev* (Band 11), Nr. 24, Seite 3482-96
- [117] Cobaleda, C. und Busslinger, M. (2008): Developmental plasticity of lymphocytes, *Curr Opin Immunol* (Band 20), Nr. 2, Seite 139-48
- [118] Carbone, A.; Gloghini, A.; Cabras, A. und Elia, G. (2009): The Germinal centre-derived lymphomas seen through their cellular microenvironment, *Br J Haematol* (Band 145), Nr. 4, Seite 468-80
- [119] Burke, J.S. (1992): Williams Wilkins, 1992, ch Hodgkin's disease: histopathologie and differential diagnosis, *Neoplastic Hematopathology*, Seite 497-533
- [120] Harris, N. L.; Jaffe, E. S.; Stein, H.; Banks, P. M.; Chan, J. K.; Cleary, M. L.; Delsol, G.; De Wolf-Peeters, C.; Falini, B.; Gatter, K. C. und et al. (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group, *Blood* (Band 84), Nr. 5, Seite 1361-92
- [121] Kuppers, R. (2009): The biology of Hodgkin's lymphoma, *Nat Rev Cancer* (Band 9), Nr. 1, Seite 15-27
- [122] Diehl, V.; Stein, H.; Hummel, M.; Zollinger, R. und Connors, J. M. (2003): Hodgkin's lymphoma: biology and treatment strategies for primary, refractory, and relapsed disease, *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, Seite 225-47
- [123] Diehl, V.; Thomas, R. K. und Re, D. (2004): Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment, *Lancet Oncol* (Band 5), Nr. 1, Seite 19-26
- [124] Bonadonna, G. (2000): Historical review of Hodgkin's disease, *Br J Haematol* (Band 110), Nr. 3, Seite 504-11
- [125] Sternberg, C. (1898): Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates, *Ztschz.Heilk.* (Band 19), Seite 21-90
- [126] Reed, D.M. (1902): On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis, *Johns Hopkins Hospital Reports* (Band 10), Seite 133-196
- [127] Kuppers, R. und Hansmann, M. L. (2005): The Hodgkin and Reed/Sternberg cell, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 37), Nr. 3, Seite 511-7
- [128] Kuppers, R.; Rajewsky, K.; Zhao, M.; Simons, G.; Laumann, R.; Fischer, R. und Hansmann, M. L. (1994): Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 23, Seite 10962-6
- [129] Kanzler, H.; Kuppers, R.; Hansmann, M. L. und Rajewsky, K. (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* (Band 184), Nr. 4, Seite 1495-505
- [130] Willenbrock, K.; Kuppers, R.; Renne, C.; Brune, V.; Eckerle, S.; Weidmann, E.; Brauninger, A. und Hansmann, M. L. (2006): Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma, *Haematologica* (Band 91), Nr. 5, Seite 596-604
- [131] Muschen, M.; Rajewsky, K.; Brauninger, A.; Baur, A. S.; Oudejans, J. J.; Roers, A.; Hansmann, M. L. und Kuppers, R. (2000): Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma, *J Exp Med* (Band 191), Nr. 2, Seite 387-94
- [132] Anagnostopoulos, I.; Hansmann, M. L.; Franssila, K.; Harris, M.; Harris, N. L.; Jaffe, E. S.; Han, J.; van Krieken, J. M.; Poppema, S.; Marafioti, T.; Franklin, J.; Sextro, M.; Diehl, V. und Stein, H. (2000): European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes, *Blood* (Band 96), Nr. 5, Seite 1889-99
- [133] Kilger, E.; Kieser, A.; Baumann, M. und Hammerschmidt, W. (1998): Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor, *EMBO J* (Band 17), Nr. 6, Seite 1700-9
- [134] Alber, G.; Kim, K. M.; Weiser, P.; Riesterer, C.; Carsetti, R. und Reth, M. (1993): Molecular mimicry of the antigen receptor signalling motif by transmembrane proteins of the Epstein-Barr virus and the bovine leukaemia virus, *Curr Biol* (Band 3), Nr. 6, Seite 333-9

Quellenverzeichnis

- [135] Flavell, J. R.; Baumforth, K. R.; Wood, V. H.; Davies, G. L.; Wei, W.; Reynolds, G. M.; Morgan, S.; Boyce, A.; Kelly, G. L.; Young, L. S. und Murray, P. G. (2008): Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells, *Blood* (Band 111), Nr. 1, Seite 292-301
- [136] Bechtel, D.; Kurth, J.; Unkel, C. und Kuppers, R. (2005): Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas, *Blood* (Band 106), Nr. 13, Seite 4345-50
- [137] Mancao, C.; Altmann, M.; Jungnickel, B. und Hammerschmidt, W. (2005): Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus, *Blood* (Band 106), Nr. 13, Seite 4339-44
