

JÖRN HENDRIK REUTER

***In-vivo*-Studien der Gene *Atm* und *Ccnd1* in der  
Pathogenese lymphatischer Neoplasien**







# Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
**Jörn Hendrik Reuter**  
aus Frankfurt am Main

Tag der mündlichen Prüfung:









## Wissenschaftliche Publikationen

Ericsson, O., Jarvius, J., Schallmeiner, E., Howell, M., Nong, R., **Reuter, H.**, Hahn, M., Stenberg, J., Nilsson, M., Landegren, U. (2007) A dual-tag microarray platform for high-performance nucleic acid and protein analyses. *Nucleic Acids Res* (eingereicht).

Licht, A.H., Pein, O., Florin, L., Hartenstein, B., **Reuter, H.**, Arnold, B., Lichter, P., Angel, P., Schorpp-Kistner, M. (2006) JunB is required for endothelial cell morphogenesis by regulating core-binding factor beta. *J Cell Biol*, 175 (6); 981-991.

Deshpande, A.J., Cusan, M., Rawat, V.P., **Reuter, H.**, Krause, A., Pott, C., Quintanilla-Martinez, L., Kakadia, P., Kuchenbauer, F., Ahmed, F., Delabesse, E., Hahn, M., Lichter, P., Kneba, M., Hiddemann, W., Macintyre, E., Mecucci, C., Ludwig, W.D., Humphries, R.K., Bohlander, S.K., Feuring-Buske, M., Buske, C. (2006) Acute myeloid leukemia is propagated by a leukemic stem cell with lymphoid characteristics in a mouse model of CALM/AF10-positive leukemia. *Cancer Cell*, 10 (5): 363-374.

Feuring-Buske, M., Hartmann, E.M., Ott, G., **Reuter, H.**, Buske, C., Rosenwald, A., (2006) DNA-chips in the diagnosis of hematological malignancies. Review, *Internist*, 47 (1): 39-46.

**Reuter, H.**, Tews, B., Wilhelm, J., Hahn, M., (2004) Quantitative Chimerism Analysis by Allele-Specific Real-Time PCR of a 10bp Insertion/Deletion Polymorphism within the Promotor Region of Factor VIIc. In: Wittwer, C., Hahn, M., Kaul, K. (Eds): *Rapid Cycle Real-Time PCR-Methods, Methods and Applications: Quantification*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.



## Danksagung

Mein Dank gilt,

der Studienstiftung des Deutschen Volkes und der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung für ihr langjähriges Vertrauen und die ideelle sowie finanzielle Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit in Form von Stipendien;

Prof. Dr. Peter Lichter für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Abteilung Molekulare Genetik des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg anzufertigen und darüber hinaus für seine uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft und das Gewähren großer Forschungsfreiheit;

PD Dr. Karsten Rippe für seine Bereitschaft, diese Arbeit vor dem Promotionsausschuss der Fakultät für Biowissenschaften der Universität Heidelberg zu vertreten;

Prof. Dr. Stefan Bohlander und PD Dr. Christian Buske für die freundliche Aufnahme am Hämatologikum der GSF, München und ihr Engagement und Interesse an meiner Arbeit; sowie allen Mitgliedern der KKG Leukämie für eine schöne und aufregende Forschungszeit sowie die äusserst nette Zusammenarbeit in angenehmer Atmosphäre; insbesondere Monica Cusan für ihre selbstlose Unterstützung bei der Arbeit mit Mäusen und in der Zellkultur;

PD Dr. Christine Falk für ihre Expertise in der T-Zell-Immunologie, ihre experimentellen Vorschläge sowie die Unterstützung bei deren Umsetzung, als auch für ihre stete Bereitschaft zur Diskussion;

PD Dr. Ralf Rieker für seine Hilfsbereitschaft und auch technische Unterstützung bei allen histopathologischen Fragestellungen;

Wiebke Werft, Axel Benner, Dr. Benedikt Brors und Grischa Tödt für ihre Unterstützung in sämtlichen statistischen und bioinformatischen Fragestellungen;

Dr. Meinhard Hahn für sein persönliches und freundschaftliches Engagement, die hilfreiche Beratung in Fragen der Antragstellung, sowie sein grundsätzliches Interesse an dieser Arbeit;

Dr. Ute Koch für die ersten Einblicke in die Welt des FACS und der Hämatopoese, sowie für ihr stetes Interesse am Verlauf des Projektes;

insbesondere Oliver Wanek doch auch Frauke Devens für die tatkräftige experimentelle Unterstützung;

meinen Laborkollegen und Freunden Dr. Frank Mendrzyk und Dr. Björn Tews für eine unvergessliche Zeit;

meiner Liebe Dr. Julia Peters für ihre Geduld bei der umfassenden Korrektur dieser Arbeit und ihr großes Verständnis. Viel mehr aber danke ich ihr dafür, dass ich mein Leben mit ihr teilen darf und wir unseren Traum zukünftig als kleine Familie leben können;

meinen Eltern für die selbstlose Förderung, ihre offenen Ohren, ihr Verständnis für meine Sorgen und einen sicheren Hafen - ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti-
aCGH	<i>array-based comparative genome hybridization</i>
ALCL	<i>anaplastic large cell lymphoma</i>
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zell-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
B220	B-Zell-Marker 220 (CD45)
C-	<i>constant</i>
<i>Ccnd1</i>	Cyclin D1-Gen
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CGH	<i>comparative genome hybridization</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitors</i>
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CMP	<i>common myeloid progenitors</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Carboxycyanin
D-	<i>diversity</i>
ddH <sub>2</sub> O	bi-destilliertes Wasser
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DN	doppelt negativ
DP	doppelt positiv
DSB	(DNA-) Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Di-Natriumsalz
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
5-FU	5-Fluorouracil
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GITC	Guanidinium-Isothiocyanat
GMP	<i>granulo- / myelomonocytic progenitor</i>
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HBS	<i>hepes buffered saline</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzellen ( <i>hematopoetic stem cells</i> )
IF	Immunfluoreszenz
IgD	Immunglobulin D
Igκ	Immunglobulin, κ-Kette
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>

ISP	<i>immature single positive</i>
IVC	<i>isolated ventilated cages</i>
J-	<i>joining</i>
LB	Luria Broth
LT-HSC	<i>long term hematopoietic stem cell</i>
MALT	<i>mucosa-associated lymphatic tissue</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCL	<i>mantle cell lymphoma</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
MEP	<i>megakaryotic / erythroid progenitor</i>
M-FISH	<i>multicolor fluorescence in situ hybridization</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MPP	<i>multipotent progenitors</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSCV	<i>murine stem cell virus</i>
NaAc	Natriumacetat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHL	Non-Hodgin-Lymphom
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin

PLL	Prolymphozytenleukämie
pRB	Retinoblastomprotein
Pro-DC	<i>pro dendritic cell</i>
pBCR	Prä-B-Zell-Rezeptor
pTCR	Prä-T-Zell-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>resolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
SP	<i>single-positive</i>
ST-HSC	<i>short term hematopoietic stem cell</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TCR $\beta$	T-Zell-Rezeptor- $\beta$ -Kette
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
UV	Ultraviolettes Licht
V-	<i>variable</i>
VCM	<i>virus containing medium</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp



## Inhaltsverzeichnis

Wissenschaftliche Publikationen .....	IX
Danksagung .....	XI
Abkürzungsverzeichnis .....	XIII
Inhaltsverzeichnis .....	XVII
Zusammenfassung .....	XXI
Summary .....	XXIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das hämatopoetische System .....	1
1.1.1. Die Hämatopoese .....	1
1.1.2. Die B-Lymphozyten .....	2
1.1.3. Die T-Lymphozyten .....	7
1.2. Lymphatische Neoplasien .....	9
1.2.1. B-Lymphozytäre Neoplasien .....	12
1.2.2. Das Mantelzell-Lymphom .....	16
1.2.3. T-Lymphozytäre Neoplasien .....	19
1.3. Murine Modellsysteme in der Onkologie .....	20
1.4. Das Tumorsuppressorgen <i>Atm</i> .....	23
1.5. Das Onkogen <i>Ccnd1</i> .....	28
1.6. Zielsetzung der Arbeit .....	31
2. Materialien und Methoden .....	33
2.1. Materialien .....	33
2.1.1. Zelllinien .....	33
2.1.2. Mausstämme.....	34
2.1.3. Oligonukleotide .....	35
2.1.4. Plasmide .....	36
2.1.5. Kulturmedien und Zusätze .....	36
2.1.6. Enzyme .....	36
2.1.7. Antikörper .....	37
2.1.8. Größenstandards .....	37
2.1.9. Reagenziensätze .....	37
2.1.10. Chemikalien .....	38

2.1.11. Spezielle Geräte .....	39
2.1.12. Bioinformatrische Hilfsmittel .....	39
2.1.12.1. Datenbanken.....	39
2.1.12.2. Software.....	40
2.2. Methoden .....	41
2.2.1. Tiermodell.....	41
2.2.1.1. Mausezucht und Haltung .....	41
2.2.1.2. Genotypisierung der Mäuse .....	41
2.2.1.3. Blutabnahme .....	42
2.2.1.4. Töten von Mäusen .....	43
2.2.1.5. Sektion von Mäusen.....	43
2.2.1.6. Thym- und Splenektomie .....	43
2.2.1.7. Kryokonservierung von Gewebeproben .....	43
2.2.1.8. Knochenmarks-Transplantationsmodell .....	44
2.2.1.8.1. Konstrukte und retrovirale Vektoren .....	45
2.2.1.8.2. Verpacken rekombinanter Plasmide in Viruskapside.....	46
2.2.1.8.3. Stabile Virusproduktion in E86 GP <sup>+</sup> -Zellen .....	47
2.2.1.8.4. Analyse der Virusproduktion von E86 GP <sup>+</sup> -Zellen .....	47
2.2.1.9. Entnahme von murinem Knochenmark und Infektion mit Viren.....	47
2.2.1.9.1. Transplantation des Knochenmarks .....	48
2.2.1.9.2. Beobachtung der transplantierten Mäuse.....	48
2.2.1.9.3. Entnahme von Knochenmark durch Punktion des Femur.....	49
2.2.1.10. Zellbiologische Analysen.....	49
2.2.1.10.1. <i>Cytospins</i> .....	49
2.2.1.10.2. Blutausstriche .....	50
2.2.1.10.3. Panoptische Färbung nach Pappenheim.....	50
2.2.1.11. Histopathologie und Gewebefixierung.....	50
2.2.1.11.1. Durchflusszytometrische Methoden.....	50
2.2.2. Molekularbiologische Analysemethoden.....	52
2.2.2.1. DNA-, RNA- und Proteinextraktion.....	52
2.2.2.2. Quantitäts- und Qualitätsanalysen von Nukleinsäuren.....	53
2.2.2.3. Genomanalysen .....	54
2.2.2.3.1. <i>Comparative Genome Hybridisation</i> (CGH).....	54
2.2.2.3.2. <i>Array-based Comparative Genome Hybridisation</i> (aCGH) .....	54

2.2.2.3.3. Multicolor Fluorescence in situ Hybridisation (M-FISH).....	55
2.2.2.4. Microarray gestützte Genexpressionsanalysen .....	55
2.2.2.4.1. Herstellung von Oligonukleotid-Microarrays.....	55
2.2.2.4.2. Probenamplifikation und -hybridisierung .....	56
2.2.2.4.3. Scannen der Microarrays und Datenvorverarbeitung.....	57
2.2.2.5. Bioinformatrische Auswertung .....	57
2.2.2.6. Sequenzierung von DNA .....	58
2.2.2.7. Bestimmung der Tumorklonalität .....	58
3. Ergebnisse .....	61
3.1. Mausmodelle des Mantelzell-Lymphoms .....	61
3.1.1. Kreuzung von <i>Atm-knock-out</i> und <i>Ccnd1</i> transgenen Mausstämmen.....	62
3.1.1.1. Züchtung der Mausstämmes .....	62
3.1.1.2. Immunophänotypische Charakterisierung .....	62
3.1.1.2.1. B-Zell-Phänotypen in Abhängigkeit von <i>Atm</i> .....	63
3.1.1.2.2. B-Zell-Phänotypen in Abhängigkeit von <i>Atm</i> und <i>Cyclin D1</i> .....	66
3.1.1.3. Hämatologische Neoplasien in <i>Atm-knock-out</i> -Mäusen – Thymische Lymphome .....	68
3.1.1.4. Analyse der Überlebenszeiten .....	69
3.1.2. Knochenmarkstransplantationsmodell zur Kombination von <i>Atm knock out</i> und <i>Ccnd1</i> Überexpression .....	71
3.1.2.1. Rekombinante MSCV-Retroviren als Vektoren zur kombinierten Expression von <i>Cyclin D1</i> und <i>GFP</i> .....	71
3.1.2.2. Transplantation retroviral infizierter Knochenmarksstammzellen.....	73
3.1.2.3. Beobachtung hämatologischer Neoplasien in transplantierten Mäusen .....	74
3.2. Mausmodell des <i>Atm</i> -defizienten T-Zell-Lymphoms .....	77
3.2.1. Histopathologische Analyse von Wildtyp-Thymus und thymischem Lymphom.....	77
3.2.2. Immunophänotypische Charakterisierung von T-Lymphozyten aus Wildtyp-Thymus und thymischem Lymphom .....	79
3.2.2.1. Expression von <i>CD4</i> und <i>CD8</i> .....	79
3.2.2.2. Expression von <i>CD69</i> .....	81
3.2.2.3. Expression von <i>CD25</i> und <i>TCR<math>\beta</math></i> .....	82
3.2.3. Untersuchungen zu Tumorklonalität und <i>Tcr<math>\beta</math></i> Rearrangement.....	88

3.2.4. Genomische Analyse von thymischen <i>Atm</i> <sup>-/-</sup> Lymphomen.....	92
3.2.5. Globale Analyse des Genexpressionsmusters <i>Atm</i> -defizienter thymischer Lymphome .....	98
3.2.6. Genomische Analyse von <i>Atm</i> <sup>-/-</sup> -Thymi ohne makroskopisch erkennbarem T-Zell-Lymphom .....	100
3.2.7. „Cutpoint“-Analyse .....	103
3.2.8. Genomische Analysen des <i>Notch1</i> -Lokus und Expressionsanalysen <i>Notch1</i> -regulierter Gene.....	105
3.2.9. Netzwerkanalyse von Expressionsdaten und deren durchflusszytometrische Validierung.....	110
4. Diskussion .....	115
4.1. Das murine Mantelzell-Lymphom-Modell .....	116
4.2. Die Ursprungszellen des thymischen <i>Atm</i> <sup>-/-</sup> Lymphoms .....	122
4.3. Frühe genomische Imbalancen auf den Chromosomen 12, 14 und 15 im thymischen <i>Atm</i> <sup>-/-</sup> Lymphom.....	125
4.4. Deregulierte Genexpression in verschiedenen genomischen Stadien des thymischen <i>Atm</i> <sup>-/-</sup> Lymphoms .....	128
4.5. Funktioneller genomischer <i>Notch1</i> -Zugewinn .....	132
4.6. Deregulation von Apoptose-assoziierten Faktoren.....	133
5. Referenzen .....	137

## Zusammenfassung

Lymphatische Neoplasien stellen eine heterogene Gruppe proliferativer Erkrankungen der Lymphozyten dar. Zwar konnten die zugrundeliegenden Pathomechanismen in einigen wenigen Fällen bereits entschlüsselt werden, doch sind sie bei der Mehrzahl der lymphatischen Leukämien und Lymphome unbekannt. So besteht auch für das bisher unheilbare Mantelzell-Lymphom (MCL) großer Bedarf an der Entschlüsselung der zugrundeliegenden molekularen Vorgänge, die letztlich zur Entstehung des Lymphoms führen. Erste Anhaltspunkte lieferte bereits die Aufdeckung der chromosomalen Translokation t(11;14)(q13;q32), welche letztendlich zu der für das MCL charakteristischen Überexpression von *Cyclin D1* führt. Ferner konnte in 75 % der MCL-Fälle eine Inaktivierung der Proteinkinase ATM nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, durch Kombination der genannten Aberrationen im murinen System ein Modell zu schaffen, an dem die Pathomechanismen von B-Zell-Lymphomen und insbesondere von MCL untersucht werden können. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurden die genetischen Aberrationen durch Kreuzung eines *Atm-knock-out* und eines *Ccnd1* transgenen Mausstammes zusammengeführt, zum anderen wurden mit *Ccnd1*-rekombinanten Retroviren infizierte, *Atm*-defiziente hämatopoetische Stammzellen zur Rekonstitution des hämatopoetischen Systems letal bestrahlter Mäuse genutzt. In keinem der Ansätze konnte nach langfristiger Beobachtung und eingehender Untersuchung die Entstehung eines B-Zell-Lymphoms festgestellt werden. Hingegen wurden Hinweise gefunden, wonach die molekularen Folgen des *Atm*-Verlusts dem Effekt der *Ccnd1*-Überexpression entgegenwirken. Darüber hinaus entwickelten alle *Atm*-defizienten Mäuse unabhängig von *Ccnd1*-Status thymische T-Zell-Lymphome.

Anhand immunphänotypischer und molekulargenetischer Untersuchungen wurde die weitestgehend unverstandene Genese dieser durch *Atm*-Verlust verursachten Tumoren untersucht. Die neoplastischen Zellen der T-Zell-Lymphome wurden umfassend charakterisiert und konnten als nicht aktivierte, CD4 CD8 doppelt positive T-Lymphozyten identifiziert werden, die eine ausgeprägte Deregulation der entwicklungspezifischen Oberflächenmoleküle CD25 und T-Zell-Rezeptor  $\beta$  (TCR $\beta$ ) zeigen. Erstmals konnten in dieser Arbeit sowohl der oligoklonale Ursprung dieser Tumorzellen als auch deren inkorrekte Rekombination des *TCR  $\beta$*  Gens nachgewiesen werden. Die Untersuchung der *Atm*<sup>-/-</sup> T-Zell-Lymphome mit hochauflösenden aCGH-*microarrays* ließ charakteristische genomische Imbalancen (Chromosom 12, 14 und 15) erkennen, von welchen der *TCR $\alpha$* -Lokus auf Chromosom 14 grundsätzlich in sämtlichen untersuchten Proben betroffen war. Basierend auf der Analyse von *Atm*<sup>-/-</sup> Thymi ohne Lymphom konnten genomische Tumorstadien als Stadien beschrieben werden, deren mittels *microarray*-basierter Expressionsanalyse erstellte Transkriptionsprofile grundlegend von den Profilen genomisch unveränderter Thymi abweichen. Die weitere Auswertung der gewonnenen Expressionsdaten ergab neue Erkenntnisse über die transkriptionelle Deregulation tumorassoziierter Gene, wie z. B. *Tuba1* und *Aurka*. Die Mehrzahl der hier untersuchten T-Zell-Lymphome wies darüber hinaus einen genomischen *Notch1*-Zugewinn auf, der sich in der Deregulation *Notch1*-regulierter Gene, insbesondere *c-Myc*, *Dtx1* und *Hes1*, auswirkte. Durch bioinformatische Auswertung der gewonnenen Expressionsdaten konnte ein Netzwerk deregulierter Gene postuliert werden, welches auf eine Dysregulation der CD95 vermittelten Apoptose in der betroffenen T-Zellpopulation der Lymphome hinweist.



## Summary

Lymphatic neoplasias represent proliferative diseases of lymphocytes. While the pathomechanisms for some of these diseases have been extensively investigated and elucidated, for most of the lymphatic leukemias and lymphomas they are still unknown. Also for the so called mantle cell lymphoma (MCL), a high-malign and as yet incurable B-cell lymphoma, the molecular processes that underlie tumorigenesis are unclear. Nevertheless, first evidences came from two important findings several years ago. One of them specify a chromosomal translocation, t(11;14)(q13;q32), resulting in the characteristic overexpression of the cell cycle regulator protein cyclin D1. The other one, which is described for about 75% of all MCL, is the inactivation of the protein kinase *ATM* gene.

Based on these findings the first aim of this study was to establish a mouse model system, representing both above named genetic aberrations, to investigate the pathomechanisms of B-cell-lymphomas including MCL. To this purpose two independent approaches were chosen. While one model was generated by cross-breeding an *Atm* knock out mouse with a *cyclin D1* transgenic mouse, another model was build by transplantation of retroviral infected *Atm*-deficient bone marrow stem cells into lethally irradiated mice to reconstitute the haematopoietic system overexpressing *cyclin D1*. As a result of these breeding experiments in none of the mice a MCL was detected, however extensive analysis of the animals provided evidences that the molecular mechanisms resulting from *Atm*-deficiency on one hand side, and *cyclin D1* overexpression on the other hand side, would counteract each other. Moreover, all *Atm*-deficient mice developed severe thymic T-cell lymphoma.

Using immuno-phenotypic as well as molecular-genetic assays, *Atm* knock out mice were used to investigate essentially unknown molecular processes involved in *Atm*-deficiency dependent, thymic T-cell lymphoma. The experimental results led to the identification of neoplastic cells as CD4 CD8 double positive, non-activated T-lymphocytes, characterized by a severe deregulation of T-cell development specific cell surface markers, CD25 and T-cell receptor  $\beta$  (TcR $\beta$ ). Indeed, for the first time these abnormal T-cells were shown to be of oligoclonal origin as well to be severely impaired in TcR $\beta$  gene recombination. Furthermore, high resolution array-based comparative genome analysis (aCGH) of *Atm*-deficient T-cell lymphoma revealed distinct chromosomal imbalances (chromosome 12, 14 and 15). Of these imbalances the one concerning the *TcRa* genetic locus on chromosome 14, was basically found in all samples examined. Based on the analysis of *Atm*-deficient mice that did not yet develop thymic lymphoma by aCGH, 5 genomic pre-tumoral stages could be defined. Using microarray-based expression profiling analysis, major differences were identified in expression profiles of these *Atm*-deficient non-lymphoma cells. Further analysis of gene expression data led to the detection of transcriptional deregulated, tumor-associated genes, as for example *Tuba1* and *Aurka*. Moreover a vast majority of analysed T-cell lymphoma cell samples showed an additional genomic amplification of *Notch1* that subsequently was demonstrated to be followed by a transcriptional deregulation of *Notch1*-dependent genes, particularly *c-Myc*, *Dtx1* and *Hes1*. Finally, a functional network of deregulated genes could be constructed based on all generated expression data. The network points to a deregulation of CD95 dependent apoptosis signalling in the respective *Atm*-deficient, thymic lymphoma T-cell population.





# 1. Einleitung

## 1.1. Das hämatopoetische System

Das hämatopoetische (*haima*, griechisch: Blut; *poiesis*, griechisch: Herstellung) System umfasst das gesamte blutzellbildende System. Alle Bestandteile des hämatopoetischen Systems, wie Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen und Lymphozyten entwickeln sich letztendlich über verschiedene Vorläuferzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Diesen Entwicklungsprozess nennt man Hämatopoese. Im Wesentlichen läuft die Hämatopoese im Knochenmark ab. Die differenzierten und ausgereiften Zellen zirkulieren anschließend im Blut, im lymphatischen System oder im Gewebe, wobei die Lebensdauer der einzelnen Zelltypen sehr unterschiedlich ist. Während bestimmte Lymphozyten mehrere Jahre überdauern, werden Erythrozyten nach maximal 120 Tagen in Milz und Leber abgebaut. Neutrophile Granulozyten werden schon nach 6-8 h abgebaut. Insgesamt werden im hämatopoetischen System jede Minute über  $1 \times 10^8$  Zellen neu gebildet und abgebaut. Es handelt sich hierbei also um ein streng reguliertes Gleichgewicht unter Beteiligung von hochproliferativen Zellen.

### 1.1.1. DIE HÄMATOPOESE

Als Hämatopoese wird die Bildung, Reifung und Differenzierung der Blutzellen bezeichnet. Während die embryonale Hämatopoese der Säuger im Dottersack und in der Leber stattfindet, findet sie bei Adulten größtenteils im roten Knochenmark der platten Knochen statt. Eine Ausnahme bilden die T-Lymphozyten, die zwar auch im Knochenmark entstehen, aber nicht wie die B-Lymphozyten dort reifen, sondern in den Thymus emigrieren, wo sie den größten Teil ihrer Entwicklung durchlaufen. Man bezeichnet das Knochenmark und den Thymus deshalb auch als zentrale oder primäre lymphatische Organe. Die Bezeichnung B-Lymphozyten bezieht sich auf *bone marrow*, die Bezeichnung T-Lymphozyten entsprechend auf den Thymus. Neben den primären lymphatischen Organen werden das Lymphsystem und die Milz

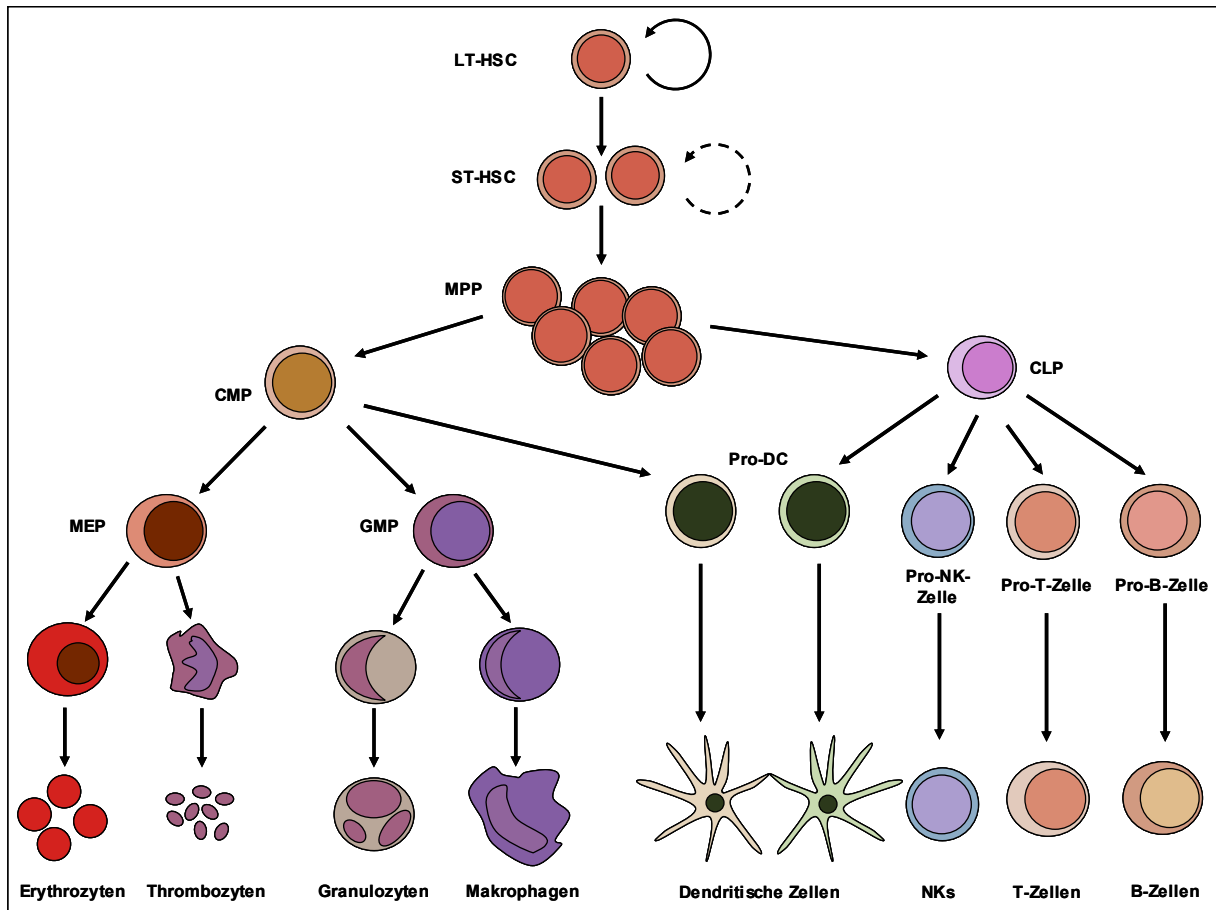
als sekundäre oder periphere lymphatische Organe bezeichnet. In ihnen werden die erworbenen Immunantworten eingeleitet.

Alle Zellen des hämatopoetischen Systems werden aus den gleichen Stammzellen gebildet. Die Entwicklung aus diesen als langzeitrepopulierende Stammzellen oder auch LT-HSC (*long term hematopoietic stem cells*) bezeichneten Zellen folgt einem streng hierarchischen Muster (**Abbildung 1**) (Passegue *et al.*, 2003). Während die relativ kleine Population von LT-HSCs für die gesamte Lebenszeit des Individuums ihre Fähigkeit behält, sich selbst zu erneuern, verliert die nächste Differenzierungsstufe, die der kurzzeitrepopulierenden Stammzellen (ST-HSC, *short term hematopoietic stem cells*), diese Fähigkeit innerhalb von 8 Wochen und entwickelt sich zu MPPs (*multipotent progenitors*). Diese multipotenten Vorläuferzellen besitzen noch das Potential, sich in jedwede Zelle des hämatopoetischen Systems zu differenzieren, können sich allerdings nur noch sehr kurz selbst als Population erhalten. Durch irreversible Reifungsschritte differenzieren sie zu Vorläuferzellen, die in ihrem Potential, alle Zelltypen des hämatopoetischen Systems neu zu bilden, erheblich eingeschränkt sind. Diese schon weitgehend determinierten Vorläuferzellen werden als *Oligolineage*-Vorläuferzellen bezeichnet (Weissman 2000). Bisher konnten zwei dieser eingeschränkten Vorläuferzellen, zumindest in der Maus, identifiziert werden. Es handelt sich hierbei zum einen um CLPs (*common lymphoid progenitors*), die klonal zu allen B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK) differenzieren. Zum anderen handelt es sich um CMPs (*common myeloid progenitors*), welche zu Zellen der gesamten myeloischen und erythroiden Linie differenzieren: GMPs (*granulo / myelomonocytic progenitors*), welche Monozyten, Makrophagen und Granulozyten bilden, und MEPs (*megakaryotic / erythroid progenitors*), welche Megakaryozyten und somit Thrombozyten und auch Erythrozyten bilden. Sowohl CMPs als auch CLPs können in dendritische Zellen differenzieren.