- [138] Chaganti, S.; Bell, A. I.; Pastor, N. B.; Milner, A. E.; Drayson, M.; Gordon, J. und Rickinson, A. B. (2005): Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes, *Blood* (Band 106), Nr. 13, Seite 4249-52
- [139] Torlakovic, E.; Tierens, A.; Dang, H. D. und Delabie, J. (2001): The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease, *Am J Pathol* (Band 159), Nr. 5, Seite 1807-14
- [140] Stein, H.; Marafioti, T.; Foss, H. D.; Laumen, H.; Hummel, M.; Anagnostopoulos, I.; Wirth, T.; Demel, G. und Falini, B. (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* (Band 97), Nr. 2, Seite 496-501
- [141] Re, D.; Muschen, M.; Ahmadi, T.; Wickenhauser, C.; Staratschek-Jox, A.; Holtick, U.; Diehl, V. und Wolf, J. (2001): Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells, *Cancer Res* (Band 61), Nr. 5, Seite 2080-4
- [142] Ushmorov, A.; Ritz, O.; Hummel, M.; Leithauser, F.; Moller, P.; Stein, H. und Wirth, T. (2004): Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression, *Blood* (Band 104), Nr. 10, Seite 3326-34
- [143] Hertel, C. B.; Zhou, X. G.; Hamilton-Dutoit, S. J. und Junker, S. (2002): Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma, *Oncogene* (Band 21), Nr. 32, Seite 4908-20
- [144] Pongubala, J. M.; Northrup, D. L.; Lancki, D. W.; Medina, K. L.; Treiber, T.; Bertolino, E.; Thomas, M.; Grosschedl, R.; Allman, D. und Singh, H. (2008): Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5, *Nat Immunol* (Band 9), Nr. 2, Seite 203-15
- [145] Renne, C.; Martin-Subero, J. I.; Eickernjager, M.; Hansmann, M. L.; Kuppers, R.; Siebert, R. und Brauninger, A. (2006): Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma, *Am J Pathol* (Band 169), Nr. 2, Seite 655-64
- [146] Mathas, S.; Janz, M.; Hummel, F.; Hummel, M.; Wollert-Wulf, B.; Lusatis, S.; Anagnostopoulos, I.; Lietz, A.; Sigvardsson, M.; Jundt, F.; Johrens, K.; Bommert, K.; Stein, H. und Dorken, B. (2006): Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma, *Nat Immunol* (Band 7), Nr. 2, Seite 207-15
- [147] Hacker, C.; Kirsch, R. D.; Ju, X. S.; Hieronymus, T.; Gust, T. C.; Kuhl, C.; Jorgas, T.; Kurz, S. M.; Rose-John, S.; Yokota, Y. und Zenke, M. (2003): Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development, *Nat Immunol* (Band 4), Nr. 4, Seite 380-6
- [148] Yokota, Y.; Mansouri, A.; Mori, S.; Sugawara, S.; Adachi, S.; Nishikawa, S. und Gruss, P. (1999): Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2, *Nature* (Band 397), Nr. 6721, Seite 702-6
- [149] Foss, H. D.; Reusch, R.; Demel, G.; Lenz, G.; Anagnostopoulos, I.; Hummel, M. und Stein, H. (1999): Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin, *Blood* (Band 94), Nr. 9, Seite 3108-13
- [150] Schwering, I.; Brauninger, A.; Klein, U.; Jungnickel, B.; Tinguely, M.; Diehl, V.; Hansmann, M. L.; Dalla-Favera, R.; Rajewsky, K. und Kuppers, R. (2003): Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Blood* (Band 101), Nr. 4, Seite 1505-12
- [151] Jundt, F.; Anagnostopoulos, I.; Forster, R.; Mathas, S.; Stein, H. und Dorken, B. (2002): Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma, *Blood* (Band 99), Nr. 9, Seite 3398-403
- [152] Jundt, F.; Acikgoz, O.; Kwon, S. H.; Schwarzer, R.; Anagnostopoulos, I.; Wiesner, B.; Mathas, S.; Hummel, M.; Stein, H.; Reichardt, H. M. und Dorken, B. (2008): Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma, *Leukemia* (Band 22), Nr. 8, Seite 1587-94
- [153] Kumano, K.; Chiba, S.; Shimizu, K.; Yamagata, T.; Hosoya, N.; Saito, T.; Takahashi, T.; Hamada, Y. und Hirai, H. (2001): Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression, *Blood* (Band 98), Nr. 12, Seite 3283-9

Quellenverzeichnis

- [154] Schneider, E. M.; Torlakovic, E.; Stuhler, A.; Diehl, V.; Tesch, H. und Giebel, B. (2004): The early transcription factor GATA-2 is expressed in classical Hodgkin's lymphoma, *J Pathol* (Band 204), Nr. 5, Seite 538-45
- [155] Dutton, A.; Woodman, C. B.; Chukwuma, M. B.; Last, J. I.; Wei, W.; Vockerodt, M.; Baumforth, K. R.; Flavell, J. R.; Rowe, M.; Taylor, A. M.; Young, L. S. und Murray, P. G. (2007): Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells, *Blood* (Band 109), Nr. 6, Seite 2597-603
- [156] Miyamoto, T.; Iwasaki, H.; Reizis, B.; Ye, M.; Graf, T.; Weissman, I. L. und Akashi, K. (2002): Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment, *Dev Cell* (Band 3), Nr. 1, Seite 137-47
- [157] Hu, M.; Krause, D.; Greaves, M.; Sharkis, S.; Dexter, M.; Heyworth, C. und Enver, T. (1997): Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system, *Genes Dev* (Band 11), Nr. 6, Seite 774-85
- [158] Feuerborn, A.; Moritz, C.; Von Bonin, F.; Dobbelsstein, M.; Trumper, L.; Sturzenhofecker, B. und Kube, D. (2006): Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma, *Leuk Lymphoma* (Band 47), Nr. 9, Seite 1932-40
- [159] Janz, M.; Stuhmer, T.; Vassilev, L. T. und Bargou, R. C. (2007): Pharmacologic activation of p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *Leukemia* (Band 21), Nr. 4, Seite 772-9
- [160] Martin-Subero, J. I.; Klapper, W.; Sotnikova, A.; Callet-Bauchu, E.; Harder, L.; Bastard, C.; Schmitz, R.; Grohmann, S.; Hoppner, J.; Riemke, J.; Barth, T. F.; Berger, F.; Bernd, H. W.; Claviez, A.; Gesk, S.; Frank, G. A.; Kaplanskaya, I. B.; Moller, P.; Parwaresch, R. M.; Rudiger, T.; Stein, H.; Kuppers, R.; Hansmann, M. L. und Siebert, R. (2006): Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma, *Cancer Res* (Band 66), Nr. 21, Seite 10332-8
- [161] Wlodarska, I.; Nooyen, P.; Maes, B.; Martin-Subero, J. I.; Siebert, R.; Pauwels, P.; De Wolf-Peeters, C. und Hagemeijer, A. (2003): Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma, *Blood* (Band 101), Nr. 2, Seite 706-10
- [162] Mathas, S.; Lietz, A.; Anagnostopoulos, I.; Hummel, F.; Wiesner, B.; Janz, M.; Jundt, F.; Hirsch, B.; Johrens-Leder, K.; Vornlocher, H. P.; Bommert, K.; Stein, H. und Dorken, B. (2004): c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis, *J Exp Med* (Band 199), Nr. 8, Seite 1041-52
- [163] Dutton, A.; O'Neil, J. D.; Milner, A. E.; Reynolds, G. M.; Starczynski, J.; Crocker, J.; Young, L. S. und Murray, P. G. (2004): Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 17, Seite 6611-6
- [164] Kashkar, H.; Haefs, C.; Shin, H.; Hamilton-Dutoit, S. J.; Salvesen, G. S.; Kronke, M. und Jurgensmeier, J. M. (2003): XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells, *J Exp Med* (Band 198), Nr. 2, Seite 341-7
- [165] Mottok, A.; Renne, C.; Willenbrock, K.; Hansmann, M. L. und Brauning, A. (2007): Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6, *Blood* (Band 110), Nr. 9, Seite 3387-90
- [166] Weniger, M. A.; Melzner, I.; Menz, C. K.; Wegener, S.; Bucur, A. J.; Dorsch, K.; Mattfeldt, T.; Barth, T. F. und Moller, P. (2006): Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation, *Oncogene* (Band 25), Nr. 18, Seite 2679-84
- [167] Joos, S.; Kupper, M.; Ohl, S.; von Bonin, F.; Mechttersheimer, G.; Bentz, M.; Marynen, P.; Moller, P.; Pfreundschuh, M.; Trumper, L. und Lichter, P. (2000): Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 3, Seite 549-52
- [168] Emmerich, F.; Theurich, S.; Hummel, M.; Haeffker, A.; Vry, M. S.; Dohner, K.; Bommert, K.; Stein, H. und Dorken, B. (2003): Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *J Pathol* (Band 201), Nr. 3, Seite 413-20
- [169] Cabannes, E.; Khan, G.; Aillet, F.; Jarrett, R. F. und Hay, R. T. (1999): Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha, *Oncogene* (Band 18), Nr. 20, Seite 3063-70
- [170] Barth, T. F.; Martin-Subero, J. I.; Joos, S.; Menz, C. K.; Hasel, C.; Mechttersheimer, G.; Parwaresch, R. M.; Lichter, P.; Siebert, R. und Moller, P. (2003): Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma, *Blood* (Band 101), Nr. 9, Seite 3681-6
- [171] Schmitz, R.; Hansmann, M. L.; Bohle, V.; Martin-Subero, J. I.; Hartmann, S.; Mechttersheimer, G.; Klapper, W.; Vater, I.; Giefing, M.; Gesk, S.; Stanelle, J.; Siebert, R. und Kuppers, R. (2009): TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma, *J Exp Med* (Band 206), Nr. 5, Seite 981-9

Quellenverzeichnis