Auf die Entwicklung der B-Lymphozyten und T-Lymphozyten soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### **1.1.2. DIE B-LYMPHOZYTEN**

B-Lymphozyten sind der Hauptbestandteil der Immunglobulin vermittelten Immunantwort. Die Entwicklung der B-Lymphozyten beginnt im Knochenmark und

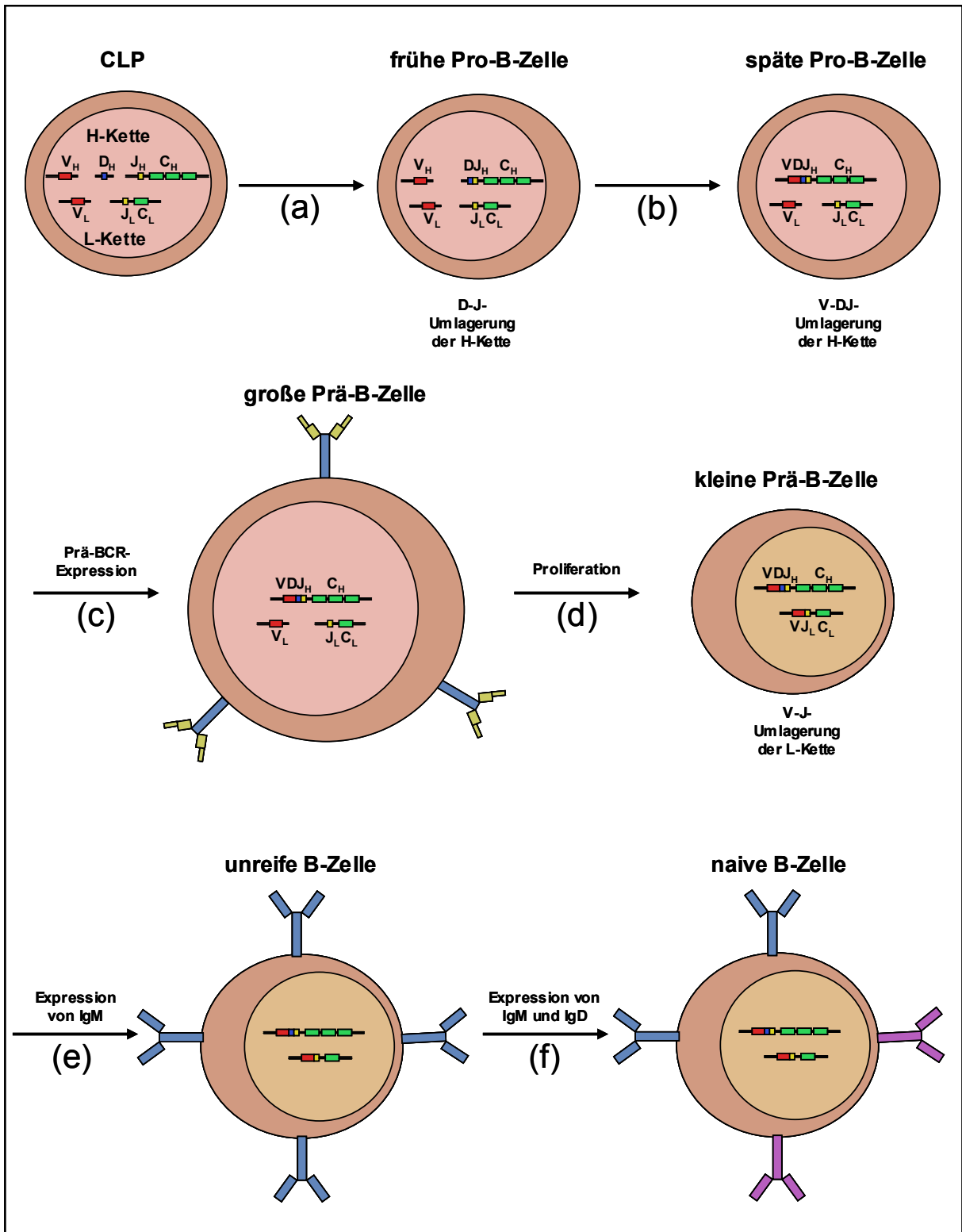


**Abbildung 1: Hierarchie der Hämatopoese.** Die Ursprungszellen der Hämatopoese sind LT-HSCs (*long term hematopoietic stem cells*), aus welchen sich über ST-HSCs (*short term hematopoietic stem cells*) zunächst MPPs (*multi-potent progenitors*) entwickeln. MPPs differenzieren weiter zu CMPs (*common myeloid progenitors*) und CLPs (*common lymphoid progenitors*). Aus CMPs entwickeln sich über die Vorläufer MEP (*megakaryotic / erythroid progenitor*) und GMP (*granulo / myelomonocytic progenitor*) die Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Makrophagen. Aus CLPs differenzieren über Pro-NK-Zelle (Pro-Natürliche Killer-Zelle), Pro-T-Zelle und Pro-B-Zelle schließlich Natürliche Killer-Zellen (NKs), T-Zellen (T-Lymphozyten) und B-Zellen (B-Lymphozyten). Sowohl CMPs als auch CLPs können über Pro-DCs (*pro-dendritic cells*) zu Dendritischen Zellen differenzieren. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen (verändert nach (Passegue *et al.*, 2003)).

durchläuft mehrere charakteristische Stadien, die vor allem durch die verschiedenen Umlagerungen der Immunglobulin-Gensegmente definiert werden (**Abbildung 2**) (Ehlich *et al.*, 1995; ten Boekel *et al.*, 1995). Reife naive B-Zellen verlassen dann das Knochenmark und wandern in die Peripherie, wo sie durch die Bindung von Fremdantigenen aktiviert werden.

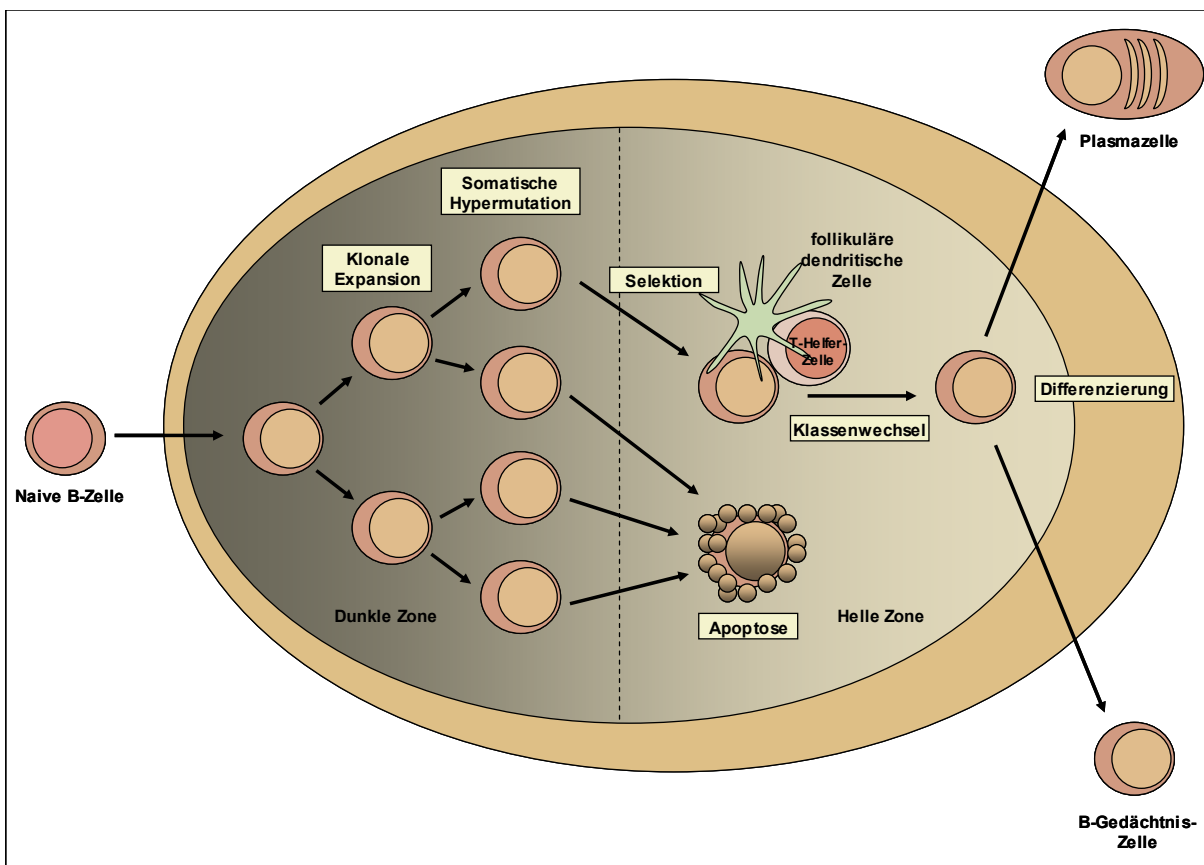
Sobald die Entwicklungslinie der sich aus den CLPs entwickelnden Zellen auf die B-Lymphozytenlinie determiniert wurde, entsteht die frühe Pro-B-Zelle (**Abbildung 2a**) (Allman *et al.*, 1999). Hier beginnt der Prozess der somatischen Rekombination der die schweren (H-) und leichten (L-) Ketten der Immunglobuline kodierenden

Immunglobulingensegmente, wobei zuerst die H-Ketten und danach die L-Ketten umgelagert werden. Hierbei wird ein D- (*diversity*) Gensegment mit einem J- (*joining*) Gensegment der H-Kette verbunden. Während der Entwicklung zur späten Pro-B-Zelle findet dann die Verknüpfung eines V- (*variable*) Gensegments mit den bereits rekombinierten DJ-Gensegmenten statt (**Abbildung 2b**) (Hardy *et al.*, 1991). Eine erfolgreiche VDJ-Umlagerung der schweren Kette führt zur Expression der  $\mu$ -Kette, die aus der umgelagerten VDJ-Region mit der konstanten Region  $C\mu$  (*constant*) zusammengesetzt wird und das Kennzeichen der nächsten Entwicklungsstufe, der großen Prä-B-Zelle, darstellt (**Abbildung 2c**). Zusammen mit einer sogenannten Ersatz-L-Kette ermöglicht die Expression der  $\mu$ -Kette die Präsentation des Prä-B-Zell-Rezeptors an der Oberfläche der Zellen (Loffert *et al.*, 1996). Bindet dieser an seinen Liganden, so teilen sich die großen Prä-B-Zellen fünf bis sechs Mal in kleine Prä-B-Zellen (**Abbildung 2d**). Die Umordnung der H-Ketten-Loci gilt nun als abgeschlossen. In diesem Stadium beginnt die Umlagerung der leichten (L-) Kette, die nur aus einem V- und einem J-Gensegment zusammengesetzt wird. Da der Prä-B-Zell-Rezeptor in diesem Stadium nicht mehr an der Oberfläche exprimiert wird, findet sich die  $\mu$ -Kette nur noch im Zytoplasma der Zellen. Nach abgeschlossener Umordnung der L-Kette kann ein komplettes Immunglobulin M-Molekül (IgM) exprimiert werden und definiert die Zelle als unreife B-Zelle (**Abbildung 2e**). Alle bisherigen Entwicklungsschritte laufen ohne Antigenkontakt im Knochenmark ab. Mit Hilfe Antigen präsentierender Zellen folgt eine Selektion der unreifen B-Zellen auf Selbsttoleranz. Bindet eine B-Zelle eigene Antigene des Organismus, so genannte Selbstantigene, so wird sie in diesem Stadium inaktiviert oder eliminiert. Selbsttolerante B-Zellen vollenden ihre Entwicklung, indem sie durch alternatives Spleißen neben IgM auch IgD exprimieren und aus dem Knochenmark auswandern (**Abbildung 2f**). Diese Zellen nennt man, bis sie Kontakt zu einem Fremdanigen erhalten, reife naive B-Zellen. Werden diese, mit einer Halbwertszeit von drei Tagen relativ kurzlebigen, naiven B-Zellen in der Peripherie in einen Lymphfollikel aufgenommen, verlängert sich ihre Halbwertszeit auf drei bis acht Wochen. Sobald die B-Zellen im lymphatischen Gewebe auf ein entsprechendes Antigen treffen, werden sie aktiviert und beginnen im Keimzentrum des Lymphfollikels mit einer massiven Proliferation, ein auch als klonale Expansion benannter Prozess (**Abbildung 3**). An diese schließt sich die somatische Hypermutation in den V-



**Abbildung 2: B-Zell-Entwicklung im Knochenmark.** Schematische Darstellung der Entwicklung von naiven reifen B-Zellen aus CLPs (*common lymphoid progenitors*). In den Zellen der jeweiligen Stadien ist die Rekombination der schweren (H- (*heavy*)) und leichten (L- (*light*)) Immunglobulingene aus den V- (*variable*), D- (*diversity*), J- (*joining*) und C- (*constant*) Gensegmenten dargestellt. Prä-BCR: Prä-B-Zell-Rezeptor, IgM: Immunglobulin M, IgD: Immunglobulin D. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Regionen der Gene funktioneller Antikörper an. Dabei werden Nukleotide in der DNA-Sequenz zufällig mutiert und die daraus resultierende Aminosäuresequenz der variablen, antigenbindenden Region der Antikörper verändert. Nach einer Selektion auf hochaffine Antikörper folgt ein Wechsel der konstanten Regionen (C) der Antikörper durch weitere somatische Rekombinationsvorgänge. Der hierdurch bedingte Wechsel der Antikörperklassen ist mit der Ausdifferenzierung in langlebige B-Gedächtniszellen, die zur ständigen Immunität beitragen, und in antikörperproduzierende Plasmazellen, welche die Lymphknoten wieder über die Markstränge in Richtung Knochenmark und Milz verlassen, verbunden.



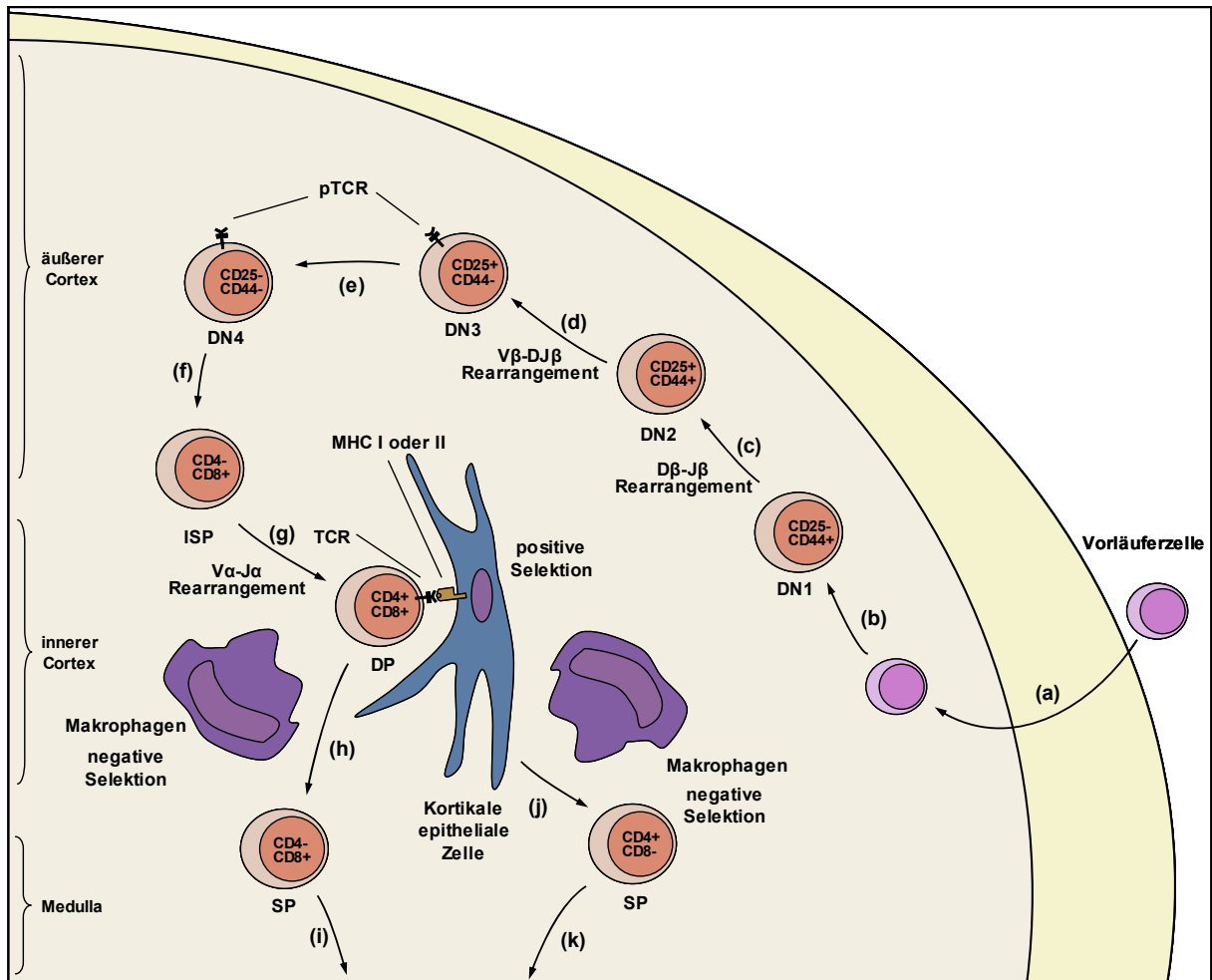
**Abbildung 3: B-Lymphozyten-Entwicklung im Keimzentrum eines Lymphfollikels.** Bindet die naive B-Zelle im Lymphgewebe ein passendes Antigen, so wird sie aktiviert und wandert in das Keimzentrum eines Lymphfollikels. Dort beginnt in der sogenannten dunklen Zone eine intensive Proliferation (klonale Expansion), während welcher somatische Hypermutationen an den V-Regionen der funktionellen Antikörper erfolgen. Es entstehen Zellen mit Antikörpern gleicher Spezifität, aber unterschiedlicher Affinität. Bei Verlust der Antikörperaffinität sterben die jeweiligen Zellen durch Apoptose in der hellen Zone. Hochaffine Antikörper exprimierende Zellen werden an Antigen präsentierenden follikulären dendritischen Zellen selektiert und begehen unter der Beteiligung von T-Helfer-Zellen einen Klassenwechsel der Immunglobuline. Schließlich verlassen sie das Keimzentrum als Antikörper produzierende Plasmazelle oder als Gedächtniszelle.

### 1.1.3. DIE T-LYMPHOZYTEN

Die Entwicklung der T-Lymphozyten besitzt viele Parallelen zur B-Zellentwicklung, wie z. B. den Ursprung im Knochenmark und somatische Rekombinationsvorgänge. Die Differenzierung der T-Lymphozyten erfolgt, im Gegensatz zu den B-Lymphozyten, nicht im Knochenmark, sondern im Thymus (Carlyle *et al.*, 1998). Die hier durchlaufenen Differenzierungsstadien sind zwar, wie bei den B-Lymphozyten, durch aufeinander abfolgende genomische Umstrukturierungen charakterisiert, darüber hinaus aber auch durch spezifische Änderungen der Expression von Zelloberflächenmolekülen gekennzeichnet (**Abbildung 4**). Nach der Einwanderung der Vorläuferzellen in den Thymus werden diese durch Kontakt mit dem Thymusstroma zur weiteren Differenzierung stimuliert (**Abbildung 4a**). Die unterschiedlichen Entwicklungsschritte finden in distinkten Regionen des Thymus statt. Da während der ersten Stadien weder die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 noch der T-Zell-Rezeptor-Komplex exprimiert sind, werden diese Zellen als doppelt negative (DN) T-Zellen bezeichnet. Allerdings lässt sich dieser T-Zell-Entwicklungsabschnitt mit Blick auf die Expression des Adhäsionsmoleküls CD44 und der  $\alpha$ -Kette des Interleukin 2-Rezeptors (CD25) weiter unterteilen (Godfrey *et al.*, 1993). Während Pro-T-Zellen im Stadium DN1 (doppelt negativ 1) im äußeren Cortex des Thymus nur CD44 exprimieren (**Abbildung 4b**), kommt im Stadium DN2 die Expression von CD25 hinzu. DN1-Zellen können sich, in Abhängigkeit des umgelagerten T-Zell-Rezeptor-Lokus, sowohl zu  $\gamma\delta$ - als auch zu  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor exprimierenden Zellen entwickeln (Robey *et al.*, 1994). Die Mehrheit der T-Lymphozyten entwickelt sich zu  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor exprimierenden Zellen. Zellen dieser Linie rearrangieren die D- (*diversity*) und J- (*joining*) Gensegmente des T-Zell-Rezeptors  $\beta$  (**Abbildung 4c**) (Dudley *et al.*, 1994). Mit der Rekombination des V- (*variability*) Segments an das DJ-rearrangierte Segment im Stadium DN3 verschwindet das CD44-Molekül von der Oberfläche (**Abbildung 4d**). Bestehend aus einer als Prä-TCR $\alpha$ -Kette bezeichneten Kette des sogenannten Ersatz-T-Zell-Rezeptors  $\alpha$  und CD3-Molekülen wird der T-Zell-Rezeptor  $\beta$  als Prä-T-Zell-Rezeptor an der Zelloberfläche präsentiert, wobei die CD25-Expression zurückgeht (DN4) (**Abbildung 4e**). Über eine Zwischenstufe, die ISPs (*immature single positive cells*),

welche zunächst CD8, aber nicht CD4 exprimieren (**Abbildung 4f**), entstehen nach einer Proliferation sogenannte doppelt positive (DP) Zellen, die sowohl CD4 als auch CD8 exprimieren (**Abbildung 4g**). In diesem Stadium werden die V-Segmente mit den J-Segmenten der  $\alpha$ -Kette rekombiniert und der fertige, aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bestehende T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert. Diese doppelt positiven T-Lymphozyten, welche etwa 90 % des lymphoiden Kompartiments des Thymus ausmachen, befinden sich nun im inneren Kortex des Thymus und stehen im engen Kontakt mit den dort befindlichen kortikalen Epithelzellen, auf deren Oberfläche MHC- (*major histocompatibility complex*) Moleküle exprimiert sind. T-Lymphozyten, deren T-Zell-Rezeptor-Komplexe die Selbst-MHC-Komplexe erkennen und binden können, werden positiv selektiert (Hogquist *et al.*, 1994). Die Mehrheit der T-Lymphozyten werden aufgrund fehlender MHC-Erkennung nicht positiv selektiert und sterben durch Apoptose. Bei einem weiteren, als negative Selektion bezeichneten Prozess, werden T-Lymphozyten, deren Rezeptoren körpereigene, auf Makrophagen präsentierte Antigene erkennen und binden können, durch induzierte Apoptose zerstört (Surh *et al.*, 1994; Alberola-Ila *et al.*, 1996). Mögliche Autoimmunreaktionen der T-Lymphozyten werden auf diese Weise unterbunden. Nur etwa 5 % der T-Lymphozyten überleben diese beiden Selektionsschritte und wandern in die Medulla des Thymus. Schon während der positiven Selektion wird die weitere Entwicklung der T-Zellen festgelegt. So entwickeln sich die T-Zellen, welche die MHC-Moleküle der Klasse I binden können, in CD8 einfach positive Zellen (SP CD8, *single positive*) weiter (**Abbildung 4h**). CD8 SP-Zellen reifen weiter zu sogenannten zytotoxischen T-Zellen und verlassen den Thymus (**Abbildung 4i**). T-Zellen, die MHC-Moleküle der Klasse II binden, entwickeln sich zu CD4 -Zellen (**Abbildung 4j**) und weiter zu sogenannten T-Helfer-Zellen, bevor sie ebenfalls den Thymus verlassen und ihre Funktion in der Peripherie (**Abbildung 4k**), wie beispielsweise in den Lymphknoten erfüllen. Die Entscheidung, ob sich eine T-Zelle zu SP CD4 oder SP CD8 entwickelt, ist also von der Bindung an die jeweiligen MHC-Komplexe abhängig. Der Mechanismus, der zu dieser Entscheidung führt, wird aktuell diskutiert (Germain 2002). Es gibt sowohl Anhaltspunkte dafür, dass es sich hierbei um eine Instruktion durch das jeweils gebundene MHC-Molekül handelt (Robey *et al.*, 1990; Borgulya *et al.*, 1991; Robey *et al.*, 1991), als auch für eine stochastische Entscheidung, die vor dem Binden der jeweiligen MHC-Moleküle stattfindet (Chan *et al.*, 1993; van Meerwijk *et al.*, 1993).





**Abbildung 4: Intrathymische T-Lymphopoese.** Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung von Eintritt der Vorläuferzelle in den Thymus (a) bis zum Austritt aus der Medulla als CD8+ (i) oder CD4+ (k) SP-Zellen. Die Stadien DN1 (Doppelt Negativ 1) bis DN4 (Doppelt Negativ 4) über ISP (*Immature Single Positive*), DP (Doppelt Positiv) bis SP (*single positive*) sind gekennzeichnet. In den Zellen sind die charakteristischen, repräsentierten Antigene des jeweiligen Entwicklungsstadiums aufgeführt. MHC: *major histocompatibility complex*; pTCR: prä-T-Zell-Rezeptor; TCR: T-Zell-Rezeptor. Auf die Thymusregionen wird hingewiesen. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

## 1.2. Lymphatische Neoplasien

Lymphatische Neoplasien bezeichnen alle neoplastischen Erkrankungen der Lymphozyten. Die darunter fallenden Leukämien und Lymphome sollen hier kurz vorgestellt werden. Auf B- und T-Zell-Lymphome soll in den Kapiteln 1.2.1 bis 1.2.3 detailliert eingegangen werden.

Lymphatische Neoplasien grenzen sich von den myeloischen Neoplasien durch den Ursprung der aberranten Zellpopulation ab, der im ersten Fall in der lymphatischen

Linie, im letzteren Fall in der myeloischen Linie liegt. Für beide Gruppen wurden chronische und akute Verlaufsformen beschrieben. Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation, WHO*) teilt lymphatische Neoplasien grundsätzlich in Neoplasien der B- und T-Zelllinie, sowie Hodgkin-Lymphome ein (**Tabelle 1**) (Harris *et al.*, 2000). Obwohl sich in jüngster Zeit herausgestellt hat, dass Hodgkin-Lymphome fast ausschließlich B-zellulären Ursprungs sind, bleibt ihnen aufgrund des gesamten Erscheinungsbildes eine Sonderstellung erhalten. Charakteristisch für diese vor mehr als 150 Jahren erstbeschriebene Neoplasie sind die einkernigen Hodgkin- und die mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen, die nur einen sehr geringen Anteil im Lymphomgewebe ausmachen. Durch das Infiltrat von anderen Lymphozyten und myeloischen Zellen weist das Hodgkin-Lymphom sowohl die Merkmale einer Neoplasie als auch einer Infektionskrankheit auf.

Die B- und T-Zell-Neoplasien werden jeweils in unreife lymphoblastische und reife lymphozytäre Neoplasien unterteilt. Vor allem bei den lymphozytären Formen werden mehrere, zum Teil sehr unterschiedliche, Neoplasien unterschieden. Als Definitionskriterien wurden neben Morphologie, Immunphänotyp und genetischen Veränderungen auch klinische Merkmale herangezogen. Ziel war es, Entitäten zu definieren, die pathologisch unterscheidbar sind und darüber hinaus klinische Relevanz besitzen.

Die Leukämie der Vorläufer-B-Lymphoblasten gilt als die einzige Neoplasie von Vorläufer-B-Zellen und äußert sich zumeist, wie auch die Leukämie der Vorläufer-T-Lymphoblasten, als akute lymphatische Leukämie (ALL). Aus diesem Grund entschloss sich die WHO, diese Vorläufer-Neoplasien, sofern sie sich als Leukämien manifestieren, weiterhin unter dem Begriff ALL zu führen. Auch in der vorliegenden Arbeit wird diese begriffliche Definition übernommen. So ist die ALL durch eine monoklonale Proliferation von lymphatischen Vorläuferzellen der B- und T-Zellreihe charakterisiert, deren Ausdifferenzierung in einem bestimmten Reifungsstadium blockiert ist. Man unterscheidet nicht nur zwischen B- und T-ALL, sondern auch zwischen den einzelnen Immunphänotypen, welche die Differenzierungsstadien der Ursprungszellen widerspiegeln. Folglich werden sie in Pro-B-, Prä-B- und reife B-ALLs sowie Pro-T-, Prä-T-, thymische- und reife T-ALL eingeteilt (Bene *et al.*, 1995). ALLs bei Erwachsenen gehören zu etwa 76 % der B-Zelllinie an. Leukämische Blasten verdrängen Zellen der normalen Hämatopoese aus dem Knochenmark und infiltrieren neben den lymphatischen Organen auch nahezu alle anderen

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation lymphatischer Neoplasien.**

---

## **B-Zell-Neoplasien**

---

### **Neoplasien der Vorläufer-B-Zellen**

- Vorläufer B-Lymphoblastische Leukämie / Lymphom

### **Reife lymphozytäre B-Zell-Neoplasien**

- Chronische Lymphatische Leukämie
- B-Prolymphozytenleukämie
- Lymphoplasmozytisches Lymphom
- Splenisches Marginalzonenlymphom
- Haarzelleukämie
- Plasmazellmyelom / Plasmazytom
- Extranodales Marginalzonenlymphom des MALT
- Nodales Marginalzonenlymphom
- Follikuläres Lymphom
- Mantelzell-Lymphom
- Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
- Medistinales großzelliges B-Zell-Lymphom
- Primäres Ergusslymphom
- Burkitt-Lymphom / Leukämie

---

## **Neoplasien der T- und NK-Zellen**

---

### **Neoplasien der Vorläufer-T-Zellen**

- Vorläufer T-Lymphoblastische Leukämie / Lymphom
- Blastisches NK-Zell-Lymphom

### **Reife lymphozytäre T-Zell-Neoplasien**

- T- Prolymphozytenleukämie
- Leukämie der großen granulären Lymphozyten
- Aggressive NK-Zell-Leukämie
- Adultes T-Zell-Lymphom
- Extranodales NK-/ T-Zell-Lymphom
- T-Zell Lymphom vom Enteropathietyp
- Hepatosplenisches  $\gamma\delta$  T-Zell-Lymphom
- Subkutanes panniculitisähnliches T-Zell-Lymphom
- Mycosis fungoides / Sezary-Syndrom
- Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom
- Peripheres T-Zell-Lymphom
- Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
- Anaplastisches großzelliges Lymphom, systemischer Typ

---

## **Hodgkin-Lymphom**

---

Lymphozytenprädominiertes Hodgkin-Lymphom

Klassisches Hodgkin-Lymphom

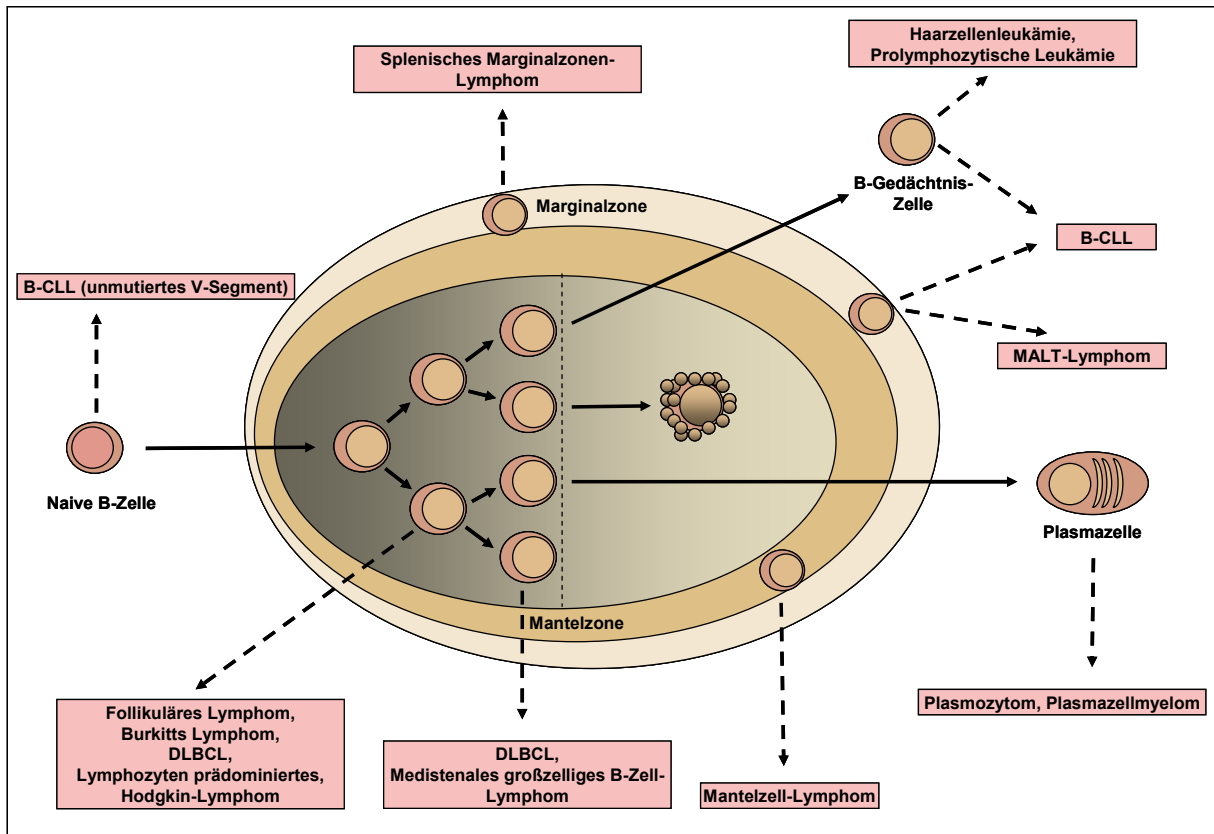
- Nodulär sclerotisierendes Hodgkin-Lymphom
  - Gemischtzelluläres Hodgkin-Lymphom
  - Lymphozytenarmes Hodgkin-Lymphom
  - Lymphozytenreiches diffuses Hodgkin-Lymphom
-

anatomischen Strukturen. Unterschiedlichste chromosomale Aberrationen sind sowohl bei B- als auch T-ALLs nachgewiesen worden. Häufig ist einer der beiden T-Zellrezeptor-Loci in T-ALLs oder einer der Immunglobulin-Loci bei B-ALLs als Translokationsereignisse in Folge illegitimer Rekombination involviert. Mit 20-30 % ist das sogenannte Philadelphia-Chromosom, welches in Folge einer reziproken Translokation der Chromosomen 9 und 22 ( $t(9;22)(q34;q11)$ ) entsteht, die mit Abstand häufigste chromosomale Aberration. Die Expression des resultierenden BCR-ABL-Fusionstranskriptes geht mit der Klassifikation betroffener Patienten als Höchsttrisikogruppe mit extrem schlechter Prognose einher (Barrett *et al.*, 1992), wobei erste Studien zur Therapie mit dem Phenylaminopyrimidin-Derivat Imatinib (STI571, Glivec, Gleevec) auf eine deutliche Verbesserung dieser Situation hoffen lassen. Die akute lymphatische Leukämie zeigt einen Häufigkeitsgipfel bei Kindern von unter 5 Jahren. Erst im Erwachsenenalter mit über 35 Jahren steigt das Risiko wieder zu einem zweiten Häufigkeitsgipfel bei über 80 Jahren.