- [172] Scheeren, F. A.; Diehl, S. A.; Smit, L. A.; Beaumont, T.; Naspetti, M.; Bende, R. J.; Blom, B.; Karube, K.; Ohshima, K.; van Noesel, C. J. und Spits, H. (2008): IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis, *Blood* (Band 111), Nr. 9, Seite 4706-15
- [173] Skinnider, B. F.; Elia, A. J.; Gascoyne, R. D.; Patterson, B.; Trumper, L.; Kapp, U. und Mak, T. W. (2002): Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Blood* (Band 99), Nr. 2, Seite 618-26
- [174] Kube, D.; Holtick, U.; Vockerodt, M.; Ahmadi, T.; Haier, B.; Behrmann, I.; Heinrich, P. C.; Diehl, V. und Tesch, H. (2001): STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines, *Blood* (Band 98), Nr. 3, Seite 762-70
- [175] Kapp, U.; Yeh, W. C.; Patterson, B.; Elia, A. J.; Kagi, D.; Ho, A.; Hessel, A.; Tipsword, M.; Williams, A.; Mirtsos, C.; Itie, A.; Moyle, M. und Mak, T. W. (1999): Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *J Exp Med* (Band 189), Nr. 12, Seite 1939-46
- [176] Carbone, A.; Ghoghini, A.; Gattei, V.; Aldinucci, D.; Degan, M.; De Paoli, P.; Zagonel, V. und Pinto, A. (1995): Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines, *Blood* (Band 85), Nr. 3, Seite 780-9
- [177] Chiu, A.; Xu, W.; He, B.; Dillon, S. R.; Gross, J. A.; Sievers, E.; Qiao, X.; Santini, P.; Hyjek, E.; Lee, J. W.; Cesarman, E.; Chadburn, A.; Knowles, D. M. und Cerutti, A. (2007): Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL, *Blood* (Band 109), Nr. 2, Seite 729-39
- [178] Fiumara, P.; Snell, V.; Li, Y.; Mukhopadhyay, A.; Younes, M.; Gillenwater, A. M.; Cabanillas, F.; Aggarwal, B. B. und Younes, A. (2001): Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines, *Blood* (Band 98), Nr. 9, Seite 2784-90
- [179] Schwab, U.; Stein, H.; Gerdes, J.; Lemke, H.; Kirchner, H.; Schaadt, M. und Diehl, V. (1982): Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells, *Nature* (Band 299), Nr. 5878, Seite 65-7
- [180] Carbone, A.; Ghoghini, A.; Gruss, H. J. und Pinto, A. (1995): CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease, *Am J Pathol* (Band 147), Nr. 4, Seite 912-22
- [181] Pinto, A.; Aldinucci, D.; Ghoghini, A.; Zagonel, V.; Degan, M.; Improta, S.; Juzbasic, S.; Todesco, M.; Perin, V.; Gattei, V.; Herrmann, F.; Gruss, H. J. und Carbone, A. (1996): Human eosinophils express functional CD30 ligand and stimulate proliferation of a Hodgkin's disease cell line, *Blood* (Band 88), Nr. 9, Seite 3299-305
- [182] Molin, D.; Fischer, M.; Xiang, Z.; Larsson, U.; Harvima, I.; Venge, P.; Nilsson, K.; Sundstrom, C.; Enblad, G. und Nilsson, G. (2001): Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease, *Br J Haematol* (Band 114), Nr. 3, Seite 616-23
- [183] Horie, R.; Higashihara, M. und Watanabe, T. (2003): Hodgkin's lymphoma and CD30 signal transduction, *Int J Hematol* (Band 77), Nr. 1, Seite 37-47
- [184] Cheng, P.; Zlobin, A.; Volgina, V.; Gottipati, S.; Osborne, B.; Simel, E. J.; Miele, L. und Gabilovich, D. I. (2001): Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells, *J Immunol* (Band 167), Nr. 8, Seite 4458-67
- [185] Dutton, A.; Reynolds, G. M.; Dawson, C. W.; Young, L. S. und Murray, P. G. (2005): Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR, *J Pathol* (Band 205), Nr. 4, Seite 498-506
- [186] Nagel, S.; Burek, C.; Venturini, L.; Scherr, M.; Quentmeier, H.; Meyer, C.; Rosenwald, A.; Drexler, H. G. und MacLeod, R. A. (2007): Comprehensive analysis of homeobox genes in Hodgkin lymphoma cell lines identifies dysregulated expression of HOXB9 mediated via ERK5 signaling and BMI1, *Blood* (Band 109), Nr. 7, Seite 3015-23
- [187] Mathas, S.; Hinz, M.; Anagnostopoulos, I.; Krappmann, D.; Lietz, A.; Jundt, F.; Bommert, K.; Mehta-Grigoriou, F.; Stein, H.; Dorken, B. und Scheidereit, C. (2002): Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B, *Embo J* (Band 21), Nr. 15, Seite 4104-13
- [188] Renne, C.; Willenbrock, K.; Kuppers, R.; Hansmann, M. L. und Brauning, A. (2005): Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma, *Blood* (Band 105), Nr. 10, Seite 4051-9
- [189] Zheng, B.; Fiumara, P.; Li, Y. V.; Georgakis, G.; Snell, V.; Younes, M.; Vauthey, J. N.; Carbone, A. und Younes, A. (2003): MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival, *Blood* (Band 102), Nr. 3, Seite 1019-27
- [190] Juszczynski, P.; Ouyang, J.; Monti, S.; Rodig, S. J.; Takeyama, K.; Abramson, J.; Chen, W.; Kutok, J. L.; Rabinovich, G. A. und Shipp, M. A. (2007): The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 32, Seite 13134-9

Quellenverzeichnis

- [191] Watanabe, M.; Ogawa, Y.; Ito, K.; Higashihara, M.; Kadin, M. E.; Abraham, L. J.; Watanabe, T. und Horie, R. (2003): AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Am J Pathol* (Band 163), Nr. 2, Seite 633-41
- [192] Skinnider, B. F. und Mak, T. W. (2002): The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma, *Blood* (Band 99), Nr. 12, Seite 4283-97
- [193] Kapp, U.; Dux, A.; Schell-Frederick, E.; Banik, N.; Hummel, M.; Mucke, S.; Fonatsch, C.; Bullerdiek, J.; Gottstein, C.; Engert, A. und et al. (1994): Disseminated growth of Hodgkin's-derived cell lines L540 and L540cy in immune-deficient SCID mice, *Ann Oncol* (Band 5 Suppl 1), Seite 121-6
- [194] Aldinucci, D.; Poletto, D.; Gloghini, A.; Nanni, P.; Degan, M.; Perin, T.; Ceolin, P.; Rossi, F. M.; Gattei, V.; Carbone, A. und Pinto, A. (2002): Expression of functional interleukin-3 receptors on Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Am J Pathol* (Band 160), Nr. 2, Seite 585-96
- [195] Jundt, F.; Anagnostopoulos, I.; Bommert, K.; Emmerich, F.; Muller, G.; Foss, H. D.; Royer, H. D.; Stein, H. und Dorken, B. (1999): Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils, *Blood* (Band 94), Nr. 6, Seite 2065-71
- [196] Gandhi, M. K.; Moll, G.; Smith, C.; Dua, U.; Lambley, E.; Ramuz, O.; Gill, D.; Marlton, P.; Seymour, J. F. und Khanna, R. (2007): Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma, *Blood* (Band 110), Nr. 4, Seite 1326-9
- [197] Newcom, S. R. und Gu, L. (1995): Transforming growth factor beta 1 messenger RNA in Reed-Sternberg cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease, *J Clin Pathol* (Band 48), Nr. 2, Seite 160-3
- [198] Sambrook, J. und Fritsch, E.F. (1989): *Molecular Cloning*, 2nd Edition. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press
- [199] Delhase, M.; Hayakawa, M.; Chen, Y. und Karin, M. (1999): Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation, *Science* (Band 284), Nr. 5412, Seite 309-13
- [200] van Engeland, M.; Nieland, L. J.; Ramaekers, F. C.; Schutte, B. und Reutelingsperger, C. P. (1998): Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure, *Cytometry* (Band 31), Nr. 1, Seite 1-9
- [201] Joos, S.; Granzow, M.; Holtgreve-Grez, H.; Siebert, R.; Harder, L.; Martin-Subero, J. I.; Wolf, J.; Adamowicz, M.; Barth, T. F.; Lichter, P. und Jauch, A. (2003): Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2, *Int J Cancer* (Band 103), Nr. 4, Seite 489-95
- [202] Buettner, R.; Mora, L. B. und Jove, R. (2002): Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention, *Clin Cancer Res* (Band 8), Nr. 4, Seite 945-54
- [203] Gruss, H. J.; Brach, M. A.; Drexler, H. G.; Bonifer, R.; Mertelsmann, R. H. und Herrmann, F. (1992): Expression of cytokine genes, cytokine receptor genes, and transcription factors in cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Cancer Res* (Band 52), Nr. 12, Seite 3353-60
- [204] Stein, H.; Mason, D. Y.; Gerdes, J.; O'Connor, N.; Wainscoat, J.; Pallesen, G.; Gatter, K.; Falini, B.; Delsol, G.; Lemke, H. und et al. (1985): The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells, *Blood* (Band 66), Nr. 4, Seite 848-58
- [205] Caruso, R.; Fina, D.; Peluso, I.; Stolfi, C.; Fantini, M. C.; Gioia, V.; Caprioli, F.; Del Vecchio Blanco, G.; Paoluzi, O. A.; Macdonald, T. T.; Pallone, F. und Monteleone, G. (2007): A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3 α , by gut epithelial cells, *Gastroenterology* (Band 132), Nr. 1, Seite 166-75
- [206] Marshall, N. A.; Christie, L. E.; Munro, L. R.; Culligan, D. J.; Johnston, P. W.; Barker, R. N. und Vickers, M. A. (2004): Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma, *Blood* (Band 103), Nr. 5, Seite 1755-62