### **1.2.1. B-LYMPHOZYTÄRE NEOPLASIEN**

Charakteristisch für B-lymphozytäre Neoplasien, die sich häufig als Lymphome ausprägen, ist, dass sie fast alle einem aus der normalen B-Zell-Entwicklung bekannten Stadium zugeordnet werden können. Darüber hinaus wurden definierte chromosomale Aberrationen für einzelne Lymphomtypen beschrieben, die mitunter sogar diagnostische Relevanz erlangten. Ein Großteil der B-Zell-Lymphome entsteht aus Zellen des Keimzentrums. Die prominentesten sollen hier kurz vorgestellt werden (**Abbildung 5**).

Die in Europa und Nordamerika mit 25-30 % der Leukämien des Erwachsenenalters häufigste leukämische Erkrankung ist die chronische lymphatische Leukämie (CLL) (Dighiero *et al.*, 1991). Mit Ausnahme der Sonderformen der Leukämie der großen granulierten Lymphozyten (*T-large granular lymphocyte leukemia*, T-LGL) sowie der Prolymphozytenleukämie (PLL) ist die CLL B-zellulären Ursprungs. Bei Untersuchungen der *Ig-V<sub>H</sub>*-Gensequenzen stellte sich heraus, dass bei diesen CLLs eine monoklonale Expansion von naiven B-Zellen (30-50 %) bzw. von B-Gedächtniszellen vorliegt (50-70 %) (Damle *et al.*, 1999; Hamblin *et al.*, 1999). Die Ursprungszellen akkumulieren in Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Leber



**Abbildung 5: Assoziation der B-Zell-Lymphome mit ihren natürlichen Ursprungszellen.** Die Darstellung zeigt schematisch die B-Zellreifung im Lymphfollikel mit Marginal- und Mantelzone. Gestrichelte Pfeile verweisen auf die aus der jeweiligen B-Zelle potentiell hervorgehende Neoplasie hin. DLBCL: diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, B-CLL: chronische lymphatische B-Zell-Leukämie, MALT: Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe / *Tissue*

und führen neben Organvergrößerungen zu Knochenmarks- und Immuninsuffizienz. In über 80 % der Fälle können chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden (Döhner *et al.*, 2000), wobei neben der häufigsten Form, einer Deletion des genomischen Bereichs 13q (53 %), in 19 % der Fälle eine Deletion der Region 11q22-23 nachgewiesen werden konnte (Döhner *et al.*, 1999). Der klinische Verlauf ist äußerst heterogen mit Überlebenszeiten von 2 bis 20 Jahren bei einer medianen Überlebenszeit von 5 bis 6 Jahren (Keating *et al.*, 1993).

Im sogenannten follikulären Lymphom entstammt die betroffene B-Zelle dem Keimzentrum des Lymphfollikels und zeigt damit alle charakteristischen Merkmale einer B-Zelle dieses Reifungsstadiums, wie vor allem die Hypermutation der variablen Region schwerer und leichter Immunglobulinketten. Als weiteres molekularbiologisches Charakteristikum gilt die Überexpression des antiapoptotischen Proteins BCL2 in 85-90 % der Fälle, die aus der ebenso charakteristischen Translokation t(14;18)(q32;21) resultiert (Korsmeyer 1992). Klinisch stellt das follikuläre Lymphom des WHO-Grades 1 und 2, mit Ausnahme des

zu den hochmalignen aggressiven Lymphomen zählenden des WHO-Grades 3 die häufigste Entität der niedrigmalignen Lymphome dar. Das mediane Lebensalter der betroffenen Patienten beträgt bei Diagnose 55-60 Jahre. Bei Diagnose sind nur 25 % der Patienten chemotherapeutisch behandlungsbedürftig, da sie neben Lymphknotenschwellung zudem weitere Symptome aufweisen. Das klinische Hauptproblem liegt in der Transformation des folliculären Lymphoms in ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom in 20-30 % der Fälle.

Zu den ebenfalls niedrigmalignen Lymphomen gehören die extranodularen Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT (Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe / *Tissue*)-Typ, die unter allen Non-Hodgkin-Lymphomen etwa 5 % ausmachen. Das Charakteristikum dieser Lymphom-Gruppe ist die Lokalisation in extranodalem Gewebe, meist im Magen- und Darmtrakt. Histologisch zeichnet sich das MALT-Lymphom durch lymphoepitheliale Destruktion aus. Etwa 25 % der extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphome befinden sich im Magenbereich, wo sie in den meisten Fällen mit einer Infektion durch *Helicobacter pylori* einhergehen. Die aberranten B-Zellen stammen aus der Marginalzone des Lymphfollikels und haben ausweislich der somatischen Hypermutationen bereits auf Antigene reagiert. Die Antikörper der Zellen reagieren aber interessanterweise nie auf *H. pylori*, sondern meist auf Autoantigene. In diesen Erkrankungsfällen liegt, sofern kein Lymphknotenbefall oder die charakteristische Translokation t(11;18)(q21;q21) (Auer *et al.*, 1997) nachgewiesen wird, das 10-Jahres-Überleben der betroffenen Patienten nach antibiotischer Therapie gegen *H. pylori* bei 90 % (de Jong *et al.*, 2000). Tumoren mit der genannten Translokation sprechen hingegen nicht auf die Antibiose gegen *H. pylori* an (Liu *et al.*, 2002).

Ein weiteres niedrigmalignes, allerdings nicht kurativ therapierbares B-Zell-Lymphom ist das Plasmozytom oder Multiple Myelom, welches etwa 14 % aller neu diagnostizierten hämatologischen Neoplasien ausmacht. Bei der Ursprungszelle dieser monoklonalen Neoplasie handelt es sich um eine reife Plasmazelle nach Antigenstimulation, die das Keimzentrum des Lymphfollikels bereits verlassen hat und Antikörper des Typs IgG produziert. Als Folge kann häufig eine Gammopathie diagnostiziert werden. Auch die zahlreichen chromosomalen Translokationen, die vor allem die Region des Immunglobulinklassenwechsels 14q32 treffen, sprechen hier für eine IgG-Antikörper produzierende Ursprungszelle, die das Keimzentrum bereits verlassen hat.

Zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) gehören unter anderem die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (*diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL), welche das hochmaligne zentroblastische sowie das immunoblastische NHL umfassen und in Deutschland für fast ein Drittel der gesamten Lymphomerkrankungen verantwortlich sind. Als hochmalignes Lymphom zeichnet sich das DLBCL durch ein schnelles Wachstum aus, weshalb es häufig früh diagnostiziert werden kann. Bei 71 % der Patienten ist ein extranodaler Befall und bei 16 % ein Befall des Knochenmarks zu beobachten. Die monoklonale Neoplasie resultiert aus einer B-Zelle des Keimzentrums. Auch für diese Lymphomentität sind chromosomale Translokationen unter Beteiligung des *IgH*-Lokus charakteristisch. In fast 30 % der zentroblastischen Subgruppe ist die Translokation  $t(14;18)(q32;q21)$  nachweisbar (Schlegelberger *et al.*, 1999). Auch Translokationen unter Beteiligung des *BCL6*-Gens treten häufig auf (Offit *et al.*, 1989) und fungieren als prognostische Marker (Offit *et al.*, 1994). Das DLBCL wird, im Gegensatz zu den niedrigmalignen Lymphomen, intensiv mit kurativer Intention therapiert, wobei über 60 % der Patienten eine komplette Remission zeigen und etwa die Hälfte hiervon als dauerhaft geheilt betrachtet werden kann. Verlässliche Vorhersagen der Überlebenszeit nach erfolgter Chemotherapie können anhand des Expressionsprofils des jeweiligen Tumors getroffen werden (Rosenwald *et al.*, 2002).

Den besonders aggressiven Lymphomen wird zudem das Burkitt-Lymphom zugeordnet. Man unterscheidet hierbei grundlegend zwei Subtypen. Zum einen handelt es sich um das klassische Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierte Burkitt-Lymphom mit vorwiegender Verbreitung in Malaria-Endemiegebieten und meist extranodaler Lokalisation, z. B. im Gesicht (Burkitt 1983). Zum anderen zeigt sich ein sporadischer Typ, der nur selten EBV-assoziiert ist. Beiden gemeinsam ist die primäre Deregulation des Proto-Onkogens *c-MYC*, die meist über die balancierte Translokation  $t(8;14)(q24;q32)$  erfolgt (Zech *et al.*, 1976). Diese gilt als Prototyp der *IgH*-Translokationen, nicht zuletzt da hierfür erstmals der Mechanismus der Deregulation eines Proto-Onkogens durch Translokation in den Bereich der Immunglobulin-Gene in einem transgenen Mausmodell nachvollzogen und bewiesen werden konnte (Adams *et al.*, 1985). In den Bruchpunkten des *IgH*-Genlokus unterscheiden sich jedoch die beiden Subtypen erheblich. Während beim sporadischen Typ des Burkitt-Lymphoms der Bruchpunkt meist in der Region des Immunglobulinklassenwechsels liegt, ist dieser beim klassischen Typ in einem *J*-

oder D-Gensegment zu finden. Dies gibt einen Hinweis auf die unterschiedlichen Ursprungszellen. Während beim klassischen Typ anscheinend ein fehlerhaftes VDJ-Rearrangement der Pro-B-Zelle im Knochenmark vorliegt (Haluska *et al.*, 1986), sind beim sporadischen Typ Fehler beim Klassenwechsel der Immunglobuline im Keimzentrum der Lymphfollikel wahrscheinlich. Patienten beider Subtypen weisen nach einer risikoadaptierten Chemotherapie ein 6-Jahres-Überleben ohne Rezidiv von 89 % auf (Reiter *et al.*, 1999).

Ein in der Vergangenheit bezüglich seiner Malignität nicht eindeutig zu klassifizierendes Non-Hodgkin-Lymphom ist das Mantelzell-Lymphom. Die Besonderheiten dieses Lymphomtyps sollen aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Arbeit im folgenden Kapitel ausführlicher behandelt werden.

### **1.2.2. DAS MANTELZELL-LYMPHOM**

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) repräsentiert 5-10 % aller Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und nimmt unter ihnen eine gewisse Sonderstellung ein. Während es anfänglich aufgrund seiner zellulären Morphologie in der Kiel-Klassifikation zu den niedrigmalignen Neoplasien gezählt wurde (Brittinger *et al.*, 1986), konnte es mittlerweile anhand der zytogenetischen Charakterisierung als eigenständige Lymphomentität abgegrenzt werden und wird nun aufgrund seines klinisch aggressiven Verlaufs den hochmalignen Lymphomen zugeordnet (Zucca *et al.*, 1994). So kann bei 43 % der Patienten mehr als ein extranodaler Befall vor allem des Gastrointestinaltraktes und der Leber, bei 64 % ein ausgedehnter, mehr als 9 Lymphknotenstationen umfassender Befall und bei 80 % ein Befall der Milz festgestellt werden. Zwischen 60 und 70 % der Patienten zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose eine Infiltration des Knochenmarks. Obwohl eine Unterscheidung der verschiedenen Erscheinungsformen in der WHO-Klassifikation als klinisch irrelevant abgelehnt wurde (Harris *et al.*, 2000), können verschiedene Varianten mit unterschiedlichem Phänotyp und Verlauf definiert werden. Neben der typischen zentrozytoiden Variante kommt eine leukämische, im Verlauf besonders aggressive Variante, das blastoide sogenannte MCL, vor. Des Weiteren scheint es noch eine indolente Form zu geben, bei der kein Bedarf einer klinischen Behandlung besteht (Nodit *et al.*, 2003; Orchard *et al.*, 2003; Espinet *et al.*, 2005). Patienten mit dieser Variante zeigen ein Überleben von 5-12 Jahren, während das Überleben der



typischen Variante bei weniger als 2-3 Jahren liegt (Fisher *et al.*, 1995). Therapieansätze zur Behandlung des Mantelzell-Lymphoms reichen von der Chemotherapie, mit Remissionen von 33-81 % (Liliemark *et al.*, 1998; Foran *et al.*, 1999), über autologe und allogene Stammzelltransplantationen, mit einem ereignisfreien Zweijahresüberleben von 57 %, bis zur kombinierten Chemo- und Immuntherapie mit dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab, mit einer Ansprechrate von 96 % und 70 % Rezidiven nach 17 Monaten (Howard *et al.*, 2002). Insgesamt bietet sich mit den derzeitigen Behandlungsstrategien keinerlei kurative Option.

Durch molekulargenetische Charakterisierung zahlreicher Mantelzell-Lymphome konnte eine Vielzahl genetischer Aberationen identifiziert werden (siehe **Tabelle 2**), die letztlich zu Defekten sowohl im Zellzyklus als auch in der Reparatur von DNA-Brüchen führen (Fernandez *et al.*, 2005).

Die Ursprungszelle ist die ruhende naive B-Zelle in der Mantelzone des folliculären Keimzentrums. Die das Mantelzell-Lymphom definierende chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) (Raffeld *et al.*, 1991) findet allerdings schon bei der VDJ-Rekombination der Immunglobuline in der Pro-B-Zelle im Knochenmark statt (Welzel *et al.*, 2001). Als Folge dieser Translokation gelangt das Gen *CCND1* unter

**Tabelle 2: Häufige chromosomale Aberrationen beim Mantelzell-Lymphom**

Chromosomale Aberration	Kandidatengen	Referenz
<b>Translokationen</b>		
t(11;14)(q13;q32)	CCND1 und Ig schwere Kette	Raffeld <i>et al.</i> , 1991
t(2;12)(p12;p13)	CCND2 und Igk leichte Kette	Gesk <i>et al.</i> , 2006
<b>Amplifikationen</b>		
3q25-qter		Kohlhammer <i>et al.</i> , 2004
4p12-13		Kohlhammer <i>et al.</i> , 2004
7p21-22		Kohlhammer <i>et al.</i> , 2004
8q21-qter	MYC	Hernandez <i>et al.</i> , 1999
10p11-12	<i>BMI1</i>	Bea <i>et al.</i> , 2001
12q13-q15	<i>CDK4</i> und <i>MDM2</i>	Hernandez <i>et al.</i> , 2005
<b>Deletionen und/oder Mutationen</b>		
1p13-p31		Kohlhammer <i>et al.</i> , 2004
6q23-q27		Kohlhammer <i>et al.</i> , 2004
8p21-pter	TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D	Kohlhammer <i>et al.</i> , 2004
9p21-p22	CDKN2A (p16INK4A und p14ARF)	Pinyol <i>et al.</i> , 1997; Dreyling <i>et al.</i> , 1997
9q21-qter		Kohlhammer <i>et al.</i> , 2004
10p14-p15		Kohlhammer <i>et al.</i> , 2004
11q22-23	ATM	Stilgenbauer <i>et al.</i> , 1999; Schaffner <i>et al.</i> , 2000
13q14-q34	RB1	Pinyol <i>et al.</i> , 2007
17q13-qter	TP53	Hernandez <i>et al.</i> , 1996; Greiner <i>et al.</i> , 1996
22q12	CHK2	Tort <i>et al.</i> , 2002

die Kontrolle des Promotors der schweren Immunglobulinkette. Das *CCND1*-Gen kodiert für Cyclin D1 (siehe **1.5**) und spielt in normalen B-Lymphozyten keine besondere funktionelle Rolle. Unter Kontrolle des genannten Promotors wird es jedoch konstitutiv überexprimiert und kann somit als Marker dieser Neoplasie betrachtet werden (Bosch *et al.*, 1994; de Boer *et al.*, 1995). Durch eine Microarray-Expressionsprofil-Studie konnten darüber hinaus wenige Cyclin D1- und t(11;14)(q13;q32)-negative MCLs identifiziert werden, welche sich weder morphologisch noch im globalen Expressionsmuster von den konventionellen MCLs unterscheiden (Rosenwald *et al.*, 2003). Diese Fälle zeigen jedoch eine hohe Cyclin D2- oder Cyclin D3- Expression, die mitunter durch die dann ebenfalls vorliegende Translokation t(2;12)(p12;p13) begründet werden konnte. Als Folge dieser Translokation wird der *Cyclin D2*-Genlocus mit dem Locus der leichten Immunglobulin- $\kappa$ -Kette fusioniert (Gesik *et al.*, 2006).

Die genannten seltenen Ausnahmen zeigen deutlich die hohe Relevanz der onkogenabhängigen G1-Phasen-Disregulation im Zellzyklus für die Pathogenese des MCL. Allerdings war es bisher nicht möglich, in transgenen Mausmodellen, in denen das *CCND1*-Gen, die pathologische Situation simulierend, unter die Kontrolle des Promotors der schweren Immunglobulinkette gestellt wurde, spontane Lymphome zu erzeugen. In diesen *in-vivo*-Studien bedurfte es zur Genese eines Lymphoms stets der Koexpression eines weiteren Onkogens, wie z. B. *c-MYC* (Bodrug *et al.*, 1994). Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Tumorgenese eine Deregulation des Zellzyklus beinhaltet, zusätzlich aber weiterer onkogener Ereignisse bedarf.

Umfangreiche Studien an klinischen Proben des Mantelzell-Lymphoms führten zur Identifikation weiterer genetischer Aberrationen (siehe **Tabelle 2**). So konnten vor allem bei der hochproliferativen MCL mehrere Veränderungen nachgewiesen werden, die am gleichen Zellzyklus-Regulationsmechanismus angreifen wie Cyclin D1. Vermutlich ergänzen und verstärken sich diese Veränderungen gegenseitig in der Dysregulation des Zellzyklus. Jedoch spielen sie mit rund 5 % bei der typischen Variante des MCL eine eher untergeordnete Rolle.

Die nach der *CCND1*-Translokation häufigste Mutation in MCL betrifft die chromosomale Region 11q22-23, in der sich das Gen für die Phosphatidylinositol 3-Kinase *ATM* befindet (Stilgenbauer *et al.*, 1999). So konnte in 40-75 % aller MCL eine Mutation in einem der beiden *ATM*-Allele gefunden werden, die typischerweise mit der Deletion des anderen Allels einhergeht (Schaffner *et al.*, 2000). Die Tatsache,

dass die hieraus resultierende Inaktivierung von *ATM* in allen MCL-Subtypen, unabhängig von Proliferationsrate, klinischem Verhalten und Prognose, gezeigt werden konnte, deutet darauf hin, dass es sich hierbei um ein sehr frühes oder für MCL prädisponierendes Ereignis handelt. *ATM* spielt eine wesentliche Rolle in der DNA Doppelstrangreparatur, welche unter anderem für die *VDJ*-Rekombination der Immunglobulinloci in B-Lymphozyten von essentieller Bedeutung ist.

Ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der charakteristischen, das *CCND1*-Gen betreffenden Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  und der Inaktivierung des *ATM*-Gens konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

### **1.2.3. T-LYMPHOZYTÄRE NEOPLASIEN**

Im Gegensatz zu den B-lymphozytären Neoplasien repräsentieren die T-lymphozytären Neoplasien meist periphere T-Zell-Lymphome, die kein definiertes T-Zell-Entwicklungsstadium darstellen. Vielmehr sind sie durch ihre Pathologie definiert. T-Zell-Lymphome kommen in Europa und Nordamerika mit etwa 10-15 % aller malignen Lymphome ungleich seltener vor als B-Zell-Lymphome (Armitage *et al.*, 1989) und sind klinisch überwiegend als aggressiv einzustufen. Die hochmalignen peripheren, reifen T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (T-Zell-NHL) werden in der Regel wie aggressive B-Zell-NHL behandelt, zeichnen sich aber durch eine schlechtere Prognose nach Therapie aus (Gisselbrecht *et al.*, 1998). Das Angioimmunoblastische Lymphom ist nach den peripheren, reifen T-Zell-NHL das zweithäufigste T-Zell-NHL und macht etwa 4 % aller maligner Lymphome aus. Anämie und serologische Entzündungszeichen sind für diese Neoplasie charakteristisch, die nach Therapie mit einem medianen Überleben von 15-24 Monaten eine überaus schlechte Prognose besitzt. Das mittlere Alter bei Diagnose liegt bei 64 Jahren. Im Gegensatz dazu liegt der Altersmedian von Patienten mit einem anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphom (*anaplastic large T-cell lymphoma*, ALCL) bei 34 Jahren und somit relativ niedrig. Das ALCL macht weltweit etwa 1-2 % aller NHL aus und umfasst einen systemischen sowie einen primär kutanen Typ. Molekularbiologisches Charakteristikum ist die Expression der *anaplastic large cell lymphoma kinase* als Teil eines Fusionstranskriptes, welches aus den Translokationen  $t(2;5)(p23;q35)$  in 70-80 % der Fälle oder aber  $t(1;2)(q21;p23)$  resultiert und immunhistologisch nachweisbar ist (Duyster *et al.*,

2001). Da die Beschreibung des ALCL erst vor relativ kurzer Zeit erfolgte, lassen ältere Studien keinen Schluss auf das Überleben bei Therapie zu, weshalb diese Fälle einstweilen weiterhin wie diffus großzellige T-Zell-Lymphome therapiert werden.

### **1.3. Murine Modellsysteme in der Onkologie**

Tiermodelle spielen in der onkologischen Forschung eine immer größer werdende Rolle. Es gibt prinzipiell zwei Argumente dafür, Neoplasien in Tieren zu modellieren. So wird versucht, den kausalen Zusammenhang von spezifischen genetischen Veränderungen, die in Tumoren identifiziert wurden, aufzuklären. Hierfür werden die spezifischen Veränderungen möglichst gewebs- und / oder entwicklungspezifisch in Tiere eingebracht. Obwohl auch Zellkultursysteme zu großen Fortschritten im Studium genetischer Veränderungen geführt haben, sind Tiermodelle für die Untersuchung der Interaktionen von Tumorzellen mit dem sie umgebenden Gewebe unverzichtbar für die onkologische Forschung. Darüber hinaus können Mechanismen der Metastasierung ausschließlich in tierischen Modellen umfassend analysiert werden.

Das zweite Argument, definierte Tumormodelle in Tieren zu entwickeln, liegt in deren Einsatz bei der Entwicklung neuer gezielter Therapiemöglichkeiten. Am humanisierten Tumortiermodell können so die Wirkungsmechanismen und Dosierungen, aber auch Nebenwirkungen neuer Wirkstoffe getestet werden.

Die Hausmaus *Mus musculus musculus* hat sich in beiden Forschungsbereichen als Tiermodell durchgesetzt. Dies liegt einerseits an ihrer als Säugetier systematischen Nähe zum Menschen, aufgrund welcher sämtliche Organe und nahezu alle Zelltypen aus dem Menschen auch in der Maus gefunden werden können. Andererseits ist es aufgrund der Tiergröße möglich, eine große Anzahl Mäuse auf relativ kleinem Raum zu halten. Die Generationsdauer von drei Monaten mit einer Tragzeit von 20 Tagen ist für Laborexperimente gut praktikabel. Eine Wurfgröße von 5 bis 12 Jungen macht die Maus darüber hinaus zu einem produktiven Organismus. All dies hat dazu geführt, dass mittlerweile sehr viele Techniken für Mäuse als Tiermodelle verfügbar sind und weiter entwickelt werden. Nicht zuletzt ist das Genom der Maus nach dem des Menschen als zweites Säuger genom sequenziert worden (Waterston *et al.*,

2002) und zeigt eine große Homologie zum humanen Pendant. Ungefähr 99 % der Mausgene haben ein humanes Homolog, welches in 96 % der Fälle im selben genomischen Kontext eingebunden ist.

Die relativ einfache genetische Manipulation von Mäusen ist ein weiterer Grund für das Vorherrschen muriner Modellsysteme. So ist es u. a. möglich, ein gewünschtes Transgen unter der Kontrolle eines physiologischen, eines gewebsspezifischen, eines induzierbaren oder eines retroviralen Promotors in den Pronukleus einer fertilisierten murinen Oozyte zu injizieren. Das Transgen integriert dann zufällig an einer beliebigen Stelle des Genoms (Jaenisch 1988). Diese fertilisierte transgene Oozyte wird in eine Ammenmaus transplantiert. Die geborenen Jungtiere exprimieren das Transgen, je nachdem, welcher Promotortyp verwendet wurde, gewebespezifisch oder ubiquitär. Um die Funktionen eines interessierenden Gens *in vivo* untersuchen zu können, ist es häufig sinnvoll, dieses Gen im Tier auszuschalten. Im Gegensatz zu transgenen Mäusen wird diese Art von Modellsystem als *knock out mouse* bezeichnet (Thomas *et al.*, 1987; Koller *et al.*, 1989; Ratcliff *et al.*, 1992). Zur gezielten Ausschaltung eines Gens wird zunächst ein dem Gen weitgehend homologes DNA-Konstrukt hergestellt, in das neben einer Antibiotikaresistenz zwei Erkennungssequenzen für Rekombinasen eingefügt sind. Dieses Konstrukt wird in murine embryonale Stammzellen transfiziert. Das Konstrukt rekombiniert in diesen Zellen mit der genomischen Zielsequenz und ersetzt diese im Genom. Nach einem Selektionsschritt können diese manipulierten embryonalen Stammzellen in murine Blastozysten injiziert werden. Nach Implantation in eine Ammenmaus werden chimäre Tiere geboren. Durch systematische Zucht wählt man die Nachkommen jener Individuen aus, bei denen durch das Konstrukt veränderte Zellen in die Keimbahn integriert wurden und diese neue Eigenschaft nun nach klassischen Mendelschen Regeln weitergeben. Kreuzt man diese Mauslinie nun mit einer für eine Rekombinase transgenen Mauslinie, so wird die durch die Erkennungssequenzen flankierte genomische Region entfernt. Durch die Wahl geeigneter Rekombinase-transgener Mäuse kann man den *Gen-knock-out* auf bestimmte Zelltypen oder Organe beschränken, ihn aber auch induzieren. Dies ist besonders empfehlenswert, wenn das Gen zur Entwicklung des Organismus unabdingbar ist und eine Zerstörung des Gens den Tod des noch in der Entwicklung befindlichen Tieres zur Folge hätte. Hier kann man den *knock out* induzieren, sobald das Tier voll entwickelt ist. Man spricht in diesem Fall von einem konditionellen *knock*

*out*. In früheren Ansätzen hat man das interessierende Gen direkt, ohne den Zwischenschritt der Rekombinase-transgenen Maus, durch Rekombination zerstört. Dies hatte den Nachteil, dass der *knock out* unspezifisch in jeder Zelle des Körpers aktiv war und die Wirkung embryonal letaler Genveränderungen nur in frühen Entwicklungsstadien untersucht werden konnte.

In der Erforschung des hämatopoetischen Systems bietet sich darüber hinaus noch die Möglichkeit, genetische Veränderungen über Transplantation in das System einzubringen (Cepko *et al.*, 1984). Das Knochenmark einer Spendermaus wird hierfür entnommen, stimuliert und mit einem rekombinanten Retrovirus, welches die zu untersuchende genetische Veränderung enthält, infiziert. Anschließend wird eine Empfängermaus letal bestrahlt und mit dem retroviral infizierten Knochenmark rekonstituiert. Diese Methode hat den Vorteil, die zeitintensiven Kreuzungen zu umgehen. Außerdem kann man eine präzise Anzahl genetisch veränderter Zellen in das System einbringen und sie so auf die Fähigkeit hin testen, inwieweit das gesamte hämatopoetische System rekonstituieren können. Es besteht aber auch die Möglichkeit, die Mindestanzahl zu transplantierender Zellen zu ermitteln, die, im Falle eines eingebrachten Onkogens, suffizient ist, eine hämatologische Neoplasie hervorzurufen (Kroon *et al.*, 1998). Dieses Transplantationsmodell hat allerdings den Nachteil, auf das hämatopoetische System beschränkt zu sein.

Eine andere Art von Transplantationsmodell, die ohne genetische Manipulation der Tiere auskommt, dient der Erzeugung von Tiermodellen, die in der Entwicklung neuer innovativer Therapieansätze verwendet werden. Hier werden humane Tumore unter die Haut immundefizienter Mäuse transplantiert (Stutman 1974). Wachsen diese Tumore an, werden sie schließlich komplett vom Organismus der Maus versorgt. Diese Art von Maus-Modellen bietet jedoch nur in speziellen Ansätzen die Möglichkeit, Geninteraktionen oder Funktionen zu erforschen. Vielmehr wird ein Tumor in einen anderen Organismus gebracht, wo er im Hinblick auf das Ansprechverhalten auf therapeutische Behandlung ohne Risiko für die Patienten untersucht werden kann. Modellsysteme wie diese, werden auch als *Xenograft* bezeichnet.

Darüber hinaus können die verschiedenen Techniken, wie auch in der vorliegenden Arbeit praktiziert, untereinander sowohl züchterisch also auch über Transplantation kombiniert werden. Durch Nutzung der oben beschriebenen Techniken zur

genetischen und nicht-genetischen Manipulation von Mäusen konnten bereits für eine Vielzahl der bekannten humanen Neoplasien Mausmodelle entwickelt werden. So existieren u. a. bereits Modelle für Lungen-, Brust-, Prostata-, Haut-, und Ovarkrebs, zudem für Tumoren des Nervensystems und des hämatopoetischen Systems. Aufgrund der Komplexität neoplastischer Erkrankungen wird die Entwicklung muriner Modellsystem aber auch in Zukunft von unverzichtbarer Notwendigkeit und von herausragender Bedeutung sein.

#### **1.4. Das Tumorsuppressorgen *Atm***

Mutationen im Tumorsuppressorgen *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*) zeichnen für eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Krankheit – Ataxia telangiectasia – mit komplexem klinischen Phänotyp verantwortlich. Das Krankheitsbild ist durch eine zerebrale Degeneration, die zu einer schweren fortschreitenden neuromotorischen Dysfunktion führt, durch genomische Instabilität, thymische und gonadale Atrophie, durch Immundefizienz, Prädisposition für lymphatische Neoplasien sowie eine extreme Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und DNA-Doppelstrangbruch induzierenden Agenzien charakterisiert (Crawford 1998; Becker-Catania *et al.*, 2001). Das auf 11q22-q23 lokalisierte, für eine 3056 Aminosäurereste umfassende, 360 kDa schwere, Proteinkinase kodierende Gen wurde 1995 erstmals kloniert (Savitsky *et al.*, 1995) und gehört der Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen an. Der Gensequenzvergleich zwischen Hefe und Mensch belegt, dass dieses Gen evolutiv hoch konserviert ist. Es ist in DNA-Reparatur und Rekombination sowie die Regulation der Zellzykluskontrolle involviert. Sowohl die klinischen und zellulären Phänotypen als auch Beobachtungen, wonach ultraviolettes Licht und basenschädigende Agenzien kaum Veränderungen in Patientenzellen hervorrufen, weisen darauf hin, dass ATM keine allgemeine Rolle in der zellulären DNA-Reparatur spielt. Vielmehr ist ATM spezifisch an der zellulären Antwort auf z. B. durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Doppelstrangbrüche (DSBs) beteiligt (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Während ATM in ungeschädigten Zellen als inaktives Dimer vorliegt, phosphorylieren sich beide Moleküle nach induzierten DSBs gegenseitig an Serinrest 1981, setzen sich so als aktive Monomere frei (Bakkenist *et al.*, 2003) und zeigen nach Autophosphorylierung innerhalb von Minuten eine massiv erhöhte Kinaseaktivität (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Zunächst wurde

angenommen, dass die Aktivierung von ATM als Folge von DSB-induzierten Chromatinveränderungen erfolgt (Bakkenist *et al.*, 2003). Neuere Beobachtungen zeigen hingegen, dass ATM auch selbst eine Rolle bei der Veränderung der Chromatinstruktur nach DNA-DSBs spielt. So konnte beobachtet werden, dass ATM durch NBS1 (Nibrin, *Nijmegen Breakage Syndrom 1*) an DSBs rekrutiert wird (Falck *et al.*, 2005) und diese sogar direkt bindet (Andegeko *et al.*, 2001). Hier wird NBS1 als Komponente des multifunktionalen DSB-Reparaturkomplexes MRE11-RAD50-NBS1 von ATM phosphoryliert (Gatei *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Anschließend entfernen ATM und NBS1 die Histone an Stellen mit DSBs und rekrutieren das Reparaturcoenzym XRCC4 (Berkovich *et al.*, 2007).

Neben der direkten Beteiligung an der Reparatur von DNA-DSBs greift ATM auch in das Zellzyklusgeschehen ein. Der Zellzyklus kann im Fall von DNA-Schädigungen zu verschiedenen Zeitpunkten unterbrochen werden. p53, ein Schlüsselfaktor des Kontrollpunktes am Übergang von der G1- zur S-Phase, wird über verschiedene Mechanismen durch ATM aktiviert und stabilisiert. Einerseits erfolgt dies durch direkte Phosphorylierung von p53 (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998), andererseits über die Aktivierung von CHK2 (*cell cycle checkpoint kinase 2*) (Bartek *et al.*, 2001; McGowan 2002), welches mit dem durch MDM2 (*mouse double minute 2*) bewirkten Abbau von p53 interferiert. Darüber hinaus wird MDM2 direkt durch ATM phosphoryliert, wodurch der MDM2-abhängige Export von p53 aus dem Nukleus verhindert wird (Khosravi *et al.*, 1999; Maya *et al.*, 2001). Durch diesen Mechanismus kann einerseits der Zellzyklus arretiert werden, andererseits kann er zur Einleitung der Apoptose führen. Auf ähnliche Weise funktioniert ATM auch bei der Inhibition des Zellzyklusübergangs von Phase S zu G2. Zu diesem Zeitpunkt wird der Schlüsselfaktor BRCA1 (*breast cancer 1*) von ATM direkt phosphoryliert (Cortez *et al.*, 1999) und über ATM-stimuliertes CHK2 zusätzlich aktiviert (Lee *et al.*, 2000), während ATM den Faktor CtIP (*CTBP interacting protein*), den direkten Inhibitor von BRCA1, durch Phosphorylierung hemmt (Li *et al.*, 2000).

Darüber hinaus kontrolliert ATM aber auch weitere Regelwege, die auf einen einzigen Kontrollpunkt konvergieren, wie man am Intra-S-Phasen-Kontrollpunkt des Zellzyklus beobachten kann. Hier werden durch Phosphorylierung die Faktoren NBS1 (Lim *et al.*, 2000), SMC1 (*structural maintenance of chromosomes 1*) (Kim *et al.*, 2002) und FANCD2 (*fanconi anemia complementation group D2*) (Taniguchi *et al.*,



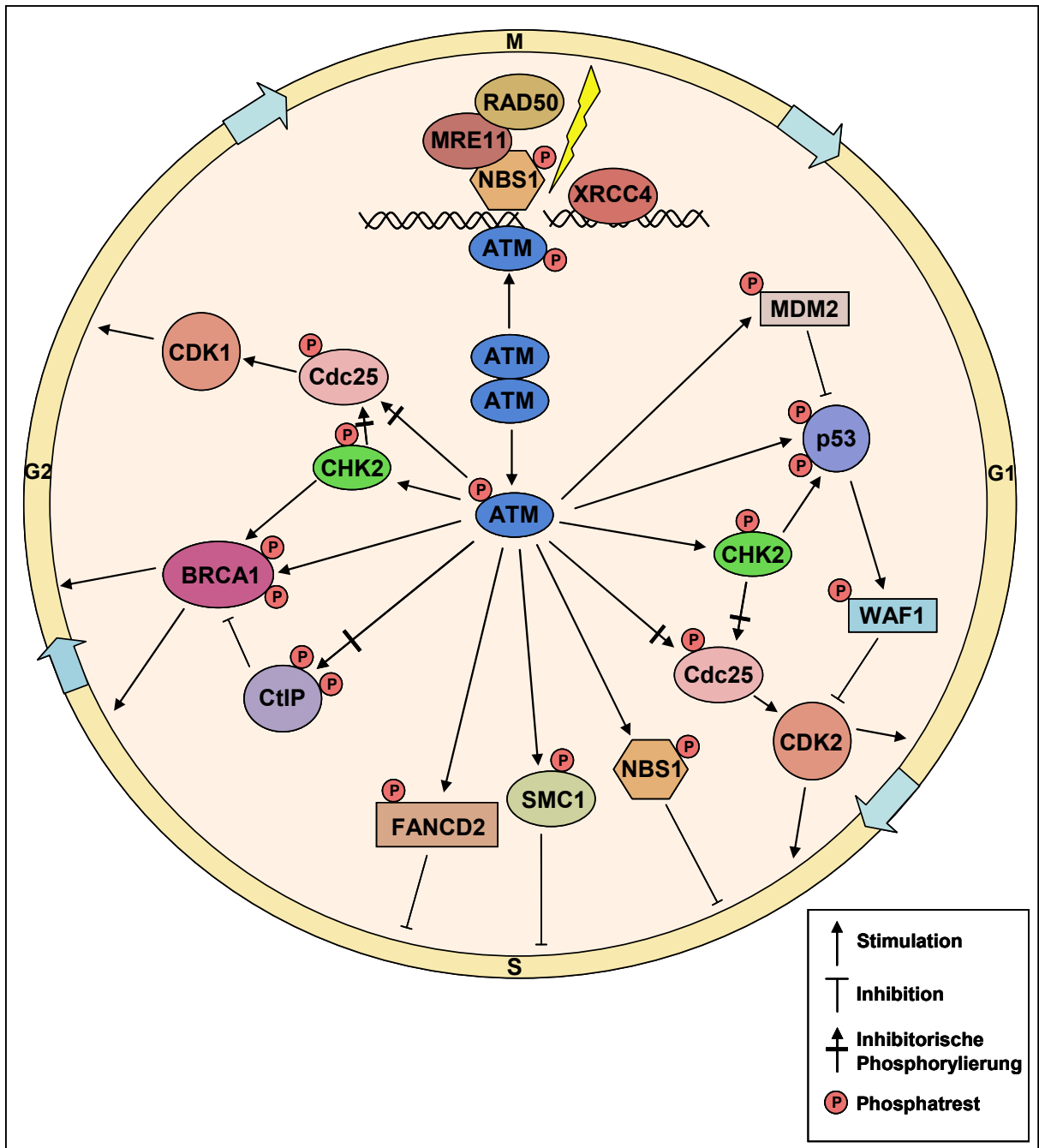
2002) aktiviert, um im Falle von DSBs die weitere DNA-Synthese zu verhindern. Über die Grenzen der einzelnen Kontrollpunkte des Zellzyklus hinaus wird die Phosphatase CDC25A (*cell division cycle 25A*) durch ATM phosphoryliert und hierdurch zum Abbau markiert (Mailand *et al.*, 2000). In Folge dessen kann CDC25A die Aktivität der zyklinabhängigen Kinasen CDK1 und 2 (*cyclin dependent kinase 1* und 2) nicht aufrecht erhalten, welche jedoch für die Übergänge von G1-S, intra-S und G2-M notwendig ist (Falck *et al.*, 2002). Insgesamt muss betont werden, dass ATM sowohl bezüglich der eigentlichen Reparatur von DSBs, als auch hinsichtlich der durch DSBs notwendig gewordenen Zellzykuskontrolle als essentielle Schlüsselkomponente eines komplexen regulatorischen Netzwerkes zu betrachten ist (**Abbildung 6**).

Da Doppelstrangbrüche nicht nur durch ionisierende Strahlung oder chemische Agenzien bewirkt werden, sondern auch unter physiologischen Bedingungen vor allem in Lymphozyten bei der somatischen Rekombination der Immunglobulingene und T-Zell-Rezeptoren vorkommen, steht zu vermuten, dass ATM auch in letztere Mechanismen wesentlich involviert ist. Tatsächlich ist ATM beim Klassenwechsel der Immunglobuline in B-Zellen funktionell unverzichtbar (Lumsden *et al.*, 2004; Reina-San-Martin *et al.*, 2004). Außerdem gibt es Hinweise, wonach ATM zumindest eine DNA-stabilisierende Rolle während der Rekombination der *V*-, *D*- und *J*-Gensegmente der Immunglobulinketten und T-Zell-Rezeptoren spielt (Bredemeyer *et al.*, 2006). In *Atm*-defizienten Mausmodellen, welche nur einen Teil der im humanen System auftretenden klinischen Merkmale aufweisen (Barlow *et al.*, 1996), ist eine T-Zell-Immundefizienz zu beobachten. Sie wird als Folge einer verminderten Integrität des T-Zell-Rezeptor  $\alpha$ -Lokus interpretiert (Matei *et al.*, 2007) und kann durch Einführen eines vollständig rekombinierten  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor-Transgens weitgehend wiederhergestellt werden (Chao *et al.*, 2000; Vacchio *et al.*, 2007). Die in diesen *Atm*-defizienten Mäusen auftretenden T-Zell-Lymphome zeigen außerdem einen abnormal rearrangierten T-Zell-Rezeptor  $\alpha$ -Lokus (Liyanage *et al.*, 2000). Völlig unklar sind hingegen die Ursachen der Prädisposition für T-Zell-Lymphome, der scheinbar intakten Rekombination der T-Zell- $\beta$ -Rezeptoren, aber auch der Mechanismus, der der Entstehung des thymischen Lymphoms zu Grunde liegt. Widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Lymphomagenese bei *Atm-knock out* Mäusen, die über eine zusätzliche Defizienz der in der Rekombination von TCRs und

Immunglobulinen unverzichtbaren Faktoren Rag1 und 2 (*recombination activated genes 1 and 2*) verfügen, unterstreichen den großen Bedarf an Aufklärung der molekulargenetischen Ursachen (Liao *et al.*, 1999; Petiniot *et al.*, 2000; Petiniot *et al.*, 2002).

Ebenfalls bisher nur unvollständig verstanden ist die Beteiligung von ATM an der Regulation von oxidativem Stress (Ito *et al.*, 2004). Bei einem ATM-Defekt scheinen insbesondere die hämatopoetischen Stammzellen in ihrer Überlebenszeit und ihrer Selbsterneuerung betroffen zu sein. Reaktive Sauerstoffspezies verhindern in diesen Zellen über einen p38 MAP-Kinase abhängigen Mechanismus eine Zellteilung (Ito *et al.*, 2006). Ein Zusammenhang zwischen Erkennung und Reparatur der DNA-DSBs einerseits sowie der Antwort auf oxidativen Stress andererseits konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden, steht aber aufgrund neuester Untersuchungen zu vermuten (Ito *et al.*, 2007).

Die Bedeutung von ATM für die genomische Integrität wird auch durch die Inaktivierung des *ATM*-Gens in zahlreichen humanen Neoplasien verdeutlicht. So sind nicht nur AT-Patienten vor allem für lymphatische Neoplasien prädisponiert, sondern auch heterozygote Träger eines defekten *ATM*-Allels beispielsweise für Brustkrebs (Khanna 2000). Die Schwere der Prädisposition ist dabei wohl von der jeweiligen *ATM*-Mutation abhängig (Gatti *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnten in Patienten mit prolymphozytischer Leukämie und germinal intakten *ATM*-Allelen somatisch biallelische, inaktivierende Mutationen des *ATM*-Gens gefunden werden (Stilgenbauer *et al.*, 1997). Interessanterweise zeigt sich auch im Mantellzell-Lymphom (siehe **1.2.2**) eine Inaktivierung von *ATM*. Während in dieser Neoplasie ein *ATM*-Allel durch Deletion der chromosomalen Bande 11q22-q23 verloren geht, wird das verbleibende Allel durch Punktmutationen inaktiviert (Schaffner *et al.*, 2000). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass umfangreichere Untersuchungen unabdingbar sind, um eine eingehende Bewertung der biologischen Funktionen ATM-regulierter Faktoren und Prozesse sowie deren Komplexität zu gestatten.



**Abbildung 6: Funktionsweisen von ATM nach Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs).** In Reaktion auf DNA-DSBs zerfällt das ATM-Dimer in autophosphorylierte Monomere. In Folge rekrutieren diese Monomere es für die Reparatur notwendige Enzyme an die Stelle des DSBs und unterbrechen durch Interaktion mit zahlreichen Zellzyklusproteinen den Zellzyklus. Im äußeren Ring sind die Zellzyklusphasen G1, S, G2 und M, sowie durch blaue Pfeile ihre jeweiligen Übergänge dargestellt. Weitere Erläuterungen sind der Legende und dem Text zu entnehmen.

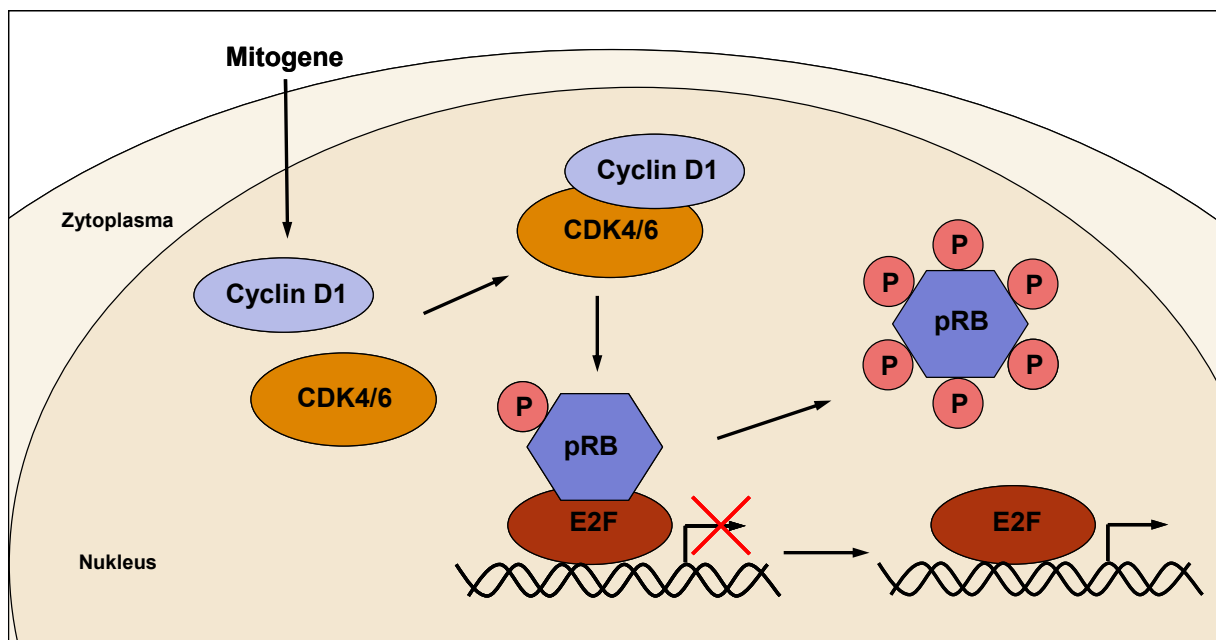
## 1.5. Das Onkogen *Ccnd1*

Der Zellzyklus von Zellen wird durch Expression, Aktivierung und Inhibition spezifischer Zyklone und Zyklin-abhängiger Kinase- (CDK, *cyclin-dependent kinase*)-Komplexe kontrolliert. Die Störung dieses regulatorischen Netzwerkes spielt eine wesentliche Rolle in einer Vielzahl humaner Krebserkrankungen. Die bisher am häufigsten beschriebenen Aberrationen betreffen das 13,4 kb große Gen *CCND1*. Dieses codiert das 295 Aminosäurereste umfassende und 33,7 kD schwere Protein Cyclin D1, welches am Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus an CDK4 / 6 bindet (**Abbildung 7**). Die hierdurch aktivierten CDKs phosphorylieren und inaktivieren in Folge das Retinoblastoma Protein (pRB). Der für den Eintritt in die S-Phase benötigte und von aktivem pRB reprimierte Transkriptionsfaktor E2F kann nun die Transkription für die DNA-Synthese benötigter Gene initiieren (Weinberg 1995). Cyclin D1 wirkt somit als Zellzykluspromotor. Es wird dabei insbesondere von extrazellulären Stimuli, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, innerhalb relativ kurzer Zeitspannen aktiviert (Matsushime *et al.*, 1991). Eine artifizielle Cyclin D1-Überexpression kann die Zelle aber auch von exogenen Stimuli unabhängig machen (Jiang *et al.*, 1993; Imoto *et al.*, 1997). Neben der Funktion als Cofaktor in der Zellzyklusregulation sind in letzter Zeit weitere Cyclin D1-Funktionen entdeckt worden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Cyclin D1 an den Östrogenrezeptor bindet und diesen zu aktivieren vermag (Zwijsen *et al.*, 1997).

Das Gen *CCND1*, auch bekannt als *BCL1* (*B-cell leukemia 1*) oder *PRAD1* (*Parathyroid Adenomatosis 1*), wurde erstmals durch die Klonierung des Bruchpunktes der Translokation t(11;14)(q13;q32) in B-Zellen chronischer lymphatischer Leukämien entdeckt (Tsujiimoto *et al.*, 1984). Erst später zeigte sich, dass es sich bei dem auch in parathyroiden Adenomen rearrangierten (Arnold *et al.*, 1989) sowie in Mantelzell-Lymphomen überexprimierten (Komatsu *et al.*, 1993) *PRAD1* um das gleiche Gen handelte (Richard *et al.*, 1991; Komatsu *et al.*, 1994). Auch in anderen Neoplasien, wie in Brust- und Plattenepithel-Karzinomen, konnten Veränderungen des *CCND1*-Gens sowohl auf genomischer als auch auf transkriptioneller Ebene gezeigt werden (Schuuring *et al.*, 1992). Relativ früh wurde vermutet, dass es sich bei diesem Gen um ein potentielles Onkogen handeln könnte (Rosenberg *et al.*, 1991),(Hinds *et al.*, 1994), zumal eine Überexpression von

Cyclin D1 in Fibroblasten ein abnormes Wachstum und eine erhöhte Teilungsrate der Zellen zur Folge hatte (Jiang *et al.*, 1993). In einem Cyclin D1 abhängigen murinen Brustkrebs-Modell konnte unter MMTV (*mouse mammary tumour virus*)-Kontrolle schließlich eine transformierende Wirkung nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 1994).

Im Mantelzell-Lymphom konnte die Überexpression von Cyclin D1 direkt mit der Translokation t(11;14)(q13;q32) in Zusammenhang gebracht werden (Shivdasani *et al.*, 1993). Der Versuch, ein Mausmodell des Mantelzell-Lymphoms allein durch Simulation der humanen pathologischen Situation zu etablieren, scheiterte jedoch. Bei diesem Versuch wurde das humane *CCND1*-Gen als Transgen unter der Kontrolle des Immunglobulinpromotors  $E\mu$  in Mäuse gebracht und überexprimiert. Als einziger Phänotyp konnte lediglich eine Reduktion der Lymphozyten-Menge gezeigt werden, wobei die Ursache für diese Beobachtung unklar blieb (Bodrug *et al.*, 1994).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Funktion von Cyclin D1 im Zellnucleus.** Das durch Mitogene aktivierte Cyclin D1 bindet die cyclinabhängigen Kinasen CDK 4 / 6. Dieser Komplex führt zur Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins (pRB), wodurch dieses die Fähigkeit, den Transkriptionsfaktor E2F zu binden und zu inhibieren, verliert. E2F kann nun die Transkription für die S-Phase essentieller Gene initiieren.



## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) zählt aufgrund seines klinisch aggressiven Verlaufes zu den hochmalignen B-Zelllymphomen. Während derzeit eine Vielzahl an Therapieansätzen, von der Chemo- und Immuntherapie bis zur auto- und allogenen Stammzelltransplantation, zur Behandlung des Mantelzell-Lymphoms eingesetzt wird, bietet sich unter diesen allerdings keinerlei therapeutische Option, die eine Heilung der Krankheit verspricht. Die eingehende Aufklärung derjenigen molekularen Mechanismen, die letztlich zur Genese dieser Neoplasie führen, ist zweifelsohne für die Entwicklung kurativer Therapieansätze von dringender Notwendigkeit.

Ein wesentliches molekulares Kennzeichen des Mantelzell-Lymphoms ist die Überexpression des Gens *CCND1*, welches für das Zellzyklusprotein Cyclin D1 kodiert. Wie aus älteren Studien bekannt ist, tritt die deregulierte Expression von *Cyclin D1* im MCL als Folge der chromosomalen Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  auf. Um die Mechanismen der Entstehung des MCL umfassend und in möglichst realistischem Zusammenhang untersuchen zu können, ist der Einsatz von Tiermodellen unerlässlich. Vorhergehende Versuchansätze, das Lymphom allein durch Überexpression von transgenem *CCND1* in der Maus auszulösen, blieben bislang ohne Erfolg, was bereits darauf hindeutet, dass weitere genetische Aberrationen in der Pathogenese des MCL von wesentlicher Bedeutung sind. So konnten in weiteren MCL-Studien unter anderem inaktivierende Mutationen und Deletionen des Gens *ATM*, welches für eine multifunktionelle PI3K-Proteinkinase kodiert, nachgewiesen werden. *ATM* besitzt eine Vielzahl Funktionen, unter anderem eine Schlüsselfunktion in der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese Funktion ist nicht nur in der Regulation der zellulären Antwort auf DNA-Schädigungen, sondern des Weiteren auch in der somatischen Rekombination der Immunglobulinketten von wesentlicher Bedeutung. Interessanterweise wird die zuvor genannte chromosomale Translokation als ein Ergebnis fehlerhafter somatischer Rekombinationen beschrieben, durch welche das *CCND1*-Gen unter die Kontrolle eines Immunglobulinpromotors gelangt. Somit gibt

es tatsächlich Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang der beiden, das *ATM* und das *CCND1*-Gen betreffenden, Aberrationen.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, durch Nachempfinden der genetischen Situation des MCLs im hämatopoetischen System der Maus die Bedeutung der Gene *Atm* und *Ccnd1* in der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen aufzuklären. Hierzu waren zwei unabhängige Versuchsansätze geplant. Zum einen sollte die Kreuzung zweier Mausstämmen, einem *Atm*-knock-out-Stamm (*Atm*<sup>-/-</sup>) sowie einem *Ccnd1*-transgenen Stamm, zur Generation eines MCL-Mausmodells dienen. Zum anderen sollte durch Rekonstitution des hämatopoetischen Systems letal bestrahlter Mäuse durch *Atm*<sup>-/-</sup>-HSCs, welches zuvor mit rekombinanten *Ccnd1*-Retroviren infiziert wurde, ein weiteres Modell geschaffen werden, in welchem die Veränderungen nur Zellen des hämatopoetischen Systems betreffen.

Basierend auf der Beobachtung, dass *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse durch eine genetische Prädisposition für T-Zell-Lymphome gekennzeichnet sind, ergab sich das Hauptziel des zweiten, umfangreicheren Teils der vorliegenden Arbeit. Da die genannte genetische Prädisposition sowie der Mechanismus der T-Zell-Lymphom-Pathogenese weitestgehend unerschlossen sind, sollte mit einer Auswahl immunologischer und molekularbiologischer Methoden die genauere Charakterisierung dieser Neoplasie erfolgen. So sollten unter anderem anhand von aCGH-Analysen und Genexpressionsstudien an Zellen des *Atm*<sup>-/-</sup>-T-Zell-Lymphoms etwaige Aberrationen auf chromosomaler oder Transkriptionsebene aufgespürt werden. Darüber hinaus würden die Ergebnisse dieser Studie zur Aufklärung von Prozessen beitragen, deren Deregulation infolge des *Atm*-Verlusts zur Tumorgenese des T-Zell-Lymphoms beitragen.



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

Die verwendeten Reagenzien und Chemikalien hatten den Reinheitsgrad *pro analysi* oder waren speziell für molekularbiologische Arbeiten geeignet. Das verwendete Reinstwasser wurde durch die Wasseraufbereitungssysteme Milli-QUF Plus (Millipore, Billerica, USA) oder TKA GenPure (TKA, Niederelbert) gewonnen.

#### 2.1.1. ZELLINIEN

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % (v / v) fötalem Kälberserum (FBS), 20 U/ml Penicillin sowie 20 mg / ml Streptomycin verwendet.

Die Zelllinien im Einzelnen:

##### 293T (ATCC-Nr.: CRL 11268)

Die humane embryonale Nierenzelllinie wurde mit retroviralen Plasmiden transfiziert, um Virus enthaltendes Medium (*virus containing medium*, VCM) zu produzieren.

##### E86 GP<sup>+</sup>

Die adhärenz, von der Linie NIH3T3 abgeleitete Mausfibroblastenzelllinie (Schessl *et al.*, 2005) wurde zur stabilen Produktion der gewünschten Retroviren mit VCM infiziert.

##### NIH3T3 (ATCC-Nr.: CRL 1658)

Die adhärenz wachsende murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 wurde hauptsächlich zur Titration viraler Überstände verwendet.

## 2.1.2. MAUSSTÄMME

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mausstämme verwendet. Zum einen handelte es sich um eine *Atm-knock-out*-Maus, die auf dem Wildtyphintergrund 129S6/SvEvTac basiert. Durch gezielte Rekombination wurde bei dieser Maus das *Atm*-Gen zerstört. Sie trägt im *Atm*-Gen an Position 5790 ein *PGKneo*-Gen in entgegengesetzter Orientierung wodurch ein Transkriptionsabbruch hervorgerufen wird. Als Folge besitzt diese Maus keinerlei *Atm*-Genprodukt. Der Mausstamm muss heterozygot (*Atm*<sup>+/-</sup>) propagiert werden, da homozygote Mäuse (*Atm*<sup>-/-</sup>) steril sind (Barlow *et al.*, 1996). Homozygote Mäuse zeigen außerdem einen retardierten Wuchs. Der *Atm-knock-out*-Mausstamm wurde kommerziell bei Jackson Laboratories bezogen.

Zum anderen wurde eine *CCND1* transgene Maus verwendet, die auf dem Hintergrund C57/BJ basiert. Die *CCND1* transgene Maus trägt ein humanes *CCND1*-Gen, welches unter der Kontrolle eines E $\mu$ -Promotors überexprimiert wird. Dieser Mausstamm wurde von Alan Harris, Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australien bezogen (Bodrug *et al.*, 1994) und als Inzuchtstamm propagiert. Er zeigt keine äußerlichen Phänotypen.

Beide Mausstämme wurden nach Ankunft im Tierlabor des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg (DKFZ) durch Embryotransfer saniert und kryokonserviert. Durch Kreuzung wurden aus den beiden Mausstämmen verschiedene Genotypen erzeugt.