- [207] Holtick, U.; Vockerodt, M.; Pinkert, D.; Schoof, N.; Sturzenhofecker, B.; Kussebi, N.; Lauber, K.; Wesselborg, S.; Loffler, D.; Horn, F.; Trumper, L. und Kube, D. (2005): STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of typhostin AG17 which confers sensitization for apoptosis, *Leukemia* (Band 19), Nr. 6, Seite 936-44
- [208] Moreau, A.; Praloran, V.; Berrada, L.; Coupey, L. und Gaillard, F. (1992): Immunohistochemical detection of cells positive for colony-stimulating factor 1 in lymph nodes from reactive lymphadenitis, and Hodgkin's disease, *Leukemia* (Band 6), Nr. 2, Seite 126-30
- [209] Mathas, S.; Kreher, S.; Meaburn, K. J.; Johrens, K.; Lamprecht, B.; Assaf, C.; Sterry, W.; Kadin, M. E.; Daibata, M.; Joos, S.; Hummel, M.; Stein, H.; Janz, M.; Anagnostopoulos, I.; Schrock, E.; Misteli, T. und Dorken, B. (2009): Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 106), Nr. 14, Seite 5831-6
- [210] Burns, C. J.; Harte, M. F.; Bu, X.; Fantino, E.; Giarrusso, M.; Joffe, M.; Kurek, M.; Legge, F. S.; Razzino, P.; Su, S.; Treutlein, H.; Wan, S. S.; Zeng, J. und Wilks, A. F. (2009): Discovery of 2-(α -methylbenzylamino) pyrazines as potent Type II inhibitors of FMS, *Bioorg Med Chem Lett* (Band 19), Nr. 4, Seite 1206-9

Quellenverzeichnis

- [211] Irvine, K. M.; Burns, C. J.; Wilks, A. F.; Su, S.; Hume, D. A. und Sweet, M. J. (2006): A CSF-1 receptor kinase inhibitor targets effector functions and inhibits pro-inflammatory cytokine production from murine macrophage populations, *FASEB J* (Band 20), Nr. 11, Seite 1921-3
- [212] Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark und Shlomchik, Mark (2002): *Immunologie* (Band 5), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
- [213] Brach, M. A.; Arnold, C.; Kiehntopf, M.; Gruss, H. J. und Herrmann, F. (1993): Transcriptional activation of the macrophage colony-stimulating factor gene by IL-2 is associated with secretion of bioactive macrophage colony-stimulating factor protein by monocytes and involves activation of the transcription factor NF-kappa B, *J Immunol* (Band 150), Nr. 12, Seite 5535-43
- [214] Li, X.; Massa, P. E.; Hanidu, A.; Peet, G. W.; Aro, P.; Savitt, A.; Mische, S.; Li, J. und Marcu, K. B. (2002): IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 47, Seite 45129-40
- [215] Harrington, M. A.; Edenberg, H. J.; Saxman, S.; Pedigo, L. M.; Daub, R. und Broxmeyer, H. E. (1991): Cloning and characterization of the murine promoter for the colony-stimulating factor-1-encoding gene, *Gene* (Band 102), Nr. 2, Seite 165-70
- [216] Hinz, M.; Lemke, P.; Anagnostopoulos, I.; Hacker, C.; Krappmann, D.; Mathas, S.; Dorken, B.; Zenke, M.; Stein, H. und Scheidereit, C. (2002): Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity, *J Exp Med* (Band 196), Nr. 5, Seite 605-17
- [217] Hinz, M.; Loser, P.; Mathas, S.; Krappmann, D.; Dorken, B. und Scheidereit, C. (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* (Band 97), Nr. 9, Seite 2798-807
- [218] Brown, K.; Gerstberger, S.; Carlson, L.; Franzoso, G. und Siebenlist, U. (1995): Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation, *Science* (Band 267), Nr. 5203, Seite 1485-8
- [219] Bargou, R. C.; Emmerich, F.; Krappmann, D.; Bommert, K.; Mapara, M. Y.; Arnold, W.; Royer, H. D.; Grinstein, E.; Greiner, A.; Scheidereit, C. und Dorken, B. (1997): Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells, *J Clin Invest* (Band 100), Nr. 12, Seite 2961-9
- [220] Jundt, F.; Kley, K.; Anagnostopoulos, I.; Schulze Probsting, K.; Greiner, A.; Mathas, S.; Scheidereit, C.; Wirth, T.; Stein, H. und Dorken, B. (2002): Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease, *Blood* (Band 99), Nr. 8, Seite 3060-2
- [221] Medstrand, P.; van de Lagemaat, L. N. und Mager, D. L. (2002): Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes, *Genome Res* (Band 12), Nr. 10, Seite 1483-95
- [222] Whitelaw, E. und Martin, D. I. (2001): Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals, *Nat Genet* (Band 27), Nr. 4, Seite 361-5