Mausstamm und Genotyp	Herkunft
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>+/-</sup>	Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>+/+</sup>	J.H.Reuter, durch Zucht in der vorliegenden Arbeit erzeugt
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>-/-</sup>	J.H.Reuter, durch Zucht in der vorliegenden Arbeit erzeugt
C57/BJ	Charles River WIGA, Sulzfeld
C57/BJ- <i>CCND1</i>	Alan Harris, Melbourne, Australien
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>+/-</sup> x C57/BJ- <i>CCND1</i>	J.H.Reuter, durch Zucht in der vorliegenden Arbeit erzeugt
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>+/+</sup> x C57/BJ- <i>CCND1</i>	J.H.Reuter, durch Zucht in der vorliegenden Arbeit erzeugt
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>-/-</sup> x C57/BJ- <i>CCND1</i>	J.H.Reuter, durch Zucht in der vorliegenden Arbeit erzeugt
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>+/-</sup> x C57/BJ	J.H.Reuter, durch Zucht in der vorliegenden Arbeit erzeugt
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>+/+</sup> x C57/BJ	J.H.Reuter, durch Zucht in der vorliegenden Arbeit erzeugt
129S6/SvEvTac <i>Atm</i> <sup>-/-</sup> x C57/BJ	J.H.Reuter, durch Zucht in der vorliegenden Arbeit erzeugt

## 2.1.3. OLIGONUKLEOTIDE

Oligonukleotid	Sequenz
<b>Genotypisierungsprimer <i>CCND1</i></b>	
SV40-1:	5'- GGA ACT GAT GAA TGG GAG CAG TGG -3'
SV40-2:	5'- GCA GAC ACT CTA TGC CTG TGT GG -3'
<b>Genotypisierungsprimer <i>Atm</i></b>	
oIMR0013	5'- CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC -3'
oIMR0014	5'- AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC -3'
oIMR0640	5'- GCT GCC ATA CTT GAT CCA TG -3'
oIMR0641	5'- TCC GAA TTT GCA GGA GTT G -3'
<b>Sequenzierungsprimer <i>CCND1</i></b>	
seq_ccnd1_hin1	5'- CGA CCG GTA CTT GAT GGA -3'
seq_ccnd1_hin2	5'- CAG TAG TTC ACA CTG GGC -3'
seq_ccnd1_hin3	5'- ATA GAC TTT CGA CAG AAT -3'
seq_ccnd1_hin4	5'- ACA ATG GAC TAT GGA C -3'
seq_ccnd1_hin5	5'- CAG TCG ATC GAC CTC CGT CA -3'
seq_ccnd1_hin2a	5'- AGG TAC CAT CGA CGA CCC T -3'
seq_ccnd1_hin3a	5'- CTT TAA GAC AGC TTT CAG ATA -3'
<b>Sequenzierungsprimer <i>Notch</i></b>	
Notch_hin	5'- AGC TGG CGA GCA GGC ATG CCA CGG CT -3'
Notch_seq1	5'- ATG GAG GCA CCT GCC ACA ATG AGA T -3'
Notch_seq2	5'- ATT GAT GTT AAT GAG TGC ATC TCC A -3'
Notch_seq3	5'- CTA CAC AGG TGA CAT GTG TAA CGT CA -3'
Notch_seq4	5'- TCG CAA CTG TGA GAG TGA CAT CGA T -3'
Notch_seq5	5'- GTG AGG ACG AGG TGG ACG AGT GCT -3'
Notch_seq6	5'- TAC CGC TGT CTA TGC CCT GCC AAA T -3'
Notch_seq7	5'- ATC CGT GGC TCC ATT GTC TAC CTG GA -3'
Notch_seq8	5'- TGG CTG CCC GAT ACT CTC GTT CAG A -3'
Notch_seq9	5'- ACA GCT CGA GCA TGC TGT CGC CTG T -3'
Notch_seq10	5'- AGA TCA CCC ACA TTC CAG AGG CAT TTA -3'
Notch_seq11	5'- AGG CTC CAG TGT TCT GTA GTA GTG TT -3'
Notch_ruck	5'- CAT CCC ACA TCT CTG TTT ATT TAA AT -3'
Notch_ruck2	5'- TAG GAT GCG TCT GGT CAT ATC TAT TA -3'
<b>Primer T-Zell-Rezeptor <math>\beta</math></b>	
TcrbV1	5'- CTG AAT GCC CAG ACA GCT CCA AGC -3'
TcrbV2	5'- TCA CTG ATA CGG AGC TCA GGC -3'
TcrbV3.1	5'- CCT TGC AGC CTA GAA ATT CAG T -3'
TcrbV4	5'- GCC TCA AGT CGC TTC CAA CCT C -3'
TcrbV5.1	5'- CAT TAT GAT AAA ATG GAG AGA GAT -3'
TcrbV5.2	5'- AAG GTG GAG AGA GAC AAA GGA TTC -3'
TcrbV5.3	5'- AGA AAG GAA ACC TGC CTG GTT -3'
TcrbV6	5'- CTC TCA CTG TGA CAT CTG CCC -3'
TcrbV7	5'- TAC AGG GTC TCA CGG AAG AAG C -3'
TcrbV8.1	5'- CAT TAC TCA TAT GTC GCT GAC -3'
TcrbV8.2	5'- CAT TAT TCA TAT GGT GCT GGC -3'
TcrbV8.3	5'- TCG TGG CAA CCT TCG AAT AGG A -3'
TcrbV9	5'- TCT CTC TAC ATT GGC TCT GCA GGC -3'
TcrbV10	5'- ATC AAG TCT GTA GAG CCG GAG GA -3'
TcrbV11	5'- GCA CTC AAC TCT GAA GAT CCA GAG C -3'
TcrbV12	5'- GAT GGT GGG GCT TTC AAG GAT C -3'
TcrbV13	5'- AGG CCT AAA GGA ACT AAC TCC CAC -3'
TcrbV14	5'- ACG ACC AAT TCA TCC TAA GCA C -3'
TcrbV15	5'- CCC ATC AGT CAT CCC AAC TTA TCC
TcrbV16	5'- CAC TCT GAA AAT CCA ACC CAC -3'
TcrbV17	5'- ACT GTT CCT CGA ACT CAC AG -3'
TcrbV18	5'- CAG CCG GCC AAA CCT AAC ATT CTC -3'
TcrbV19	5'- CTG CTA AGA AAC CAT GTA CCA -3'
TcrbV20	5'- TCT GCA GCC TGG GAA TCA GAA -3'
Constant- $\beta$	5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCG GCT TGG GTG GAG TCA CAT TTC TC -3'
<b>Primer für Reverse Transkription</b>	
N6-Primer	Random Hexamers
(dT)21+T7 promotor sequence	5'- GCA TTA GCG GCC GCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN -3'

## 2.1.4. PLASMIDE

Plasmid	Hersteller
MSCV MSCV- <i>Ccnd1</i> pSPORT6 Ecopac	GSF Hämatologikum München J.H.Reuter, durch Klonierung in der vorliegenden Arbeit erzeugt RZPD, Berlin Cell Genesys, Foster City, USA

## 2.1.5. KULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE

Medium und Zusatz	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Fötales Kälberserum (FBS) Penicillin / Streptomycin (P / S) murine Stem Cell Factor (SCF) Interleukin 3 Interleukin 6 Bacto-Agar Bacto-Hefeextrakt Bacto-Trypton	GIBCO BRL, Karlsruhe Cell Systems, St. Katharinen GIBCO BRL, Karlsruhe Tebu-Bio, Offenbach Tebu-Bio, Offenbach Tebu-Bio, Offenbach BD Biosciences, Franklin Lakes, USA BD Biosciences, Franklin Lakes, USA BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

## 2.1.6. ENZYME

Enzym	Hersteller
<i>Alu</i> I <i>Rsa</i> I <i>Xho</i> I <i>Hpa</i> I DNA-Ligase Klenow-Fragment Proteinase K RNase A T4 DNA-Polymerase DNA-Polymerase I Superscript II RNase H	Promega, Mannheim Promega, Mannheim Promega, Mannheim Promega, Mannheim Promega, Mannheim Invitrogen, Karlsruhe Merck, Darmstadt Qiagen, Hilden NEB, Ipswich, USA Promega, Mannheim Invitrogen, Karlsruhe Epicentre, Madison, USA

## 2.1.7. ANTIKÖRPER

Antikörper	Konjugat	Hersteller
CD4	FITC	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD4	PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD8	APC	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
TCR $\beta$	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
B220	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Mac1	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD95	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD25	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD69	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD5	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD157	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CyclinD1 CloneDCS6		GeneTex, San Antonio, USA

## 2.1.8. GRÖßENSTANDARDS

Größenstandard	Hersteller
100 bp Molecular Ruler	BioRad, München
1 kb Molecular Ruler	BioRad, München
Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers	Amersham Biosciences, Picataway, USA

## 2.1.9. REAGENZIENSÄTZE

Reagenziensatz ( <i>Kit</i> )	Hersteller
BioPrime Array CGH Labeling Module	Invitrogen, Karlsruhe
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Mouse Genome CGH 244A Oligo Microarray Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
PRISM Big DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RiboMAX Large Scale RNA Production System-T7	Promega, Mannheim
RNeasy total RNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy total RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript RT Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

## 2.1.10. CHEMIKALIEN

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
5-Fluorouracil-GRY 5000 (5-FU, 150 mg / kg Körpergewicht)	GRY-Pharma, Kirchzarten
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Avertin (2, 2, 2-Tribromoethanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka, Buch, Schweiz
Cäsiumchlorid (CsCl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ciprofloxacin Ciprobay 400	Bayer, Leverkusen
Cy3-dUTP	Amersham Biosciences, Picataway, USA
Cy5-dUTP	Amersham Biosciences, Picataway, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP-Mix 10 mM	Amersham Biosciences, Picataway, USA
Ethanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA-Dinatriumsalz)	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Formaldehyd 38 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt
Guanidinium-Isothiocyanat (GITC)	GIBCO BRL, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hybridisierungspuffer UltraHyb	Ambion, Austin, USA
Isofluran (Florene)	Abbot, Wiesbaden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )	Linde AG, Pullach
May Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat (NaAc)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Natriumdihydrogenphosphat monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol	Ambion, Austin, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protaminsulfat (Salamine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Linde AG, Pullach
T4Gene 32 Protein (cloned), 500 µg	USB, Cleveland, USA
Trihydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt

## 2.1.11. SPEZIELLE GERÄTE

Gerät	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bestrahlungsanlage für $\gamma$ -Strahlen $^{137}\text{Cs}$ , HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa, Kanada
Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
CKX41 Mikroskop	Olympus, Hamburg
CO <sub>2</sub> Inkubator	Binder, Tuttlingen
DNA Microarray Hybridization Oven	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DNA Microarray Scanner	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACSVantage	Becton Dickinson, San Jose, USA
Gel Doc 2000 System	BioRad, München
GeneTAC Hybridization Station	Genomic Solutions Inc. Ann Arbor, USA
Infrarotlampe Infraphil HP1450	Philips, Hamburg
Makrolon Typ2 Käfig (26 cm x 20 cm x 14 cm)	Technoplast, Varese, Italien
Mikro-Dismembrator	B. Braun International, Melsungen
Milli-QUF Plus System	Millipore Corp. Bedford, UK
Minitrak II Minitrak Liquid Handling System	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Nanodrop ND1000 Spectrophotometer	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Ofen UNB100	Memmert, Schwabach
Präparierbesteck	Neolab, Heidelberg
PrimusHT Multiblock PCR-System	MWG-Biotech, Ebersberg
Stratalinker 2400 UV-Crosslinker	Stratagene, La Jolla, USA
Swing off Rotor SW41	Beckmann, München
Ultracentrifuge UZ L-70	Beckmann, München
UV Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Varifuge 3.0	Heraeus, Osterode
Versarray Microarray-Spotter	BioRad, Hercules, Kanada

## 2.1.12. BIOINFORMATISCHE HILFSMITTEL

### 2.1.12.1. Datenbanken

Datenbanken	Hersteller
Bioinformatic Harvester	<a href="http://harvester.fzk.de/harvester/">http://harvester.fzk.de/harvester/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a>
GEO	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>
GO	<a href="http://www.geneontology.org/">http://www.geneontology.org/</a>
MGI	<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>
OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM</a>
PubMed Medline	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed</a>

## 2.1.12.2. Software

---

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
CGH Analytics v3.4.27	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
FeatureExtraction v9.1	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GenePix Version 5.0	Axon Instruments Inc., Union City, USA
Ingenuity Pathways Analysis	Ingenuity Systems, Redwood City, USA
Microsoft Excel 2000	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word 2000	Microsoft, Redmond, USA
R, Version 2.3.0 sowie <i>workingpackages</i>	<a href="http://cran.r-mirror.de/">http://cran.r-mirror.de/</a> (open source)
Scanner Control software v7.0	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
CellQuest Pro 4.0.2	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

---



## 2.2. Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden beschrieben. Allgemein gebräuchliche Standardverfahren wurden gemäß der Protokolle in den Werken *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 1987-2005), *Current Protocols in Human Genetics* (Haines), *Molecular Cloning* (Sambrook 1989-2005) und *DNA Microarrays* (Bowtell 2003) durchgeführt.

### 2.2.1. TIERMODELL

#### 2.2.1.1. Mauszucht und Haltung

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg (DKFZ) oder des Hämatologikums der Gesellschaft für Strahlenforschung (GSF) in München nach den geltenden tierschutzrechtlichen und standardisierten Bestimmungen in Isolatoren oder Barrieren gezüchtet und gehalten. Die Raumtemperatur betrug  $22 \pm 2$  °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 h. Zur Zucht wurden genotypisierte Mäuse im Alter von sechs Wochen im Verhältnis 1:1 oder 1:2 verpaart. Die Empfängermäuse der Transplantationsexperimente wurden bis vier Wochen *post transplantationem* in IVCs (*isolated ventilated cages*) mit sterilem Futter sowie Ciprofloxacin (20 mg Ciprobay 400 / 400 ml Trinkwasser) gehalten. Anschließend wurden sie, nach Geschlechtern getrennt, in Typ 2-Makrolon-Käfige mit einer Besatzdichte von ein bis fünf Individuen pro Käfig verbracht.

#### 2.2.1.2. Genotypisierung der Mäuse

Die Verwendung der Mäuse zu Zuchtzwecken, für Organentnahmen oder Versuche ist vom individuellen Genotyp der Mäuse abhängig, den es zuvor zu bestimmen gilt. Zur Genotypisierung der Mäuse werden ihnen im Alter von vier bis sechs Wochen 0,2 cm der Schwanzspitze abgenommen. Nach Isolierung der genomischen DNA mit

dem DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, nach Herstellerangaben) wird mit den entsprechenden Primersystemen in einer PCR und nachfolgender PCR-Produkt Analyse in einem 1,3 %igen Agarosegel der Genotyp festgestellt.

Die 50 µl Genotypisierungs-PCR-Ansätze für *Atm knock out* Mäuse weisen folgende Zusammensetzung auf: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM je dNTP, je 0,5 µM der Primer oIMR0013, oIMR0014, oIMR0640 und oIMR0641, 2,5 U *Taq* DNA Polymerase sowie 2 µl der jeweiligen aufgereinigten DNA-Lösung. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 3 min 94 °C, 12 Zyklen mit 20 s 94 °C, 30 s 64 °C bei einer Verringerung der Temperatur von 0,5 °C pro Zyklus, 35 s 72 °C gefolgt von 25 Zyklen 20 s 94 °C, 30 s 58 °C, 35 s 72 °C sowie 2 min 72 °C. Vom Wildtypallel entsteht ein 147 bp langes, vom *Atm*<sup>-</sup>-Allel ein 280 bp umfassendes Amplifikat. Bei Proben heterozygoter Individuen kann man beide Produkte im Agarosegel nachweisen.

Zur Genotypisierung *CCND1*-transgener Mäuse wurde folgende PCR-Zusammensetzung im 50 µl-Ansatz gewählt: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM je dNTP, je 0,5 µM der Primer SV40-1 und SV40-2, 2,5 U *Taq* DNA-Polymerase sowie 1 µl der jeweiligen aufgereinigten DNA-Lösung. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 5 min 94 °C, 35 Zyklen mit 1 min 94 °C, 1 min 57 °C, 1 min 72 °C, gefolgt von 7 min bei 72 °C. Im Fall der Anwesenheit des Transgens in der Probe wird ein 381 bp langes Produkt amplifiziert.

### 2.2.1.3. Blutabnahme

Zur Blutabnahme wird die Schwanzspitze der Maus mit einer Infrarotlampe erwärmt. Nachdem sich die Venen geweitet haben, wird das Blut mit einer heparinisierten Kanüle abgenommen.

Bei terminalen Untersuchungen wurde das Blut durch Herzpunktion entnommen. Der Stich mit der Kanüle wird bei der durch Isofluran betäubten und auf dem Rücken liegenden Maus von links unterhalb des Sternums nach rechts oben in Richtung Herz geführt. Wird die Herzwand durchstoßen und befindet sich die Kanüle in einer Hauptkammer, können aus dem schlagenden Herzen 0,4 – 0,7 ml Blut entnommen werden, bevor es kollabiert.

#### 2.2.1.4. *Töten von Mäusen*

Tiere, die zur Organentnahme oder Analyse vorgesehen sind, werden entweder in Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>)-Atmosphäre oder durch zervikale Dislokation getötet.

#### 2.2.1.5. *Sektion von Mäusen*

Erkrankte Mäuse, die für eine Sektion bestimmt sind, werden grundsätzlich in Kohlendioxid getötet, um eine Beschädigung eventuell veränderter innerer Strukturen, wie sie bei der zervikalen Dislokation vorkommen kann, zu verhindern. Die getöteten Tiere werden in 70 % Ethanol getränkt und nach der Fixierung durch Nadeln auf einer Präparationsunterlage eröffnet. Dabei wird das Fell in der Bauchunterseite eingeschnitten und mit einem medianen Schnitt nach vorn bis zum Unterkieferwinkel und nach hinten bis zum Becken geöffnet.

#### 2.2.1.6. *Thym- und Splenektomie*

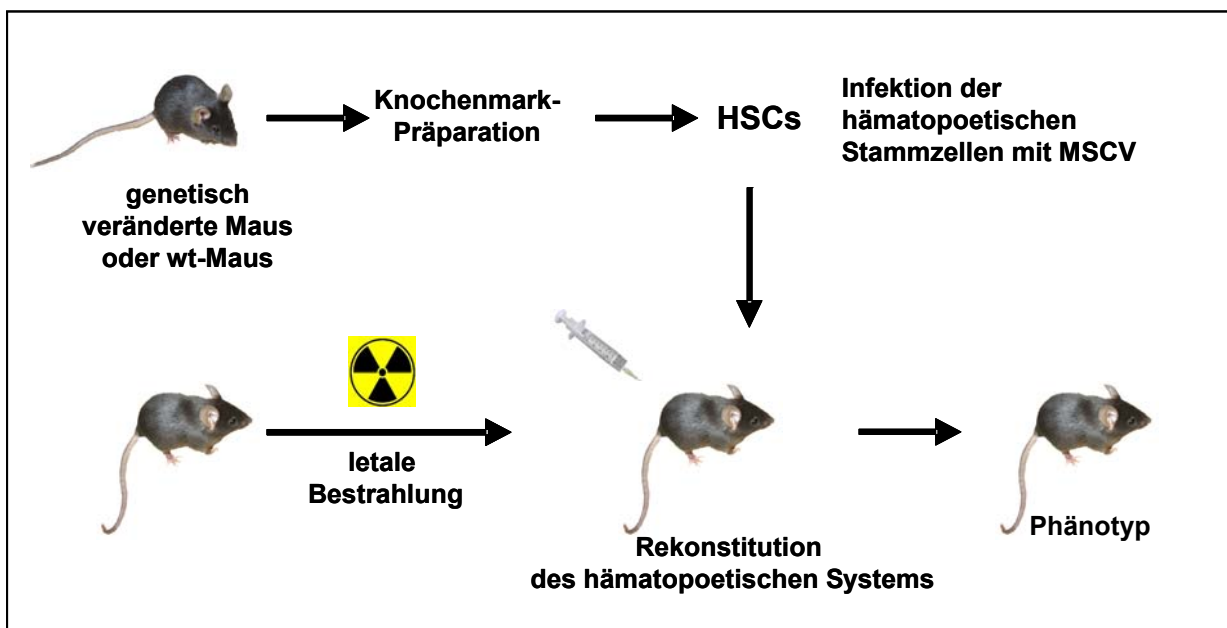
Für eine Thym- bzw. Splenektomie vorgesehene frisch getötete Mäuse werden in 70 % Ethanol getränkt, mit Nadeln auf einer Präparationsunterlage fixiert und sofort eröffnet. Nachdem das Fell von der Bauchunterseite entfernt ist, kann mit einem geraden Schnitt durch das *Peritoneum* der Bauchraum geöffnet sowie der Thorax bis in den Halsbereich durchtrennt werden. Milz und Thymus können nun mit zwei Federpinzetten entnommen werden.

#### 2.2.1.7. *Kryokonservierung von Gewebeproben*

Entnommenes Gewebe wird, sofern es für die Nukleinsäure- und Proteinextraktion (siehe 2.2.2.1) oder für histopathologische Untersuchungen vorgesehen ist, in flüssigem Stickstoff bei -194 °C schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.8. Knochenmarks-Transplantationsmodell

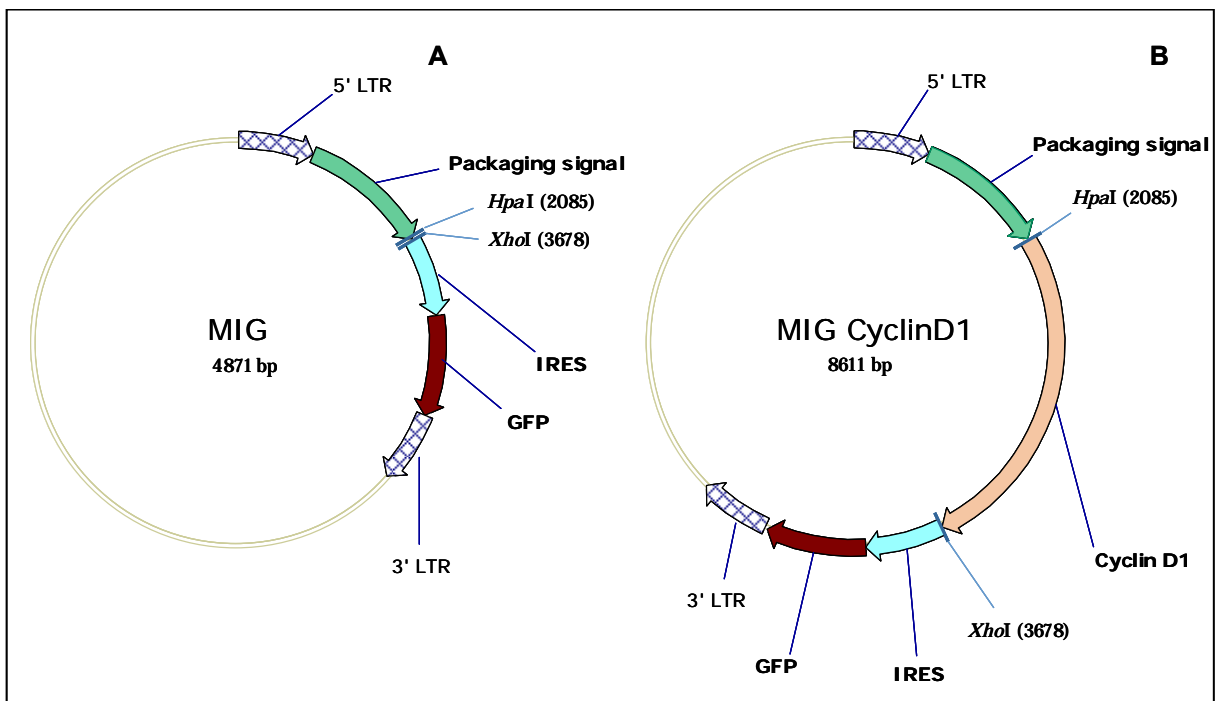
Um erstmalig ein Mausmodell des Mantelzell-Lymphoms zu generieren, wurde sich eines Knochenmarks-Transplantationsmodelles bedient. Wie in **Abbildung 8** gezeigt, werden Wildtyp-Mäuse zunächst letal bestrahlt, um deren hämatopoetisches System zu zerstören. Im Folgenden soll das System mit genetisch manipulierten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) rekonstituiert werden. Hierzu werden zunächst die HSCs von  $Atm^{-/-}$ - oder  $Atm^{+/-}$ -Mäusen gewonnen und mit einem *Ccnd1* überexprimierenden Retrovirus infiziert. Der virale Vektor enthielt darüber hinaus das Gen für *Green Fluorescent Protein (GFP)* als Markergen, um erfolgreich transduzierte Zellen über ihre Fluoreszenz identifizieren und isolieren zu können. Das Knochenmarks-Transplantationsmodell ermöglicht es, relativ schnell gewebsspezifische genetische Manipulationen durchzuführen, ohne auf *knock-out*-Technologien mit vielen Kreuzungsschritten zurückgreifen zu müssen.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Knochenmarks-Transplantationsmodells.** Knochenmarkszellen einer genetisch veränderten oder Wildtyp-Maus wird präpariert und mit dem Mausstammzell-Virus (MSCV) infiziert. Diese werden zur Rekonstitution des hämatopoetischen Systems einer letal bestrahlten Wildtypmaus verwendet. Eventuell auftretende Phänotypen im hämatopoetischen System werden analysiert.

### 2.2.1.8.1. Konstrukte und retrovirale Vektoren

Für den retroviralen Gentransfer des *Ccnd1* Gens in HSCs der Maus wird das *Ccnd1* Gen aus einem pSPORT6-Vektor in einen modifizierten Vektor des murinen Stammzellvirus (MSCV, *murine stem cell virus*) umklontiert. Der modifizierte MSCV Vektor verfügt über ein *GFP*-Gen, welches zusammen mit dem *Ccnd1*-Gen transkribiert wird. Dies erleichtert später eine Identifizierung der Cyclin D1 exprimierenden Zellen. Durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, *IRES*) zwischen dem *Ccnd1*-Gen und dem *GFP*-Gen wird sichergestellt, dass bei der Translation des *Cyclin D1* kein Fusionsprotein entsteht (**Abbildung 9**). Das *Ccnd1*-Gen wird mittels PCR amplifiziert und nach Schneiden der PCR-Produkt-Termini mit den Restriktionsendonukleasen *HpaI* und *XhoI* sowie nachfolgender Agarosegelaufreinigung in den ebenso mit *HpaI* und *XhoI* geschnittenen MSCV-Vektor ligiert. Mit diesem Ligationsansatz werden anschließend kompetente *Escherichia coli*-Bakterien transformiert, die daraus heranwachsenden



**Abbildung 9: Übersichtskarte der verwendeten retroviralen Plasmide.** In A ist das Kontroll- und Ausgangsplasmid MIG (MSCV-IRES-GFP) dargestellt. In B ist die in dieser Arbeit hergestellte Variante von A mit eingebrachtem *Cyclin D1* Gen zu sehen. Aufgeführt sind die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *HpaI* und *XhoI*, zwischen die das *Cyclin D1* Gen eingefügt wurde. LTR: *long terminal repeat*; GFP: *green fluorescent protein*; IRES: *internal ribosomal entry site*.

Klone auf LB-Agar-Platten (LB-Medium mit 1,7 % (w / v) Bacto-Agar) vereinzelt und über PCR auf Anwesenheit des transformierten Plasmids überprüft. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mithilfe von Agarosegelelektrophorese. Die das Konstrukt beinhaltenden Klone werden in einer 3 ml-Flüssigkultur in LB-Medium (5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 5 g Bacto-Trypton *ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,0) angezogen. Die DNA wird anschließend mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben präpariert und zur Kontrolle des *Ccnd1*-Gens sequenziert. Ein das vollständige Plasmid enthaltender Klon wird sodann in einer 500 ml-LB-Medium-Flüssigkultur vermehrt und die Plasmid-DNA mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben isoliert. Auf gleiche Weise wird der nur *IRES* und *GFP* enthaltende MSCV-Vektor als Kontrollvektor MIG (*MSCV-IRES-GFP*) vermehrt und isoliert.

#### 2.2.1.8.2. Verpacken rekombinanter Plasmide in Viruskapside

Zur Verpackung von Vektorplasmiden in Viruskapside werden 293T-Zellen mit dem die Kapsidproteine kodierenden Vektor Ecopac sowie dem rekombinanten Plasmid transient kotransfiziert. Nach der Transfektion werden in das Medium abgegebene Viren als VCM (*virus containing medium*) abgenommen und zur Infektion der Zelllinie E86 GP<sup>+</sup> verwandt, um letztlich eine stabile virusproduzierende Zelllinie zu erhalten. Für die Transfektion werden zunächst  $1,5 \times 10^7$  293 T-Zellen in einer 15 cm-Kulturschale ausgesät und 24 h mit 20 ml Medium kultiviert. Am Tag der Transfektion werden 30 µg der Vektor-DNA und 30 µg Ecopac-DNA in 1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, anschließend tropfenweise mit einer Lösung aus 1 ml HBS (5,96 g HEPES, 8,18 g NaCl, 133 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, *ad* 50 ml H<sub>2</sub>O) und 100 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> versetzt und für 5 min inkubiert. Anschließend wird die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gebracht. 12 h nach erfolgter Transfektion wird das Medium (DMEM, 10 % (v / v) FBS, 100 µg / ml P / S) gewechselt und im weiteren 12 h-Rhythmus bis zu vier Mal VCM entnommen und jeweils gegen neues Medium ausgetauscht. Vor der Lagerung bei -80 °C wird das gewonnene VCM zur Entfernung von Zelldebris durch einen 0,45 µm-Filter filtriert.

#### *2.2.1.8.3. Stabile Virusproduktion in E86 GP<sup>+</sup>-Zellen*

Um eine stabile virusproduzierende Zelllinie zu generieren, werden E86 GP<sup>+</sup>-Zellen mit rekombinanten Viren infiziert, danach durchflußzytometrisch sortiert und vereinzelt. Einen Tag vor Infektion werden  $5 \times 10^4$  E86 GP<sup>+</sup>-Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am Tag der Infektion werden die Zellen vom Medium befreit und mit 2 ml VCM (2.2.1.8.4), dem zuvor Protaminsulfat (5 µg / ml) zugegeben wurden, versetzt. Nach 12 h und 24 h wird die Infektion wiederholt. Vier Tage nach Infektionsbeginn werden die Zellen geerntet, in FACS-Puffer (PBS, pH 7,2, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA) aufgenommen und durchflußzytometrisch in GFP-positive und -negative Zellen aufgetrennt. Nach erneuter Kultur der GFP-positiven Zellen erfolgt eine Einzelzellsortierung. Auf diese Weise können einzelne GFP-positive Zellen in je ein Well einer mit Medium gefüllten 96-Well-Platte sortiert und zu einem Klon herangezogen werden. Diese einzelnen Klone werden schließlich bei 90 % Konfluenz in 48-Well-Platten, auf ihre Virusproduktivität getestet.

#### *2.2.1.8.4. Analyse der Virusproduktion von E86 GP<sup>+</sup>-Zellen*

Zur Kontrolle der Virusproduktion verschiedener Klone infizierter E86 GP<sup>+</sup>-Zellen werden NIH3T3-Zellen mit dem Überstand der E86 GP<sup>+</sup>-Zellkultur einer 6-Well-Plattenkultur infiziert. Hierzu werden die NIH3T3-Zellen mit 500 µl des zu testenden Überstandes mit 5 µg / ml Protaminsulfat für 4 h inkubiert sowie anschließend mit weiteren 2,5 ml Medium versetzt. Nach 48 h werden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und in FACS-Puffer aufgenommen. Am Durchflußzytometer werden grün fluoreszierende und somit virusinfizierte NIH3T3-Zellen quantifiziert.

#### *2.2.1.9. Entnahme von murinem Knochenmark und Infektion mit Viren*

Fünf Tage vor der Knochenmarkspräparation wurde den Spendermäusen 5-Fluorouracil (5-FU, 150 mg / kg Körpergewicht) intravenös injiziert, um hochproliferative Zellen zu eliminieren und den Anteil an frühen Vorläufern zu erhöhen (Randall *et al.*, 1997). Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die langen Röhrenknochen aus den Hinterläufen getöteter Mäuse präpariert. Die

Röhrenknochen werden mit einer Kanüle unter sterilen Bedingungen gespült und die isolierten Zellen in speziellem Stammzellmedium (DMEM, 15 % (v/v) FCS, 100 µg/ml P/S, 6 ng/ml IL3, 10 ng/ml IL6 und 100 ng/ml murines SCF) aufgenommen. Bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> werden die Zellen für 24 h kultiviert. Durch Interleukine im Medium werden die frühen Vorläuferzellen zur Teilung angeregt, um eine Infektion mit rekombinanten Viren zu ermöglichen, da diese für nicht-proliferierende Zellen nicht infektiös sind. Die konfluent gewachsenen, stabil Virus produzierenden E86 GP<sup>+</sup>-Zellen werden daraufhin mit 4000 cGy γ-Strahlen bestrahlt, um ihre weitere Teilung zu unterbinden. Nach weiteren 24 h werden die Knochenmarkszellen auf die bestrahlten Virus produzierenden Zellen gebracht und mit 5 µg/ml Protaminsulfat für 48 h inkubiert. Nach Entfernen der Virus produzierenden E86 GP<sup>+</sup>-Zellen von den Knochenmarkszellen exprimieren diese innerhalb der nächsten 48 h neben dem Transgen auch GFP, anhand dessen sie nach Überführen in FACS-Puffer durchflusszytometrisch von nicht infizierten Knochenmarkszellen getrennt werden können.

#### *2.2.1.9.1. Transplantation des Knochenmarks*

Die als Rezipienten vorgesehenen Wildtyp-Mäuse werden mit 800 cGy bestrahlt, um das hämatopoetische System zu zerstören. Anschließend werden ihnen hochrein sortierte retroviral infizierte Knochenmarkszellen intravenös appliziert. Um die transplantierten Mäuse nicht durch Sekundärinfektionen zu verlieren, werden sie, wie unter **2.2.1.1** beschrieben, in Isolation gehalten.

#### *2.2.1.9.2. Beobachtung der transplantierten Mäuse*

Bereits vier Wochen nach Transplantation wird in vier wöchentlichem Abstand Blut aus der Schwanzvene entnommen, um die Repopulation des hämatopoetischen Systems durch retroviral verändertes Knochenmark durchflusszytometrisch zu dokumentieren.



### 2.2.1.9.3. *Entnahme von Knochenmark durch Punktion des Femur*

Zwölf Wochen nach der Transplantation werden den Versuchsmäusen Knochenmarkszellen entnommen, um den Status der Repopulation des hämatopoetischen Systems beobachten zu können. Zu diesem Zweck werden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Avertin (0,4 – 0,7 mg / g Körpergewicht) anästhesiert. Nach Eintreten der Toleranzphase werden die Knochenmarkszellen mit einer 3 ml-Spritze (Terumo) und einer 24 G-Kanüle aus dem Femur entnommen und sofort in 3 ml 4 °C kaltes DMEM mit 15 % (v / v) FBS überführt. Der Femur wird dafür im Knie gebeugt und zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert. Durch Bohren mit der Kanüle im Kniegelenk in streng paralleler Ausrichtung zum Femur, kann die Knochenwand durchstoßen werden. Nach Anlegen des Unterdrucks und vollständigem Einführen der Kanüle in den Knochen wird das Knochenmark entnommen.

### 2.2.1.10. *Zellbiologische Analysen*

#### 2.2.1.10.1. *Cytospins*

Zur mikroskopischen Untersuchung von Zellen werden beschriftete Objektträger mit gelochten Filterpapieren (*Filter Cards*, Shandon) in die Cytospin-Vorrichtung gespannt. In den Trichter der Vorrichtung werden 200 µl der zu analysierenden Zellsuspension pipettiert. Nach Einhängen in den dazugehörigen Rotor (Cytospin 2, Shandon) werden die Apparaturen für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert. Die Zellen kommen so auf dem Objektträger in der Aussparung des Filterpapiers zum Liegen. Nach einstündiger Trocknung werden die Präparate nach Pappenheim gefärbt und an einem Mikroskop analysiert.

### *2.2.1.10.2. Blutausstriche*

Für die mikroskopische Analyse von Blut werden wenige Mikroliter Blut auf einen Objektträger aufgebracht und mit der Kante eines zweiten Objektträgers im Winkel von 70 ° unter hohem Druck verstrichen, um den Träger mit einer etwa einzelligen Schicht zu überziehen. Nach 20 min Trocknung können die Präparate, wie unter 2.2.1.10.3 beschrieben, nach Pappenheim gefärbt werden.

### *2.2.1.10.3. Panoptische Färbung nach Pappenheim*

Sowohl Cytospins als auch Blutausstriche werden zur Analyse nach Pappenheim gefärbt. Dabei werden die Objektträger zunächst für 3 min in May-Grünwald-Färbelösung getaucht, 5 min in Wasser gewaschen und für 1 h in Giemsa Färbelösung gefärbt. Nach erneutem Waschen in Wasser für 5 min werden die Objektträger getrocknet und stehen zur mikroskopischen Analyse zur Verfügung.

### *2.2.1.11. Histopathologie und Gewebefixierung*

Frisch präpariertes Gewebe aus der Maus wird in 4 % gepuffertem Formalin (300 ml 38 % Formaldehyd, 12 g Natriumhydrogenphosphat-monohydrat, 24,45 g Dinatriumhydrogenphosphat, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O) für 24 h fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet. Die Paraffinblöcke mit Gewebeprobe werden am Mikrotom geschnitten, die Schnitte auf Objektträger aufgebracht. Für die histopathologischen Untersuchungen wurden sie nach Standardprotokollen mit Giemsa, Hämatoxylin und Eosin (HE) und Pas (Periodsäure und Schiff'sches Reagenz) gefärbt und unter einem Mikroskop ausgewertet. Das Einbetten, Schneiden, Färben sowie die pathologische Begutachtung wurden freundlicher Weise von PD Dr. Ralf Rieker, Innsbruck durchgeführt.

### *2.2.1.11.1. Durchflusszytometrische Methoden*

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung einzelner Zellen innerhalb kürzester Zeit. Hierfür müssen die zu analysierenden Zellen zuerst in eine Einzelzellsuspensionen überführt werden. Zentraler Bestandteil der Analyse ist das Durchflusszytometer. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten

Durchflusszytometer (FACSCalibur und FACSVantage, BD Biosciences) verfügen über einen Argonionenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm sowie zudem über einen Helium-Neon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Die zu analysierenden Zellen werden auf ihre Größe und Granularität sowie Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht. Außerdem können durch fluorochrommarkierte Antikörper Oberflächenstrukturen angefärbt und im Durchflusszytometer detektiert werden. Die entsprechend vorbereiteten Zellen werden dabei einzeln in einem laminaren Probenstrom an den Lasern vorbeigeleitet. Bei Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe wird dann Licht einer spezifischen Wellenlänge emittiert und durch ein komplexes System von Linsen, Spiegeln, Filtern und Detektoren schließlich analysiert. Durch die Streuung der Lichtstrahlen in Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls kann die Zellgröße bestimmt werden (Vorwärtsstreulicht oder *Forwardscatter*-FSC), das an Strukturen innerhalb der Zelle in einem 90 °-Winkel gestreute Licht wird als Seitwärtsstreulicht oder *Sidescatter*-SCC bezeichnet und stellt ein Maß für die Zellgranularität dar. Die für Antikörperfärbungen verwendeten Farbstoffe müssen sich durch die Photonen definierter Wellenlänge der jeweiligen verwendeten Laser anregen lassen. Benutzt wurden im Einzelnen die Farbstoffe Fluoreszein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC).

Zur alleinigen Analyse der Oberflächenmoleküle von Zellen wurde ein FACSCalibur als Durchflusszytometer benutzt. Die zu analysierenden Zellen wurden durch einen *Falcon Cell Streamer* mit einer Maschenweite von 40 µm vereinzelt und sodann in PBS gewaschen. Die Zellzahl wird in einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer *improved*) bestimmt. Die Zellen werden in FACS-Puffer resuspendiert. Je  $1 \times 10^5$  Zellen werden mit den jeweiligen Antikörpern nach Herstellerangaben gefärbt, in 150 µl FACS-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation für 10 min bei 250 x g, 4 °C in 100 µl PBS aufgenommen. Unmittelbar vor der Analyse wurde 1 µl Propidiumiodid zur Markierung der DNA toter Zellen hinzugegeben.

Das Prinzip des Zellsortierens mit einem Durchflusszytometer gleicht dem der Analyse. Es wird hier allerdings der elektrisch leitfähige Flüssigkeitsstrom aufgebrochen. Dies geschieht, indem die Kanüle, welche die Zellen am Laser vorbei und durch die Messküvette leitet, an ihrem Ende zu Vibrationen angeregt wird. Dadurch zerbricht der laminare Flüssigkeitsstrom beim Austritt in einzelne Tröpfchen. Tröpfchen, in denen sich eine Zelle mit ausgewählten Streulicht- und

Fluoreszenzeigenschaften befindet, werden je nach Eigenschaft der Zelle elektrisch positiv oder negativ geladen. In einem elektrostatischen Feld kommt es dann zu einer ladungsabhängigen Ablenkung der einzelnen Tröpfchen, die in unterschiedlichen Reagenzröhrchen aufgefangen werden können.

Die zu sortierenden Zellen werden, wie zuvor beschrieben, vorbereitet und gegebenenfalls mit Antikörpern gefärbt. In der Regel sind die sortierten Zellen für die weitere Zellkultur bestimmt und werden steril vorbereitet und sortiert.

## **2.2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEMETHODEN**

### *2.2.2.1. DNA-, RNA- und Proteinextraktion*

Die gleichzeitige Aufreinigung von RNA, DNA und Proteinen aus ein und derselben Gewebeprobe wird durch die Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation ermöglicht. Dabei werden die Nukleinsäuren mittels Guanidinium-isothiocyanat (GITC) extrahiert. Die Auftrennung erfolgt dann über die unterschiedlichen Moleküldichten (Roerig *et al.*, 2005). Soweit nicht anders vermerkt, wurden in dieser Arbeit alle Gewebeproben auf diese Weise aufgearbeitet.

Die tiefgefrorenen Gewebeproben werden in einem Mikro - Dismembrator zerkleinert und anschließend in 6 ml 4 M GITC-Lösung (500 g GITC, 26,5 ml 1 M Na-Citrat, 8,5 ml 2-Mercaptoethanol *ad* 1058 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,0) homogenisiert. Das Lysat wird bei 2 500 rpm und RT für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird in die mit 4 ml 5,7 M CsCl-Puffer (479,8 g CsCl, 4,15 ml 3 M NaAc, pH 5,0, *ad* 500 ml H<sub>2</sub>O) gefüllten Polyallomerröhrchen überführt. Die Polyallomerröhrchen werden in die Zentrifugenbecher gebracht, nach Tarieren mit Mineralöl im *Swing-off*-Rotor aufgehängt und bei 32 000 rpm und 15 °C für 16 h zentrifugiert. Anschließend wird die Lipid- und Proteinfraction entfernt und bei -80 °C zur weiteren Verwendung gelagert. Die CsCl-Phase, in welcher die DNA angereichert wurde, wird abgezogen und bis zur weiteren Aufreinigung bei -20 °C eingefroren. Die pelletierte RNA wird für 30 min bei 4 °C getrocknet und in 200 µl RNasin-Mix (90 µl RNasin, 193,5 µl 0,1 M DTT, 6,9 ml H<sub>2</sub>O) gelöst. Nach Zugabe von 20 µl 3 M NaOH (pH 5,2) und 500 µl eiskaltem Ethanol wird die RNA bei -80 °C 30 min präzipitiert und anschließend bei 14 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Nach Waschen wird die gereinigte RNA in 200 µl RNasin-Mix aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Die Aufreinigung von DNA aus CsCl-Lösung wurde wie folgt durchgeführt: Zu jeweils 5 ml wieder aufgetauter DNA / CsCl-Lösung werden 500 µl 3 M NaOH-Lösung gegeben. Die homogenisierte Mischung wird für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA wird anschließend mit 12,5 ml eiskaltem Ethanol präzipitiert. Die genomische DNA wird nach Abzentrifugieren bei 2 500 rpm in 5 ml Proteinase K-Puffer (0,01 M Tris / HCl, 0,005 M EDTA, 0,15 M NaCl, 0,5 % (w / v) SDS) aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µl Proteinase K wird die DNA, über Nacht rotierend, bei 50 °C inkubiert. Eventuell kontaminierende RNA wird durch 15 min Inkubation bei 37 °C mit 2 µl RNase A entfernt. Durch Zugabe von 5 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und 15 min Inkubation mit anschließender Zentrifugation bei 2 500 rpm kann die DNA-haltige, wässrige Phase isoliert werden. Diese wird anschließend für 15 min mit 5 ml Phenol versetzt und erneut abzentrifugiert. Die DNA kann nun mit 500 µl 3 M NaAc und 14 ml eiskaltem Ethanol aus der oberen wässrigen Phase präzipitiert werden. Die sichtbare DNA wird vorsichtig aus der Lösung entfernt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und zum Rücklösen 3 h in 1x TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei 42 °C geschüttelt.

#### *2.2.2.2. Quantitäts- und Qualitätsanalysen von Nukleinsäuren*

Alle RNA- und DNA-Proben wurden nach ihrer Isolation spektroskopisch analysiert, um ihre Konzentration zu bestimmen und ihre Reinheit zu überprüfen. Die UV-Spektren wurden mit einem Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer aufgenommen. Bei den Messungen fungierte der jeweilige Puffer als Referenz.

Die Integrität von DNA Molekülen wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. RNA-Proben wurden grundsätzlich auf dem Agilent 2100 Bioanalyser nach Herstellerangaben analysiert. Degradationserscheinungen konnten hierdurch detektiert werden und ermöglichten den Ausschluss degradierter Proben von weiteren Untersuchungen.

### 2.2.2.3. Genomanalysen

#### 2.2.2.3.1. Comparative Genome Hybridisation (CGH)

Die CGH dient der vergleichenden Analyse von Genomen. Durch dieses Verfahren ist es möglich, genomische Imbalancen zu identifizieren. Die CGH wurde in Kooperation mit Dr. Antoaneta Mincheva, Heidelberg, durchgeführt. Bei dieser Methode wird die DNA von zwei zu vergleichenden Genomen durch Restriktionsverdau fragmentiert und anschließend farblich markiert. Beide DNAs werden nun in Konkurrenz auf gespreitete, auf Objektträgern präparierte Metaphasen-Chromosomen hybridisiert (du Manoir *et al.*, 1993). In der vorliegenden Arbeit wird die DNA thymischer Lymphome aus *Atm-knock-out*-Mäusen mit der DNA des Thymus einer Wildtyp-Maus verglichen. Beide Proben werden auf Wildtypchromosomen aus der Mausleber hybridisiert.

#### 2.2.2.3.2. Array-based Comparative Genome Hybridisation (aCGH)

Bei der arraybasierenden vergleichenden Genomhybridisierung (aCGH) werden fragmentierte und farblich markierte Genome von zwei zu vergleichenden Proben auf immobilisierte Oligonukleotide hybridisiert. Die Oligonukleotide repräsentieren in bestimmten Abständen die Sequenzen des gesamten Genoms. So ist es möglich, mit einer ungleich höheren Auflösung gegenüber der klassischen CGH, Gewinne und Verluste von chromosomalem Material der zu vergleichenden Proben zu detektieren. Zur Analyse der Proben nach diesem Prinzip wurde auf das kommerziell verfügbare *Mouse Genome CGH Microarray Kit 244A* von Agilent Technologies zurückgegriffen. Die Proben wurden nach Herstellerangaben prozessiert.

Kurz beschrieben, werden die zu analysierenden, aufgereinigten genomischen DNAs zunächst mit den Restriktionsenzymen *Alu I* und *Rsa I* fragmentiert und mit Cy3- bzw. Cy5-dUTPs unter Einsatz des Klenow-Enzyms farblich markiert. Anschließend wird die markierte DNA auf 243 504 Oligonukleotide enthaltende Mikroarrays für 40 h bei 65 °C hybridisiert. Vor dem Scannen im DNA-Microarray-Scanner werden die hybridisierten und nach Herstellerprotokoll gewaschenen Arrays für 1 min in Acetonitril getaucht. Die vom Scanner erstellten Aufnahmen werden mit der *Feature Extraction Software* v9.1 extrahiert. Gleichzeitig können hierbei durch erste Analysen

Angaben über die Qualität der hybridisierten Mikroarrays gemacht werden. Für die weiteren Analysen wird die Software *CGH Analytics* v3.4.27 nach Herstellerangaben verwendet.

#### ***2.2.2.3.3. Multicolor Fluorescence in situ Hybridisation (M-FISH)***

In Kooperation mit Prof. Dr. Anna Jauch, Heidelberg wurden M-FISH-Studien an Lymphomzellen des Thymus der erkrankten *Atm-knock-out*-Mäuse durchgeführt. Durch die Hybridisierung eines mit unterschiedlichen Farben markierten SONDENSETS auf Metaphasenchromosome der Lymphomzellen können den einzelnen Chromosomen unterschiedliche Farben zugeordnet werden (Lengauer *et al.*, 1993). Große chromosomale Amplifikationen und Verluste, vor allem aber Translokationen, werden so sichtbar. Zur M-FISH-Analyse werden thymische Lymphome von erkrankten Mäusen präpariert und nach Vereinzeln der Zellen durch einen BD Cell Strainer in Interleukin 2-haltigem Zellkulturmedium kultiviert. Durch Zugabe von Colchicin werden die Zellen in der Metaphase des Zellzyklus arretiert und können nun zum Spreiten präpariert werden.

#### ***2.2.2.4. Microarray gestützte Genexpressionsanalysen***

Die genetische Information der DNA wird in RNA transkribiert. Die Menge an Transkript eines Gens gibt in der Regel Aufschluss darüber, in welchen Mengen ein jeweiliges Genprodukt in der Zelle benötigt wird. Mit Microarray gestützten Genexpressionsanalysen kann eine hohe Anzahl Transkripte in Geweben, Tumoren oder Zellpopulationen relativ quantifiziert werden. Dies bedeutet, dass das Expressionsmuster eines Gewebes mit dem einer Referenzprobe kompetitiv verglichen wird. Hierdurch lassen sich sowohl Aussagen zu Veränderungen in zellulären Regelwegen machen als auch die Ähnlichkeit z. B. verschiedener Tumorproben ermitteln.

##### ***2.2.2.4.1. Herstellung von Oligonukleotid-Microarrays***

Das *Mouse Genome Oligo Set Version 4.0* von Operon, Köln beinhaltet 35 912 verschiedene 70mer-Oligonukleotidsonden, welche ca 25 000 verschiedene Gene der Maus mit ca. 38 000 Transkripten repräsentieren. Die Sonden verfügen über

einen 5'-Aminolinker, worüber sie kovalent auf epoxysilanisierte Oberflächen gebunden werden können. Um eventuelle Quantifizierungsungenauigkeiten, welche z. B. durch ungewollte Syntheseabbrüche in der cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptasen entstehen können, zu mindern, befinden sich die Sonden möglichst nahe am 3'-Ende der jeweils zu analysierenden Transkripte.

Jeweils 600 pmol lyophilisierte Oligomere werden mit dem *Minitrak Liquid Handling* System in je 5 µl *Spotting*-Puffer aufgenommen, um in 384-Well-Platten eine 40 µM-Oligomer-Lösung für das Spotten der Microarrays bereitzustellen.

Die einzelnen Oligomerlösungen werden von einem Spottingroboter (*VersArray ChipWriter Pro System*) durch Kapillarnadeln auf die Epoxysilanoberflächen von Glas-Objektträgern (Schott Nexterion E) gebracht. Der Abstand der einzelnen Spots zueinander beträgt bei einem mittleren Spot-Durchmesser von 60 µm durchschnittlich 140 µm. Die fertig gespotteten Microarrays werden eine Stunde bei 80 °C getrocknet und bei 120 000 µJ / cm<sup>2</sup> in einem UV-*Crosslinker* bestrahlt. Bis zu ihrer Verwendung werden die Microarrays, in Folie eingeschweißt, trocken und kühl gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung werden die temperierten Microarrays der Folie entnommen und der Reihe nach jeweils für zwei Minuten in 0,2 % SDS (w/v), RT; ddH<sub>2</sub>O, RT; ddH<sub>2</sub>O, 95 °C; 100 % Ethanol gewaschen und mit Druckluft getrocknet (Schlingemann *et al.*, 2005).

#### 2.2.2.4.2. Probenamplifikation und -hybridisierung

Bei den für die Genexpressionsanalysen mittels Microarray vorgesehenen RNA-Proben handelt es sich zum Teil um in nur äußerst geringen Mengen verfügbares Material. Deshalb werden sowohl die isolierte Proben- als auch die Referenz-RNA nach einem auf Baugh *et al.* (Baugh *et al.*, 2001) basierenden, weiterentwickelten Protokoll, dem sogenannten TACKLE-Protokoll (Schlingemann *et al.*, 2005), amplifiziert und mit Fluorophoren markiert. Die hierbei generierten fluorophormarkierten *antisense*-cDNA-Stränge können dann auf die jeweils komplementären, immobilisierten *sense*-Oligonukleotid-Sonden hybridisieren. Als Fluorochrome werden Cy3- und Cy5-Farbstoffe verwendet. Zur Hybridisierungsreaktion werden die amplifizierten und fluorophormarkierten Proben sowie die amplifizierte, fluorophormarkierte Referenzprobe im *dye-swap*-Verfahren kompetitiv eingesetzt und mit 120 µl UltraHyb-Hybridisierungspuffer bei 50 °C gelöst.



Die Hybridisierung bei 42 °C dauert bei gleichmäßiger Bewegung der Hybridisierungslösung in der verwendeten GeneTAC-Hybridisierungsstation 24 h. Nach den sich anschließenden automatischen Waschschritten bei 36 °C mit den Waschpuffern I (0,5 x SSC, 0,1 % (w / v) SDS) für 5 min, II (0,05 x SSC, 0,1 % (w / v) SDS) für 3 min und III (0,05 % (w / v) SSC) für 2 min werden die Microarrays manuell für eine Minute in Waschpuffer IV (0,05 x SSC (w / v), 0,05 % (v / v) Tween 20) gewaschen und in einer Varifuge 3.0 für eine Minute bei 2 000 rpm getrocknet.

#### **2.2.2.4.3. Scannen der Microarrays und Datenvorverarbeitung**

Die fertig hybridisierten und gewaschenen Microarrays werden in einem DNA Microarray Scanner analysiert. Die von der Scanner-Software erstellten TIFF Bilder werden gedreht und gespiegelt, um von der GenePix Software Version 5.0 zur weiteren Analyse eingelesen werden zu können. Mit dieser Software können auch die einzelnen Probensignale über ein zuvor berechnetes Raster den entsprechenden Sonden zugeordnet werden. Danach werden die kombinierten Bild- und Sondeninformationen ausgewertet und in einer Ergebnis-Datei zusammengefasst. Diese Datei wird in der von Grischa Tödt (DKFZ, Heidelberg) entwickelten Microarrayprozessierungs-Plattform ChipYard weiter verarbeitet. Neben verschiedenen Überprüfungen zur Qualitätssicherung werden die Rohdaten nach einem Algorithmus von Wolfgang Huber (DKFZ, Heidelberg) normalisiert und varianzstabilisiert (Huber *et al.*, 2002), um intensitätsbedingte Schwankungen der Varianzen auszugleichen.

#### **2.2.2.5. Bioinformatrische Auswertung**

Die Genom- sowie die Expressionsanalyse mit Microarray gestützten Methoden resultiert in einer extrem großen Datenmenge, die zur Auswertung den Einsatz bioinformatrischer und statistischer Strategien unabdingbar macht. Bei der Expressionsanalyse wurden die in der unter **2.2.2.4.3** beschriebenen, durch Vorverarbeitung varianzstabilisierten Datensätze unter anderem mit Wiebke Werft, Axel Benner und Dr. Benedikt Brors, DKFZ, Heidelberg mit Hilfe der statistischen Softwareplattform R, Version 2.3.0 weitergehend analysiert. Zur Bestimmung differenziell exprimierter Gene zwischen zwei oder mehreren definierten

Probengruppen wurden zum einen lineare Modelle unter Anwendung von Limma (*linear models for microarray data*) erzeugt (Smyth *et al.*, 2003; Smyth 2005), zum anderen wurden sie durch multiples Testen bestimmt (Dudoit *et al.*, 2004; van der Laan *et al.*, 2004). Den Clusteranalysen und den daraus folgenden *heatmaps* sowie den *geneplots* liegt ein sogenannter Globaltest oder aber eine SAM-Analyse zugrunde (Goeman *et al.*, 2004). Die Identifizierung verlaufsabhängiger Expressionsänderungen wurde durch eine *cutpoint*-Analyse mit adjustierten p-Werten durchgeführt (Hothorn 2003).

#### 2.2.2.6. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Zu sequenzierende RNA-Transkripte werden durch eine reverse Transkription zunächst in cDNA umgeschrieben. Das interessierende DNA-Fragment wird anschließend mit einem dafür geeigneten Primersystem in einer entsprechenden PCR amplifiziert, auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und mit einem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben isoliert. Danach werden je Reaktion 3 pmol Sequenzierungsprimer sowie 60-300 ng der zu sequenzierenden DNA mit dem PRISM *Big DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach der Abbruch-Amplifikations-Reaktion mit initialer Denaturierung (95 °C, 2 min) und 25 Amplifikationszyklen (je 95 °C, 5 s; 55 °C, 10 s; 60 °C, 4 min) werden die Proben mit Ethanol / Natrium-Acetat gefällt, in 12 µl Formamid aufgenommen und zur Analyse in einen ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer verbracht. Kommerzielle Sequenzierungen erfolgten durch die Firmen Sequiserv, München bzw. 4baselab, Reutlingen.

#### 2.2.2.7. Bestimmung der Tumorklonalität

Die Untersuchung der klonalen Herkunft eines T-Zell-Tumors erfolgte auf der Grundlage, dass T-Zellen im gesunden Organismus ein großes Repertoire verschiedener T-Zell-Rezeptoren besitzen (siehe auch 1.1.3). Wenn nur eine einzelne oder wenige T-Zellen für die Tumorbildung verantwortlich sind, ist dieses Repertoire eingeschränkt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Repertoire des T-

Zell-Rezeptors  $\beta$  für Klonalitätsuntersuchungen herangezogen. Das T-Zell-System der gesunden Maus verfügt über ein Repertoire von 20 variablen T-Zell-Rezeptor-Regionen, die mit einer konstanten Region rekombiniert werden können. Die unterschiedlichen T-Zell-Rezeptorsequenzen können mit spezifisch konstruierten Primersystemen in einer PCR amplifiziert, im Agarosegel sichtbar gemacht und somit bestimmt werden. Als *Template* fungiert cDNA, die aus RNA von Thymus- oder Milzzellen gewonnen wird. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der einzelnen, mit der konstanten Region rekombinierten variablen Regionen kann in der Folge Aufschluss über die Klonalität eines T-Zell-Tumors liefern. Der PCR-Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v / v) Triton X-100, 0,2 mM je dNTP, 1 U *Taq* DNA-Polymerase, 3,5  $\mu$ M Constant- $\beta$ -Primer, 1  $\mu$ l cDNA sowie jeweils 3,5  $\mu$ M eines TcrbV-Primers. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 2 min 94 °C, 40 Zyklen 30 s 94 °C, 45 s 60 °C, 60 s 72 °C und abschließend 10 min 72 °C. Die zu erwarteten Produktlängen liegen bei 188 bis 256 bp (Pannetier *et al.*, 1993).



### 3. Ergebnisse

In lymphatischen Neoplasien wie dem Mantelzell-Lymphom kann sowohl die Überexpression des Gens *CCND1* als auch die Inaktivierung des Gens *ATM* beobachtet werden. Durch die Etablierung eines Mausmodells sowie zytometrische und molekulargenetische Analysen der aus den Tieren gewonnenen Lymphozyten wurde der Einfluss genetischer Aberrationen der Gene *Atm* und *Ccnd1* auf die Pathogenese von Lymphomen untersucht.

Das nachfolgende Kapitel präsentiert die Ergebnisse dieser Arbeit. Die Transplantationsstudie wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Stefan Bohlander und PD Dr. Christian Buske im Hämatologikum der Gesellschaft für Strahlenforschung (GSF), München durchgeführt. Die CGH-Studien erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Antoaneta Mincheva, DKFZ, Heidelberg, M-FISH-Experimente in Kooperation mit Prof. Dr. Anna Jauch, Universität Heidelberg.

#### 3.1. Mausmodelle des Mantelzell-Lymphoms

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) ist durch distinkte genetische Aberrationen gekennzeichnet. Einerseits führt die Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  zur Überexpression des *Cyclin D1*-Gens, andererseits ist das *ATM*-Gen durch Punktmutationen oder Deletion inaktiviert (siehe auch Kapitel 1.2.2). Um ein murines Modellsystem des MCLs zu konzipieren, erscheint es naheliegend, diese molekulargenetische Situation in der Maus nachzubilden. Ziel dieses Teils der Arbeit war es deshalb, durch die Kombination von *Atm*-Defizienz und *Cyclin D1*-Überexpression ein Modellsystem für das Mantelzell-Lymphom in der Maus zu generieren. Das Modell sollte dazu dienen, Erkenntnisse über den Mechanismus der Pathogenese des Lymphoms zu gewinnen sowie das initiale Ereignis in der Tumorgenese zu klären.

Zwei verschiedene Strategien wurden verfolgt, um die zu untersuchenden *Atm*- bzw. *Cyclin D1*-Mutationen miteinander zu kombinieren. Zum einen erfolgte die Kombination durch Kreuzung eines *Atm*-knock-out-Mausstamms mit einem *Cyclin D1*-transgenen Stamm (3.1.1). Zum anderen wurde das *Cyclin D1*-Gen über retrovirale Infektion in *Atm*-knock-out-Knochenmarkzellen gebracht und anschließend

in letal bestrahlte Wildtypmäuse transplantiert. Dieser Ansatz wurde verfolgt, um das gesamte hämatopoetische System mit den die gewünschten Mutationen enthaltenden Zellen zu rekonstituieren (**3.1.2**), die übrigen Körpergewebe jedoch, ähnlich der Situation im MCL-Patienten, in Wildtyp-Konstitution beizubehalten.