- [223] Cohen, C. J.; Lock, W. M. und Mager, D. L. (2009): Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: a critical assessment, *Gene* (Band 448), Nr. 2, Seite 105-14
- [224] Weber, G. F. (2008): Molecular mechanisms of metastasis, *Cancer Lett* (Band 270), Nr. 2, Seite 181-90
- [225] Kota, J.; Caceres, N. und Constantinescu, S. N. (2008): Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms, *Leukemia* (Band 22), Nr. 10, Seite 1828-40
- [226] Van Etten, R. A. (2007): Aberrant cytokine signaling in leukemia, *Oncogene* (Band 26), Nr. 47, Seite 6738-49
- [227] Bard, J. D.; Gelebart, P.; Anand, M.; Amin, H. M. und Lai, R. (2008): Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK+ anaplastic large cell lymphoma, *Leukemia* (Band 22), Nr. 8, Seite 1595-603
- [228] Qiu, L.; Lai, R.; Lin, Q.; Lau, E.; Thomazy, D. M.; Calame, D.; Ford, R. J.; Kwak, L. W.; Kirken, R. A. und Amin, H. M. (2006): Autocrine release of interleukin-9 promotes Jak3-dependent survival of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma cells, *Blood* (Band 108), Nr. 7, Seite 2407-15
- [229] Le Gouill, S.; Podar, K.; Harousseau, J. L. und Anderson, K. C. (2004): Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma, *Cell Cycle* (Band 3), Nr. 10, Seite 1259-62
- [230] Taga, T. und Kishimoto, T. (1997): Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines, *Annu Rev Immunol* (Band 15), Seite 797-819
- [231] Kishimoto, T. (2005): Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology, *Annu Rev Immunol* (Band 23), Seite 1-21
- [232] Jucker, M.; Abts, H.; Li, W.; Schindler, R.; Merz, H.; Gunther, A.; von Kalle, C.; Schaadt, M.; Diamantstein, T.; Feller, A. C. und et al. (1991): Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease, *Blood* (Band 77), Nr. 11, Seite 2413-8

Quellenverzeichnis

- [233] Rubie, C.; Oliveira-Frick, V.; Rau, B.; Schilling, M. und Wagner, M. (2006): Chemokine receptor CCR6 expression in colorectal liver metastasis, *J Clin Oncol* (Band 24), Nr. 32, Seite 5173-4; author reply 5174
- [234] Campbell, A. S.; Albo, D.; Kimsey, T. F.; White, S. L. und Wang, T. N. (2005): Macrophage inflammatory protein-3alpha promotes pancreatic cancer cell invasion, *J Surg Res* (Band 123), Nr. 1, Seite 96-101
- [235] Cattaruzza, L.; Gloghini, A.; Olivo, K.; Di Francia, R.; Lorenzon, D.; De Filippi, R.; Carbone, A.; Colombatti, A.; Pinto, A. und Aldinucci, D. (2009): Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: Involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma, *Int J Cancer* (Band 125), Nr. 5, Seite 1092-101
- [236] Rodig, S. J.; Ouyang, J.; Juszczynski, P.; Currie, T.; Law, K.; Neuberg, D. S.; Rabinovich, G. A.; Shipp, M. A. und Kutok, J. L. (2008): AP1-dependent galectin-1 expression delineates classical hodgkin and anaplastic large cell lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features, *Clin Cancer Res* (Band 14), Nr. 11, Seite 3338-44
- [237] Ferrari-Lacraz, S.; Chicheportiche, R.; Schneiter, G.; Molnarfi, N.; Villard, J. und Dayer, J. M. (2008): IL-21 promotes survival and maintains a naive phenotype in human CD4+ T lymphocytes, *Int Immunol* (Band 20), Nr. 8, Seite 1009-18
- [238] Bucher, C.; Koch, L.; Vogtenhuber, C.; Goren, E.; Munger, M.; Panoskaltis-Mortari, A.; Sivakumar, P. und Blazar, B. R. (2009): IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation, *Blood* (Band 114), Nr. 26, Seite 5375-84
- [239] Fina, D.; Sarra, M.; Caruso, R.; Del Vecchio Blanco, G.; Pallone, F.; MacDonald, T. T. und Monteleone, G. (2008): Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease, *Gut* (Band 57), Nr. 7, Seite 887-92
- [240] Monteleone, G.; Monteleone, I.; Fina, D.; Vavassori, P.; Del Vecchio Blanco, G.; Caruso, R.; Tersigni, R.; Alessandrini, L.; Biancone, L.; Naccari, G. C.; MacDonald, T. T. und Pallone, F. (2005): Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease, *Gastroenterology* (Band 128), Nr. 3, Seite 687-94