### **3.1.1. KREUZUNG VON *ATM-KNOCK-OUT* UND *Ccnd1* TRANSGENEN MAUSSTÄMMEN**

Um die im Mantellzell-Lymphom beobachteten genetischen Veränderungen, *ATM*-Defizienz und *Cyclin D1*-Überexpression, in einem Maussystem nachzuvollziehen, wurden in diesem Ansatz zwei entsprechende Mausstämmen gekreuzt. Es handelte sich hierbei um einen *Cyclin D1* transgenen Mausstamm (Alan Harris, Melbourne, Australien) und einen *Atm-knock-out*-Mausstamm (Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA). Alle sechs möglichen Genotypen (siehe **3.1.1.1**) wurden durch Kreuzung erzeugt, immunophänotypisiert und hinsichtlich etwaiger Neoplasien beobachtet.

#### **3.1.1.1. Züchtung der Mausstämmen**

Aufgrund der Sterilität von homozygoten *Atm-knock-out*-Mäusen ( $Atm^{-/-}$ ) konnten homozygote Tiere mit eingekreuztem *Cyclin D1*-Transgen nur über ein zwei Generationen umfassendes Zuchtschema generiert werden. Es wurden hierzu ausschließlich für *Atm* heterozygote Tiere ( $Atm^{+/-} / Ccnd1^{Wildtyp}$  oder  $Atm^{+/-} / Ccnd1^{Transgen}$ ) miteinander verpaart. Auf diese Weise konnten die Genotypen  $Atm^{-/-} / Ccnd1^{Transgen}$ ,  $Atm^{+/-} / Ccnd1^{Transgen}$ ,  $Atm^{+/+} / Ccnd1^{Transgen}$ ,  $Atm^{-/-} / Ccnd1^{Wildtyp}$ ,  $Atm^{+/-} / Ccnd1^{Wildtyp}$  sowie  $Atm^{+/+} / Ccnd1^{Wildtyp}$  erfolgreich gezüchtet werden.

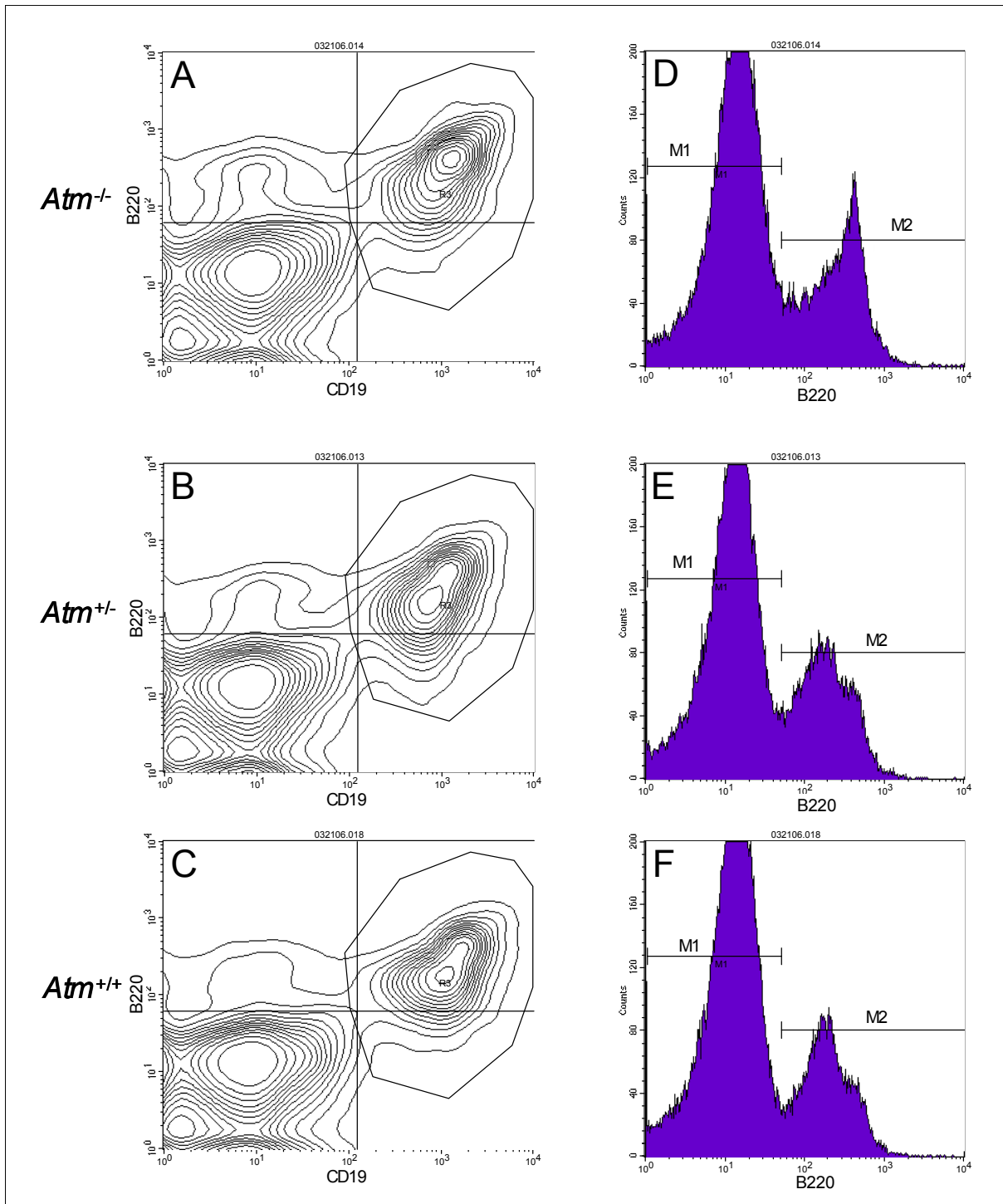
#### **3.1.1.2. Immunophänotypische Charakterisierung**

Um etwaige, durch die Kombination der eingeführten Mutationen ( $Atm^{-/-}$  und  $Ccnd1^{Transgen}$ ) hervorgerufene Veränderungen im hämatopoetischen System zu identifizieren, wurden speziell Knochenmark, Milz und Thymus der Mäuse aller kreuzungstechnisch möglichen Genotypen im Alter von 8, 12 und 16 Wochen Individuen präpariert und analysiert. Aus den Organen gewonnene separierte Zellen wurden nach kombinierten Antikörperfärbungen der Epitope B220, Mac1, Gr1,

Ter119, CD19, IgM, Igk<sup>lightChain</sup>, CD4, CD8, cKit, Sca1, Tcr $\beta$ , CD43, CD44, CD22, BP1 durchflusszytometrisch in einem FACS-Analyser untersucht. Unterschiedliche, bisher unbekannte Phänotypen konnten so identifiziert werden.

### 3.1.1.2.1. B-Zell-Phänotypen in Abhängigkeit von *Atm*

Da zu Beginn dieser Arbeit in der internationalen Fachliteratur nahezu keinerlei Erkenntnisse zum Einfluss einer *Atm*-Defizienz auf die Entwicklung von B-Zellen vorlagen, sollte die Auswirkung dieser Mutation auf die B-Lymphopoese vorab gesondert untersucht werden. Für diese Analyse wurde das Knochenmark von 8 Wochen alten Mäusen präpariert und anschließend mit Antikörpern (siehe **3.1.1.2**) gegen unterschiedliche Epitope gefärbt (siehe **2.2.1.11.1**). Erste immunologische Untersuchungen mittels durchflusszytometrischer Analyse von B220- und CD19-gefärbten Zellen wiesen bereits auf Veränderungen von B-Vorläuferzellen hin (**Abbildung 10**): Bei den Markern CD19 und B220 handelt es sich nämlich um Oberflächenproteine, die zusammen spezifisch nur auf B-Zell-Oberflächen exprimiert werden. Durch eine gemeinsame Analyse dieser beiden Oberflächenmarker können also alle B-Zell-Populationen des Knochenmarks und der Peripherie erfasst werden. Das Knochenmark gesunder Kontrollmäuse (*Atm*<sup>+/+</sup>) besaß eine B220- und CD19-negative Zellpopulation, die in ähnlicher Größe auch in den anderen Genotypen detektiert werden konnte. Des Weiteren ließ sich im Knochenmark von Wildtypieren eine große B220- und CD19-positive Population sowie eine kleine für B220-hochpositive und CD19-positive nachweisen. Letztere, relativ kleine Population (rechte Schulter der Population M2 in **Abbildung 10F**) konnte in weiteren Analysen als IgM-positiv bestimmt werden. In der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark sind es die Zellen dieser Population, die in ihrer Entwicklung am weitesten fortgeschritten sind. Sie verlassen für den Eintritt in das nächste Entwicklungsstadium das Knochenmark und siedeln sich in der Peripherie an. In *Atm*-heterozygoten Mäusen zeigte sich, dass die B220- und CD19-positive Fraktion leicht in ihrer Größe reduziert war, während die B220-hochpositive und CD19-positive Zellpopulation vergrößert war. Im Knochenmark *Atm*-defizienter Mäuse kehrte sich das Verhältnis bezogen auf den Wildtyp um: Während die B220-hochpositive und CD19-positive sowie IgM exprimierende Population überwog,

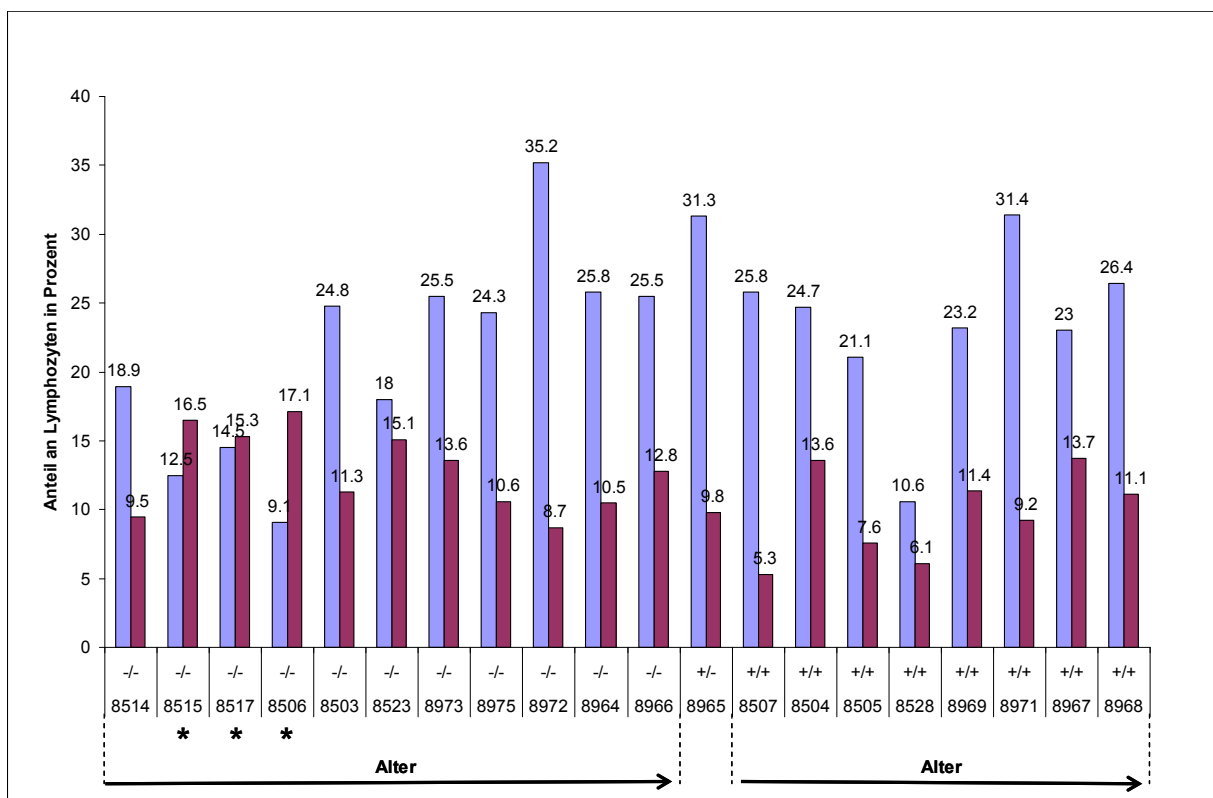


**Abbildung 10: FACS-Analyse der Knochenmarkszellen verschiedener *Atm*-Genotypen.** Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks jeweils einer Maus mit dem Genotyp *Atm*<sup>-/-</sup> (A, D), *Atm*<sup>+/-</sup> (B, E) und *Atm*<sup>+/+</sup> (C, F). Knochenmarkszellen wurden mit jeweils einem Antikörper gegen B220 und CD19 inkubiert. In A, B, C ist auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität B220-markierter, auf der x-Achse CD19-markierter Zellen aufgetragen. In D, E, F ist auf der y-Achse die Zellzahl, auf der x-Achse die Expressionintensität von B220 aufgetragen. Die Populationen B220<sup>low</sup> und B220<sup>high</sup> sind entsprechend mit M1 und M2 gekennzeichnet.



konnte die B220- und CD19-positive und IgM-negative Population kaum noch nachgewiesen werden.

Die Ausweitung dieser Untersuchungen auf weitere 20 Mäuse konnte die Hypothese, es handle sich hier um einen neuen, *Atm*-abhängigen Immunophänotyp, nicht bestätigen. Insgesamt zeigten nur 3 (Mausnummer 8515, 8517 und 8506) der 11 *Atm*-defizienten Mäuse eine Verschiebung B220-positiver hin zu B220-hochpositiven Zellen (**Abbildung 11**). Auch durch eine Korrelation mit dem Alter der Versuchsmäuse war das beobachtete Phänomen nicht zu erklären, da eine der mit 105 Tagen ältesten Mäuse (Mausnummer 8514) in der Versuchsreihe hinsichtlich der untersuchten B-Zell-Populationsaufteilung Wildtypcharakter aufwies. Allerdings konnte die Beobachtung einer vollständigen Umkehrung des Verhältnisses der



**Abbildung 11: FACS-Analyse B220-gefärbter Knochenmarkszellen verschiedener *Atm*-Genotypen.** Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks von 20 Mäusen unterschiedlichen Alters und Genotyps nach Antikörperfärbung gegen B220. In blau ist der Anteil an B220-positiven, in rot an B220-hochpositiven B-Zellen an der Gesamtpopulation der Lymphozyten aufgetragen. Der Genotyp wurde in Bezug auf das *Atm*-Gen als +/+ für Wildtyp, +/- für heterozygot und -/- für homozygot defizient angegeben und mit der individuellen Versuchs-Mausnummer versehen. Mäuse, die einen vergrößerten Thymus aufwiesen, sind mit \* gekennzeichnet. Das Alter innerhalb eines Genotyps ist von links nach rechts abnehmend dargestellt.

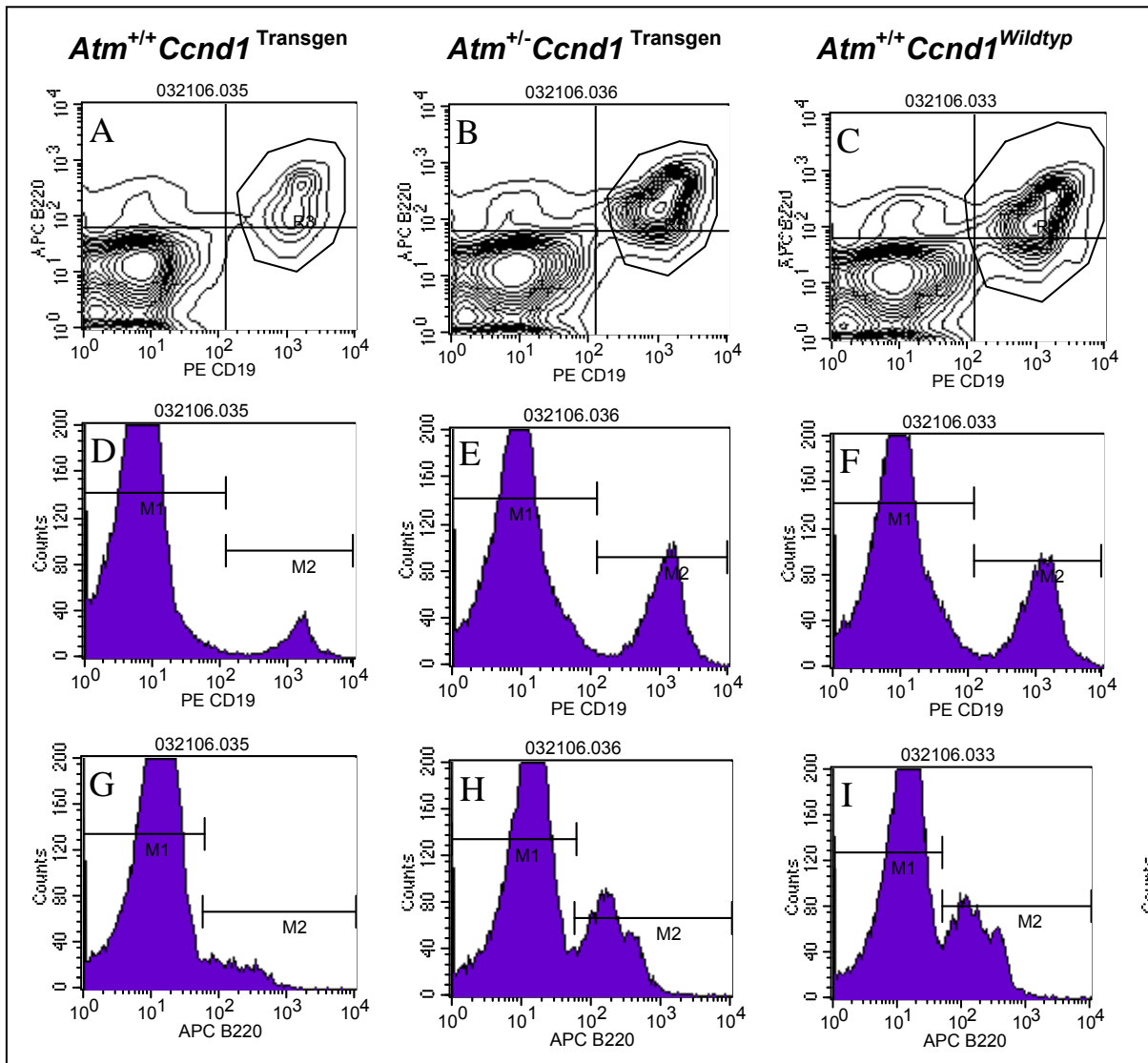
beiden B-Zell-Populationen nur bei einer 89 Tage alten *Atm*-defizienten Maus gemacht werden (Mausnummer 8506). Diese wies darüber hinaus bei der Sektion ein ausgeprägtes thymisches Lymphom auf. Darauf basierend ergab sich die Vermutung, dass der beobachtete Immunophänotyp womöglich mit dem Auftreten dieses für *Atm*-defiziente Mäuse bekannten und im Kapitel 1.4 beschriebenen Lymphoms einhergeht. Unterstützt wurde diese Vermutung dadurch, dass zwei weitere Mäuse, die eine deutliche Verschiebung im Verhältnis der B220- und CD19-positiven und der B220- hochpositiven Populationen zeigten, bei der Sektion stark vergrößerte Thymi aufwiesen. Allerdings füllten diese noch nicht, wie die in Abschnitt 3.1.1.3 beschriebenen Fälle, den gesamten Brustkorb aus.

Sämtliche hier dargestellten Ergebnisse immunophänotypischer Untersuchungen belegen Veränderungen in B-Zellen, die offensichtlich allein auf die Inaktivierung des murinen *Atm*-Gens zurückzuführen sind. Die Analyse des zusätzlichen Einflusses von transgenem, überexprimiertem *Cyclin D1* auf B-Zellen *Atm*-defizienter Mäuse wird im nachfolgenden Kapitel 3.1.1.2.2 dargestellt.

### 3.1.1.2.2. B-Zell-Phänotypen in Abhängigkeit von *Atm* und *Cyclin D1*

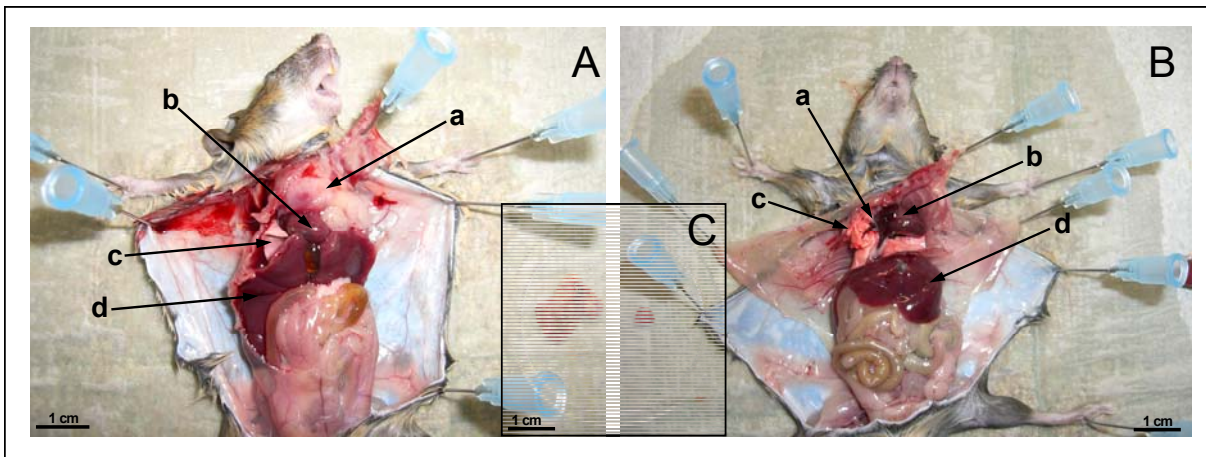
Das folgende Kapitel stellt die Veränderungen in B-Zellen von Mäusen dar, die aus einer Kombination von *Atm*-Defizienz und *Cyclin D1*-Überexpression hervorgingen. Durch vorhergehende unabhängige Studien ist aus der Literatur bereits bekannt, dass B-Zellen *Cyclin D1*-transgener Mäuse (*Atm*<sup>+/+</sup> / *Ccnd1*<sup>Transgen</sup>) in ihrer Entwicklung im Knochenmark Veränderungen aufweisen. Genauer gesagt sind unter den Knochenmarkszellen dieser Tiere nahezu keine B220- und CD19-positiven Zellen zu finden. In der Peripherie dieser Mäuse zeigten sich hingegen keinerlei B-Zell-Veränderungen (Bodrug *et al.*, 1994). Eine Erklärung für dieses Phänomen steht bis heute aus.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen bestätigten die geschilderten Beobachtungen bezüglich Veränderungen im Knochenmark der *Cyclin D1*-transgenen Mäuse (**Abbildung 12**). Wie in **Abbildung 12 A, D, und G** dargestellt, zeigt die Färbung von Knochenmarkszellen der *Atm*<sup>+/+</sup> / *Ccnd1*<sup>Transgen</sup>-Tiere mit B220- und CD19-spezifischen Antikörpern den weitgehenden Verlust der diese Marker exprimierenden Zellen.



**Abbildung 12: FACS Analyse von B-Zellen des Knochenmarks *Ccnd1* transgener bzw. *Ccnd1* transgener und *Atm* heterozygoter sowie Wildtyp-Tiere.** Durchflusszytometrische-Analyse des Knochenmarks einer *Atm*<sup>+/+</sup> *Ccnd1*<sup>Transgen</sup>- (A, D, G), einer *Atm*<sup>+/-</sup> *Ccnd1*<sup>Transgen</sup> - (B, E, H) und einer *Atm*<sup>+/+</sup> *Ccnd1*<sup>Wildtyp</sup> Maus (C, F, I) nach Antikörperfärbungen gegen die B-Zell-Marker B220 und Cd19. In A, B und C sind die B220 markierten Zellen auf der y-, CD19 markierte Zellen auf der x-Achse aufgetragen. In D-I sind auf der y-Achse jeweils die Zellzahlen, auf der x-Achse in D-F die Expression von Cd19 und in G-I die Expression von B220 aufgetragen. Die ungefärbten jeweils negativen Populationen sind mit M1, die gefärbten, positiven Populationen mit M2 gekennzeichnet.

In Mäusen, die über das *Cyclin D1*-Transgen hinaus zudem inaktivierende Veränderungen in einem Allel des *Atm*-Gens aufwiesen, zeigten sich jedoch Abweichungen von dem oben beschriebenen Phänomen (**Abbildung 12 B, E, H**). Sowohl in *Cyclin D1*-transgenen, *Atm*-heterozygoten Mäusen (*Atm*<sup>+/-</sup> / *Ccnd1*<sup>Transgen</sup>) (**Abbildung 12 B, E, H**) als auch in transgenen Tieren vom *Atm*-defizienten Genotyp (*Atm*<sup>-/-</sup> / *Ccnd1*<sup>Transgen</sup>) konnte eine dem Wildtyp (**Abbildung 12 C, F, I**) ähnliche Verteilung der untersuchten B-Zell-Populationen beobachtet werden. Zur Untersuchung der B-Zellen in der Peripherie wurden auch Milz und Lymphknoten der



**Abbildung 13: Fotografische Darstellung von Mausektionen.** In **A** ist eine präparativ eröffnete Maus des Genotyps  $Atm^{-/-}$  im Alter von 14 Wochen zu sehen. **B** zeigt einen gleichsam eröffneten Wildtyp Geschwister gleichen Alters. Die mit Buchstaben versehenen Pfeile kennzeichnen die jeweiligen Organe. a: Thymus, b: Herz, c: Lunge, d: Leber. In **C** ist ein direkter Größenvergleich der beiden isolierten Thymi dargestellt, links der  $Atm^{-/-}$ -Thymus aus **A**, rechts der Wildtyp-Thymus aus **B**.

Mäuse präpariert und entsprechend prozessiert. In den gewonnenen B-Zellen konnten jedoch keinerlei Veränderungen gegenüber korrespondierender Wildtypzellpräparationen ( $Atm^{+/+} / Ccnd1^{Wildtyp}$ ) beobachtet werden.

Die hier gezeigten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass bereits durch die Inaktivierung lediglich eines  $Atm$ -Allels der für  $Ccnd1$ -transgene Tiere typische Verlust an B-Zellen im Knochenmark aufgehoben wurde.

### 3.1.1.3. Hämatologische Neoplasien in $Atm$ -knock-out-Mäusen – Thymische Lymphome

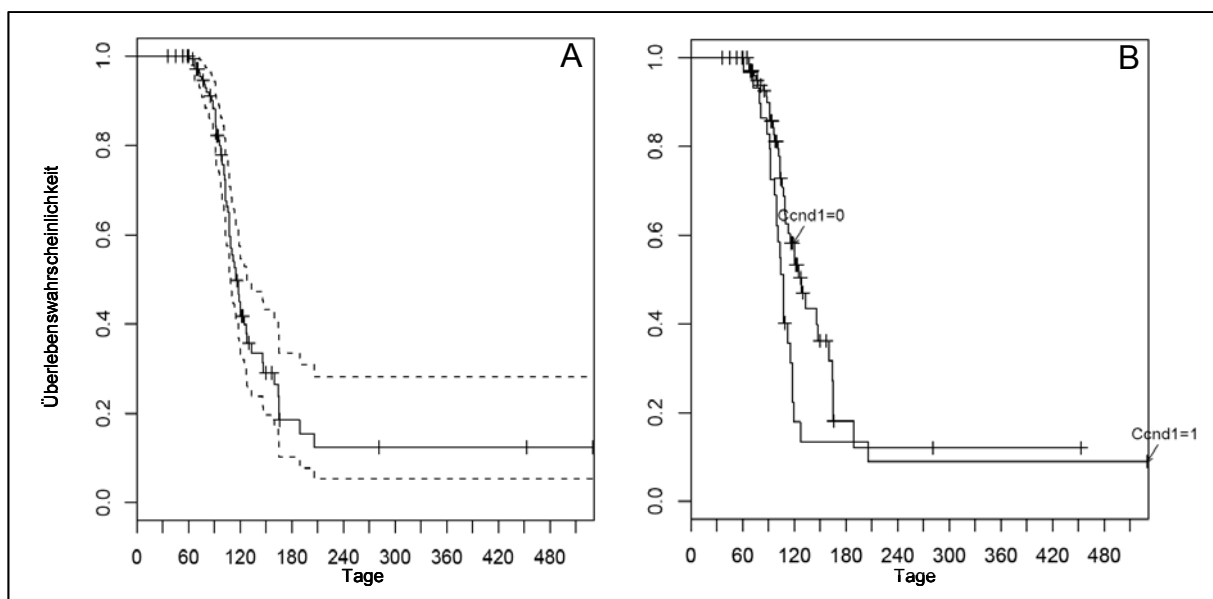
Die züchterisch erzeugten Genotypen  $Atm^{-/-} / Ccnd1^{Transgen}$ ,  $Atm^{+/-} / Ccnd1^{Transgen}$ ,  $Atm^{+/+} / Ccnd1^{Transgen}$ ,  $Atm^{-/-} / Ccnd1^{Wildtyp}$ ,  $Atm^{+/-} / Ccnd1^{Wildtyp}$  sowie  $Atm^{+/+} / Ccnd1^{Wildtyp}$  wurden auch hinsichtlich der Entwicklung hämatologischer und nichthämatologischer Neoplasien beobachtet.

Es zeigte sich, dass alle Mäuse der Genotypen  $Atm^{-/-} / Ccnd1^{Transgen}$  und  $Atm^{-/-} / Ccnd1^{Wildtyp}$  im Alter von 12 bis 24 Wochen nach 5-7 Tagen Apathie und Hyperventilation starben. Die Sektion mit anschließender immunologischer Untersuchung ergab, dass die Mäuse thymische Lymphome entwickelt hatten, die den gesamten Thorax ausfüllten sowie Herz und Lunge dislozierten (**Abbildung 13**). Vermutlich führte dies zum Tod durch Ersticken. Die thymischen Lymphome dieser Genotypen zeigten immunologisch keinerlei Differenzen zu den in Kapitel 1.4

beschriebenen Lymphomen der *Atm-knock-out*-Maus (Bodrug *et al.*, 1994). Keines der beobachteten Individuen (n=198) entwickelte abweichende Neoplasien. Auch die anderen, hier untersuchten Genotypen entwickelten weder thymische Lymphome noch andere Neoplasien (n=1171).