- [241] Shaposhnik, Z.; Wang, X. und Lusic, A. J. (2010): Arterial colony stimulating factor-1 influences atherosclerotic lesions by regulating monocyte migration and apoptosis, *J Lipid Res*
- [242] Green, C. E.; Liu, T.; Montel, V.; Hsiao, G.; Lester, R. D.; Subramaniam, S.; Gonias, S. L. und Klemke, R. L. (2009): Chemoattractant signaling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis and neovascularization, *PLoS One* (Band 4), Nr. 8, Seite e6713
- [243] Steidl, C.; Lee, T.; Shah, S. P.; Farinha, P.; Han, G.; Nayar, T.; Delaney, A.; Jones, S. J.; Iqbal, J.; Weisenburger, D. D.; Bast, M. A.; Rosenwald, A.; Muller-Hermelink, H. K.; Rimsza, L. M.; Campo, E.; Delabie, J.; Brazier, R. M.; Cook, J. R.; Tubbs, R. R.; Jaffe, E. S.; Lenz, G.; Connors, J. M.; Staudt, L. M.; Chan, W. C. und Gascoyne, R. D. (2010): Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma, *N Engl J Med* (Band 362), Nr. 10, Seite 875-85
- [244] Priceman, S. J.; Sung, J. L.; Shaposhnik, Z.; Burton, J. B.; Torres-Collado, A. X.; Moughon, D. L.; Johnson, M.; Lusic, A. J.; Cohen, D. A.; Iruela-Arispe, M. L. und Wu, L. (2010): Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy, *Blood* (Band 115), Nr. 7, Seite 1461-71
- [245] Beck, A. H.; Espinosa, I.; Edris, B.; Li, R.; Montgomery, K.; Zhu, S.; Varma, S.; Marinelli, R. J.; van de Rijn, M. und West, R. B. (2009): The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma, *Clin Cancer Res* (Band 15), Nr. 3, Seite 778-87
- [246] Hiraga, T. und Nakamura, H. (2009): Imatinib mesylate suppresses bone metastases of breast cancer by inhibiting osteoclasts through the blockade of c-Fms signals, *Int J Cancer* (Band 124), Nr. 1, Seite 215-22
- [247] Bock, M. und Stoye, J. P. (2000): Endogenous retroviruses and the human germline, *Curr Opin Genet Dev* (Band 10), Nr. 6, Seite 651-5
- [248] Jern, P. und Coffin, J. M. (2008): Effects of retroviruses on host genome function, *Annu Rev Genet* (Band 42), Seite 709-32
- [249] Mi, S.; Lee, X.; Li, X.; Veldman, G. M.; Finnerty, H.; Racie, L.; LaVallie, E.; Tang, X. Y.; Edouard, P.; Howes, S.; Keith, J. C., Jr. und McCoy, J. M. (2000): Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis, *Nature* (Band 403), Nr. 6771, Seite 785-9
- [250] Galagan, J. E. und Selker, E. U. (2004): RIP: the evolutionary cost of genome defense, *Trends Genet* (Band 20), Nr. 9, Seite 417-23
- [251] Girard, A. und Hannon, G. J. (2008): Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control, *Trends Cell Biol* (Band 18), Nr. 3, Seite 136-48
- [252] Reik, W. (2007): Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development, *Nature* (Band 447), Nr. 7143, Seite 425-32
- [253] zur Hausen, H. (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat Rev Cancer* (Band 2), Nr. 5, Seite 342-50

Quellenverzeichnis

- [254] Voisset, C.; Weiss, R. A. und Griffiths, D. J. (2008): Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease, *Microbiol Mol Biol Rev* (Band 72), Nr. 1, Seite 157-96, table of contents
- [255] Samuelson, L. C.; Wiebauer, K.; Snow, C. M. und Meisler, M. H. (1990): Retroviral and pseudogene insertion sites reveal the lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution, *Mol Cell Biol* (Band 10), Nr. 6, Seite 2513-20
- [256] Medstrand, P.; Landry, J. R. und Mager, D. L. (2001): Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 3, Seite 1896-903
- [257] Smit, A. F. (1993): Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons, *Nucleic Acids Res* (Band 21), Nr. 8, Seite 1863-72
- [258] Jost, P. J. und Ruland, J. (2007): Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications, *Blood* (Band 109), Nr. 7, Seite 2700-7
- [259] Rossetti, S.; Hoogeveen, A. T. und Sacchi, N. (2004): The MTG proteins: chromatin repression players with a passion for networking, *Genomics* (Band 84), Nr. 1, Seite 1-9
- [260] Chyla, B. J.; Moreno-Miralles, I.; Steapleton, M. A.; Thompson, M. A.; Bhaskara, S.; Engel, M. und Hiebert, S. W. (2008): Deletion of Mtg16, a target of t(16;21), alters hematopoietic progenitor cell proliferation and lineage allocation, *Mol Cell Biol* (Band 28), Nr. 20, Seite 6234-47