### 3.1.1.4. Analyse der Überlebenszeiten

Wie in Abschnitt 3.1.1.3 beschrieben sterben sowohl *Atm*<sup>-/-</sup> / *Ccnd1*<sup>Transgen</sup>- und *Atm*<sup>-/-</sup> / *Ccnd1*<sup>Wildtyp</sup>-Mäuse frühzeitig und ausschließlich an thymischen Lymphomen. Um einen eventuellen Einfluß des *Cyclin D1*-Transgens auf das Überleben der *Atm*-defizienten Mäuse zu überprüfen, wurden die Überlebenszeiten der Tiere dokumentiert und miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 14** als Kaplan-Meier-Diagramm dargestellt. Insgesamt wurden 139 Mäuse der Genotypen *Atm*<sup>-/-</sup> / *Ccnd1*<sup>Transgen</sup> und *Atm*<sup>-/-</sup> / *Ccnd1*<sup>Wildtyp</sup> analysiert. **Abbildung 14A** zeigt eine Analyse ohne Berücksichtigung des *Cyclin D1*-Transgens. Das mediane Überleben



**Abbildung 14: Kaplan-Meier-Diagramme der Überlebenswahrscheinlichkeit von *Atm*<sup>-/-</sup> Mäusen.** In **A** ist die Lebensdauer von 139 Mäusen der Genotypen *Atm*<sup>-/-</sup>/*Ccnd1*<sup>Wildtyp</sup> und *Atm*<sup>-/-</sup>/*Ccnd1*<sup>Transgen</sup> zusammengefasst. Die gestrichelten Linien bezeichnen das Konfidenzintervall. In **B** ist das Überleben in Abhängigkeit des *Cyclin D1*-Gens dargestellt. *Ccnd1*=1 bezeichnet das Vorhandensein des *Cyclin D1* Transgens, *Ccnd1*=0 zeigt den *Cyclin D1* Wildtyp. Alle in der Analyse dargestellten Mäuse sind *Atm*-defizient. Analysiert wurden 30 *Atm*<sup>-/-</sup>/*Ccnd1*<sup>Transgen</sup> und 119 *Atm*<sup>-/-</sup>/*Ccnd1*<sup>Wildtyp</sup>. Für alle anderen Genotypen betrug die Überlebenswahrscheinlichkeit im beobachteten Zeitraum 1,0. Sie wurden deshalb nicht dargestellt.

der untersuchten Tiere lag bei 115 Tagen. Bei der in **Abbildung 14B** dargestellten Analyse wurde das Überleben mit Bezug auf die Expression des *Cyclin D1*-Transgens berechnet. Das mediane Überleben *Atm*-defizienter Mäusen mit *Cyclin D1*-Transgen betrug 107 Tage, ohne Transgen waren es 128 Tage. Im beobachteten Zeitraum lag die Überlebenswahrscheinlichkeit der Genotypen *Atm*<sup>+/-</sup> / *Ccnd1*<sup>Transgen</sup>, *Atm*<sup>+/+</sup> / *Ccnd1*<sup>Transgen</sup>, *Atm*<sup>+/-</sup> / *Ccnd1*<sup>Wildtyp</sup> sowie *Atm*<sup>+/+</sup> / *Ccnd1*<sup>Wildtyp</sup> bei 1,0 (nicht dargestellt).

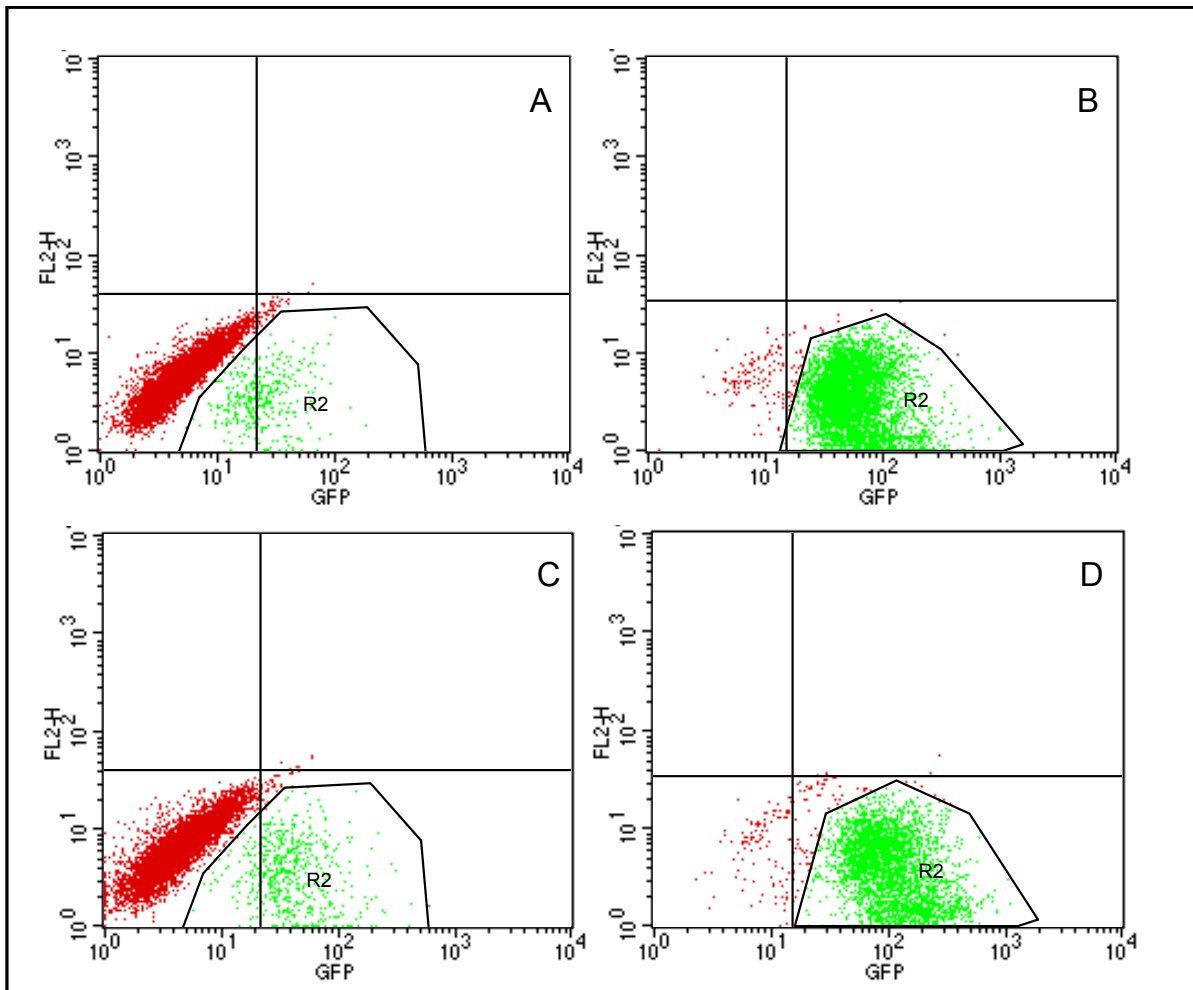
Die Analyse der Überlebenszeiten der an thymischen Lymphomen verstorbenen, homozygot *Atm*-defizienten Mäuse lässt als Schlussfolgerung zu, dass die Anwesenheit des *Cyclin D1*-Transgens keinen Einfluss auf die Überlebenszeit nimmt. Abschließend kann festgestellt werden, dass es in keinem der beobachteten Tiere durch die Kombination von *Atm*-Defizienz und *Cyclin D1*-Transgen zur Entwicklung eines Mantelzell-Lymphoms gekommen ist.

### 3.1.2. KNOCHENMARKSTRANSPLANTATIONSMODELL ZUR KOMBINATION VON *ATM KNOCK OUT* UND *Ccnd1* ÜBEREXPRESSION

Die weitere Untersuchung des Einflusses der Gene *Atm* und *Cyclin D1* auf das hämatopoetische System erfolgte unter Verwendung des in Kapitel 2.2.1.8 beschriebenen und in **Abbildung 8** dargestellten Transplantationsmodells. *Atm*-defiziente Knochenmarksstammzellen wurden hierzu mit *Cyclin D1*-rekombinantem MSCV-Virus infiziert und anschließend in letal bestrahlte Wildtyp-Empfängermäuse transplantiert. Sämtliche Transplantationsversuche wurden im Hämatologikum der GSF in München durchgeführt.

#### 3.1.2.1. Rekombinante MSCV-Retroviren als Vektoren zur kombinierten Expression von *Cyclin D1* und GFP

Für die Transplantationsexperimente mit retroviral infiziertem Knochenmark wurde das Gen *Cyclin D1* in den in Kapitel 2.2.1.8.1 beschriebenen MSCV-Vektor kloniert und die gewünschte DNA-Sequenzidentität durch Sequenzierung verifiziert. Sowohl der ausschließlich das *GFP*-Gen enthaltende Kontrollvektor (MIG), als auch der das *Cyclin D1*-Gen kodierende MSCV-Vektor (Ccnd1-MSCV) (vergleiche **Abbildung 9**) wurden durch Kotransfektion mit dem die Kapsidproteine kodierenden Ecopak-Vektor in 293T-Zellen in Viruskapside verpackt (siehe Kapitel 2.2.1.8.2). Die aus 293T-Zellen freigesetzten rekombinanten Viren wurden anschließend zur Infektion von E86 GP<sup>+</sup>-Zellen benutzt. Da sowohl der Kontrollvektor als auch der das *Cyclin D1*-Gen enthaltende Vektor GFP kodieren, konnten die erfolgreich infizierten Zellen nach zwei Tagen durchflusszytometrisch anhand ihres Fluoreszenzverhaltens identifiziert und isoliert werden (**Abbildung 15**). Der Anteil fluoreszierender Zellen lag bei 4,95 % für Ccnd1-MSCV infizierte E86 GP<sup>+</sup>-Zellen (**Abbildung 15A**) und bei 7,03 % für MIG infizierte Zellen (**Abbildung 15C**). Nach weiterer einwöchiger Kultur der isolierten, fluoreszierenden Zellen wurden aus den nunmehr 97,03 % (Ccnd1-MSCV) (**Abbildung 15B**) bzw. 94,59 % (MIG) (**Abbildung 15D**) fluoreszierende Zellen enthaltenden Zellpopulationen einzelne Zellen durchflusszytometrisch sortiert und zu einzelnen Zellklonen herangezogen. Bei einer Konfluenz von 90 % wurden die

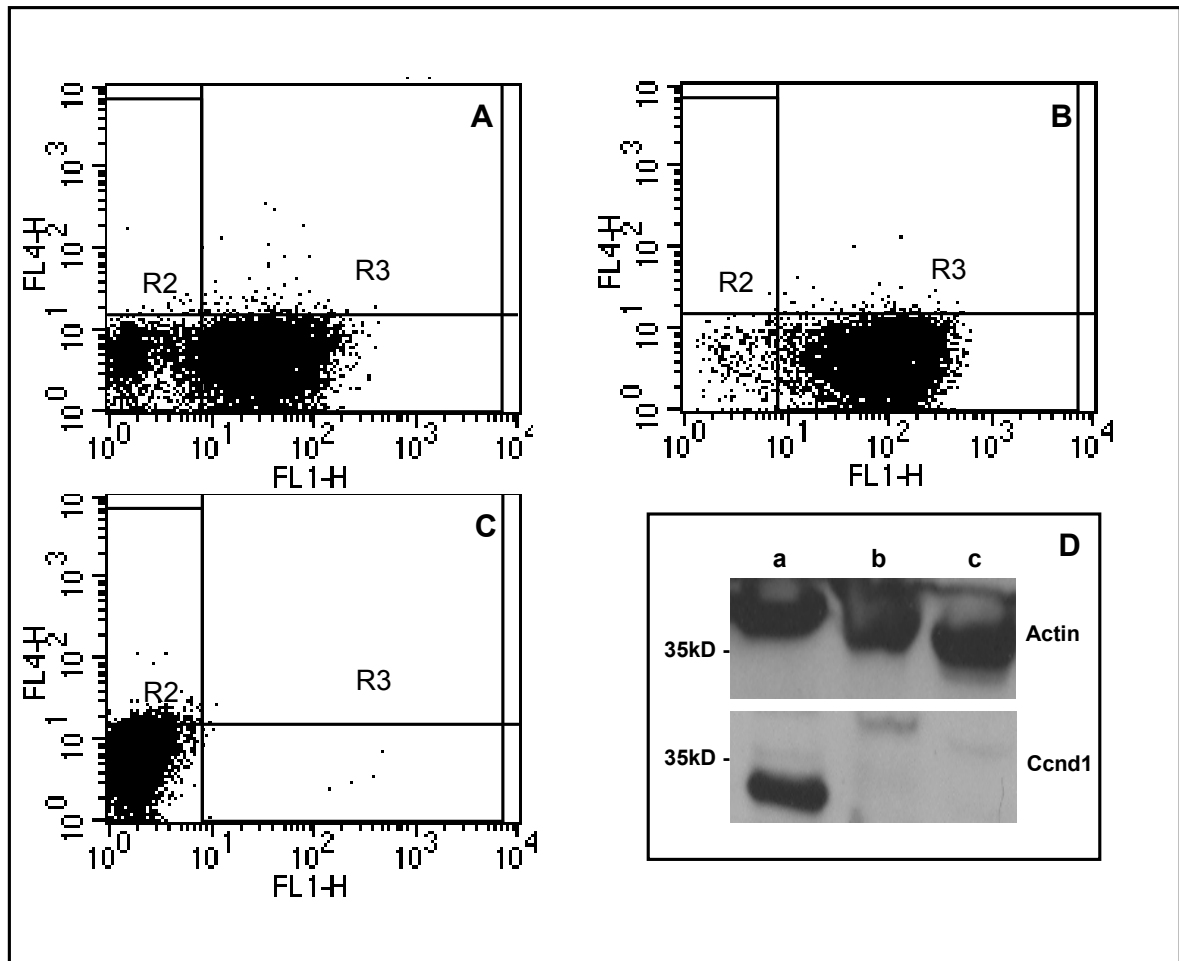


**Abbildung 15: Durchflusszytometrische Sortierung GFP exprimierender E86 GP<sup>+</sup>-Zellen.** GFP-negative Zellen sind in rot dargestellt. Die jeweils in grün dargestellten Zellen (R2) wurden isoliert und weiter kultiviert. **A** zeigt die erste Sortierung zwei Tage nach der Infektion mit dem Retrovirus Ccnd1-MSCV, **B** stellt die Sortierung der aus **A** resultierenden Population nach einer weiteren Woche dar. Aus R2 in **B** wurden Einzelzellen isoliert und kultiviert. Entsprechend zeigt **C** die erste Sortierung nach Infektion mit dem Kontrollvirus MIG, **D** stellt die Sortierung der aus **C** resultierenden R2-Population nach einwöchiger Kultur dar.

einzelnen Zellklone hinsichtlich ihrer Virusproduktion an NIH3T3-Zellen getestet und am Durchflusszytometer analysiert (**Abbildung 16**). Ein Ccnd1-MSCV produzierender Klon, der 80,68 % (**Abbildung 16A**) und ein MIG produzierender Klon, der 96,50 % (**Abbildung 16B**) NIH3T3-Zellen infizieren konnte, wurde jeweils für die weiteren Experimente ausgewählt.

Die tatsächliche Expression des Transgens *Cyclin D1* in Ccnd1-MSCV infizierten NIH3T3-Zellen konnte zudem auf Proteinebene mittels *Westen-Blot*-Analyse erfolgreich nachgewiesen werden (**Abbildung 16D**).





**Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der Infektionsraten virusproduzierender E86 GP<sup>+</sup>-Klone.** Dargestellt sind die Infektionsraten einzelner virusproduzierender E86 GP<sup>+</sup> Klone an NIH3T3-Zellen (**A**, **B**, **C**). Die GFP-Fluoreszenzintensität ist auf der x-Achse (FL1-H) aufgetragen. Die y-Achse zeigt einen beliebigen Fluoreszenzkanal (FL4-H). Die den Ccnd1-MSCV-Vektor enthaltenden E86 GP<sup>+</sup>-Zellen (**A**) zeigen eine Infektionsrate von 80,68 %, die den Kontrollvektor (MIG) enthaltenden Zellen (**B**) eine Infektionsrate von 96,50 %, und die Kontrollzellen ohne Vektor (**C**) eine Infektionsrate von 0,08 %. In **D** ist eine Ccnd1 Western Blot Analyse dargestellt. Die Bahnen **a**, **b** zeigen die Analyse des Proteinlysats der GFP-positiven Zellen aus **A** und **B**, Bahn **c** die Analyse des Lysats GFP-negativer Zellen aus **C**. Der Nachweis von Aktin erfolgte als Kontrolle.

### 3.1.2.2. Transplantation retroviral infizierter Knochenmarksstammzellen

Durch Transplantation genetisch veränderter Knochenmarkszellen in zuvor letal bestrahlte Mäuse sollte *in vivo* der spezifische Einfluß der Gene *Atm* und *Cyclin D1* auf die Hämatopoese analysiert werden. Der Hauptfokus der Studie lag hierbei auf der Untersuchung eventuell auftretender hämatologischer Neoplasien. Es wurde prinzipiell nach dem in **Abbildung 8** gezeigten Versuchsschema vorgegangen und zunächst das Knochenmark von *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert (vergleiche Kapitel **2.2.1.9**). Die präparierten Knochenmarkszellen wurden zunächst durch Zugabe

wachstumsfördernder Interleukine prästimuliert und nachfolgend durch Kokultur mit bestrahlten Ccnd1-MSCV- oder MIG-produzierenden E86GP<sup>+</sup>-Zellen, welche entsprechend entweder Ccnd1-MSCV oder zur Kontrolle MIG produzierten, infiziert. Das retroviral infizierte *Atm*<sup>-/-</sup>-Knochenmark wurde nach weiterer Kultur und durchflusszytometrischer Isolierung nicht-infizierter Zellen in letal bestrahlte Wildtypmäuse injiziert. Je nach Versuchsserie wurden Zellzahlen von  $1,3 \times 10^4$  bis  $1,44 \times 10^6$  pro Maus verwendet. Auf diese Weise wurden insgesamt 46 Mäuse transplantiert. 24 Mäuse starben infolge zu hoher Strahlenbelastung oder akuter Infektionen in den ersten vier Tagen nach Transplantation. Aus insgesamt fünf Transplantationsserien überlebten 22 Mäuse die ersten kritischen Tage und konnten in der Folge hinsichtlich der veränderten Phänotypen beobachtet werden. Im Einzelnen handelte es sich hierbei um 15 *Atm*<sup>-/-</sup>-Ccnd1-MSCV-Knochenmark transplantierte Mäuse und 7 *Atm*<sup>-/-</sup>-MIG-Knochenmark transplantierte Mäuse. Vier Wochen nach erfolgter Transplantation wurde die Repopulation von Leukozyten in den transplantierten Tieren untersucht. Der Anteil der Leukozyten, die aus transplantiertem Knochenmark resultierten, betrug bis zu 52 %. Im Folgezeitraum verringerte sich der Anteil dieser Leukozytenfraktion unabhängig von der Art des Transplantates jedoch um bis zu 18 % innerhalb von vier Wochen (Daten nicht dargestellt).

### 3.1.2.3. *Beobachtung hämatologischer Neoplasien in transplantierten Mäusen*

Im weiteren Beobachtungszeitraum verstarben 3 *Atm*<sup>-/-</sup>-MIG-Knochenmark transplantierte Mäuse und 5 *Atm*<sup>-/-</sup>-Ccnd1-MSCV-Knochenmark transplantierte Mäuse zwischen 45ster und 65ster Woche nach Transplantation. Bei der Sektion zeigten sich ausnahmslos massive thymische Lymphome. Diese Lymphome nahmen den gesamten Brustraum ein. Daraus präparierte Zellen zeigten sowohl CD4- als auch CD8-Expression auf den Zelloberflächen und glichen somit immunophänotypisch den Lymphomen, die in Kapitel 1.4 erwähnt wurden und in Kapitel 3.2 ausführlicher behandelt werden sollen. Drei weitere *Atm*<sup>-/-</sup>-MIG-Knochenmark transplantierte Mäuse sowie 7 *Atm*<sup>-/-</sup>-Ccnd1-MSCV-Knochenmark transplantierte Mäuse starben zwischen der 89sten und der 134sten Woche nach Transplantation. Bei der Sektion konnten weder hämatopoetische Neoplasien noch

anderweitige neoplastische Veränderungen nachgewiesen werden. Bei 6 dieser Mäuse konnte, unabhängig vom Genotyp des transplantierten Knochenmarks, ein verringerter Anteil der Leukozyten im Blut festgestellt werden. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit lebten noch 3 *Atm*<sup>-/-</sup>-Ccnd1-MSCV-Knochenmark transplantierte Mäuse sowie eine *Atm*<sup>-/-</sup> MIG-Knochenmark transplantierte Maus, deren Transplantation vor 72 Wochen erfolgte.

Abschließend kann festgestellt werden, dass insgesamt 22 letal bestrahlte Mäuse erfolgreich mit *Atm*-defizientem Knochenmark transplantiert wurden. Das hämatopoetische System wurde von den Transplantaten repopuliert. Dabei handelte es sich in 15 Fällen um Knochenmark, das mit rekombinanten Ccnd1-MSCV infiziert war, in 7 Fällen war das Knochenmark zuvor mit dem Kontrollvektor MIG infiziert worden. Es zeigte sich in der Langzeitbeobachtung der transplantierten Mäuse, dass sich in keinem Fall weder ein Mantelzell-Lymphom noch eine andere B-Zell-Neoplasie entwickelte. Unabhängig vom *Cyclin D1*-Status des transplantierten Knochenmarks erkrankten und starben 8 Mäuse an einem thymischen Lymphom.

Es kann konstatiert werden, dass über zwei unterschiedliche Strategien versucht wurde, ein murines Modell des Mantelzell-Lymphoms durch genetische Kombination von *Cyclin D1*-Überexpression und *Atm*-Inaktivierung zu generieren. Zum einen wurde die Zusammenführung der relevanten genetischen Aberrationen durch züchterische Vereinigung eines *Atm*-knock-out Stammes und eines *Ccnd1*-transgenen Stammes erreicht, zum anderen wurden *Atm*-defiziente Knochenmarkszellen nach Infektion mit rekombinantem Ccnd1-MSCV in letal bestrahlte Wildtypmäuse transplantiert. Die Langzeitbeobachtung zeigte bei beiden Strategien weder Mantelzell-Lymphome noch andere B-Zell-Neoplasien. Allerdings konnte hier erstmals eine gegenseitige Beeinflussung der Gene *Atm* und *Cyclin D1* im hämatopoetischen System nachgewiesen werden, wie die Rekonstitution der B-Zell-Population in *Cyclin D1*-transgenen Mäusen bei Verlust eines *Atm*-Allels deutlich machte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Atm*-defiziente Mäuse - unabhängig vom *Cyclin D1*-Status - thymische Lymphome entwickeln. Diese konnten in wenigen Fällen sogar nach einer Knochenmarkstransplantation *Atm*-defizienter Knochenmarkszellen in Wildtypmäuse nachgewiesen werden. Die histologische, immunphänotypische und molekulargenetische Charakterisierung dieser

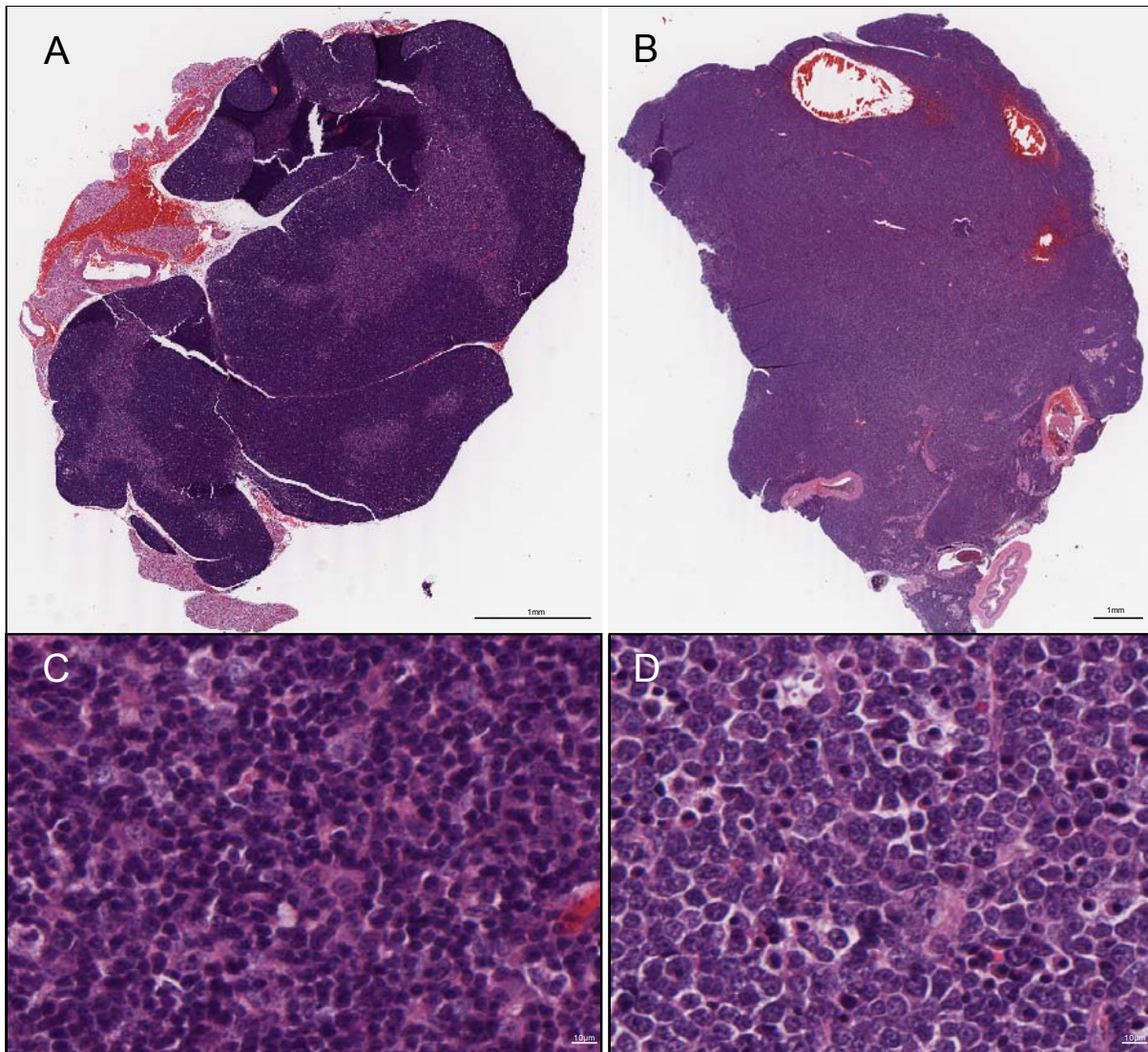
thymischen Lymphome in *Atm*-defizienten Mäusen ist Gegenstand des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit.

## 3.2. Mausmodell des *Atm*-defizienten T-Zell-Lymphoms

In den in dieser Arbeit verwendeten *Atm*-knock-out-Mäusen konnte bei homozygotem Genotyp ein ausgeprägter typischer Phänotyp beobachtet werden. Neben retardiertem Wuchs und Infertilität entwickelten die Tiere vergrößerte Thymi, die nach 12-24 Wochen zum Tod der Tiere führten. Das mediane Überleben betrug hierbei 18,3 Wochen. Die Sektion der betroffenen Tiere zeigte eine Dislokation von Herz und Lunge infolge des beträchtlich vergrößerten Thymus, der mitunter den gesamten Brustraum ausfüllte (**Abbildung 13**). Während normale Thymi der Wildtypmäuse ein Thymusgewicht von 0,01-0,03 g aufwiesen, wogen die vergrößerten Thymi der verstorbenen *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse 0,23-1,04 g. Dieser mit hoher Penetranz auftretende Phänotyp des bei homozygoten *Atm*-knock-out-Mäusen vergrößerten Thymus wurde bereits vor über einer Dekade in ersten Studien beschrieben (Barlow *et al.*, 1996), wird jedoch nach wie vor kaum verstanden. Weder der molekulare Mechanismus noch die generelle Bedeutung des *Atm*-Genverlusts für diese murine Neoplasie wurden bislang aufgeklärt. Die vorliegende Arbeit versucht einen Beitrag zur Klärung dieser Fragen zu liefern. Zu diesem Zweck wurden *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die im Alter von 12-24 Wochen aufgrund von Apathie oder Hyperventilation starke Anzeichen eines stark vergrößerten Thymus aufwiesen, sowie *Atm*<sup>+/+</sup>, *Atm*<sup>+/-</sup> und unauffällige *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse eingehend untersucht.

### 3.2.1. HISTOPATHOLOGISCHE ANALYSE VON WILDTYP-THYMUS UND THYMISCHEM LYMPHOM

Zur Identifizierung pathologisch veränderter Zellen wurden die zum Teil massiv vergrößerten Thymi der *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse zunächst histopathologisch untersucht. Isolierte Gewebe wurden hierfür zunächst mit Formalin fixiert und in Paraffinblöcke eingeschlossen. Anschließend wurden im Mikrotom 5 µm starke Schnitte gefertigt und auf Objektträgern mit Hämatoxylin und Eosin (HE) sowie Giemsa und Pas gefärbt (vergleiche Kapitel 2.2.1.11). Bei Vergleich HE-gefärbter Wildtyp-Thymi (*Atm*<sup>+/+</sup>) und vergrößerter Thymi der *Atm*-knock-out (*Atm*<sup>-/-</sup>)-Mäuse können bereits in der Übersicht



**Abbildung 17.:** H&E-gefärbte Thymusschnitte von Wildtyp und *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäusen. In **A** ist die Übersicht eines Wildtyp-Thymus bei 19 x Vergrößerung, in **B** die Übersicht des thymischen Lymphoms einer *Atm*-defizienten Maus bei 8 x Vergrößerung dargestellt. **C** zeigt eine vergrößerte Darstellung der Zellen des Wildtyp-Thymus (400 x), **D** einen entsprechenden Ausschnitt eines thymischen Lymphom in gezeigt.

bei 8-19 facher Vergrößerung grundlegende Unterschiede in der Thymusarchitektur festgestellt werden (**Abbildung 17**). Während sich im Wildtyp-Thymus die helleren Medullaregionen deutlich von den sie umgebenden dunkleren Cortexbereichen absetzen (**Abbildung 17A**), weist der vergrößerte Thymus der *Atm*<sup>-/-</sup>-Maus eine durchweg homogene Färbung auf, in welcher keine Unterscheidung zwischen Cortex und Medulla möglich ist (**Abbildung 17B**). Bei 400 facher Vergrößerung sind im Wildtyp-Thymus vor allem T-Lymphozyten mit gleichmäßig blau angefärbtem rundem Zellkern zu erkennen (**Abbildung 17C**). Die Zelldichte der T-Lymphozyten im Cortex ist weitaus höher als in der Medulla, woraus die in der Übersicht (**Abbildung 17A**) gut unterscheidbaren Bereiche resultieren. Der dominierende Zelltyp lymphozytären

Ursprungs in vergrößerten Thymi der *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäusen erscheint im Vergleich zu Wildtyp-Thymi größer und zeigt darüber hinaus vergrößerte Nuklei mit heterogener Färbung und darin zu erkennenden Nukleoli (**Abbildung 17D**).

Die histopathologische Analyse von unauffälligem Wildtyp-Thymus und stark vergrößertem *Atm*-defizientem Thymus ergab, dass es sich bei letzterem um ein thymisches T-Zell-Lymphom handelte. Die blastisch erscheinenden Zellen und deren Nuklei waren vergrößert und zeigten eine heterogene Färbung mit ausgeprägten Nukleoli. Insgesamt erscheint die typische, aus Cortex und Medulla bestehende Thymusarchitektur im thymischen Lymphom aufgehoben.

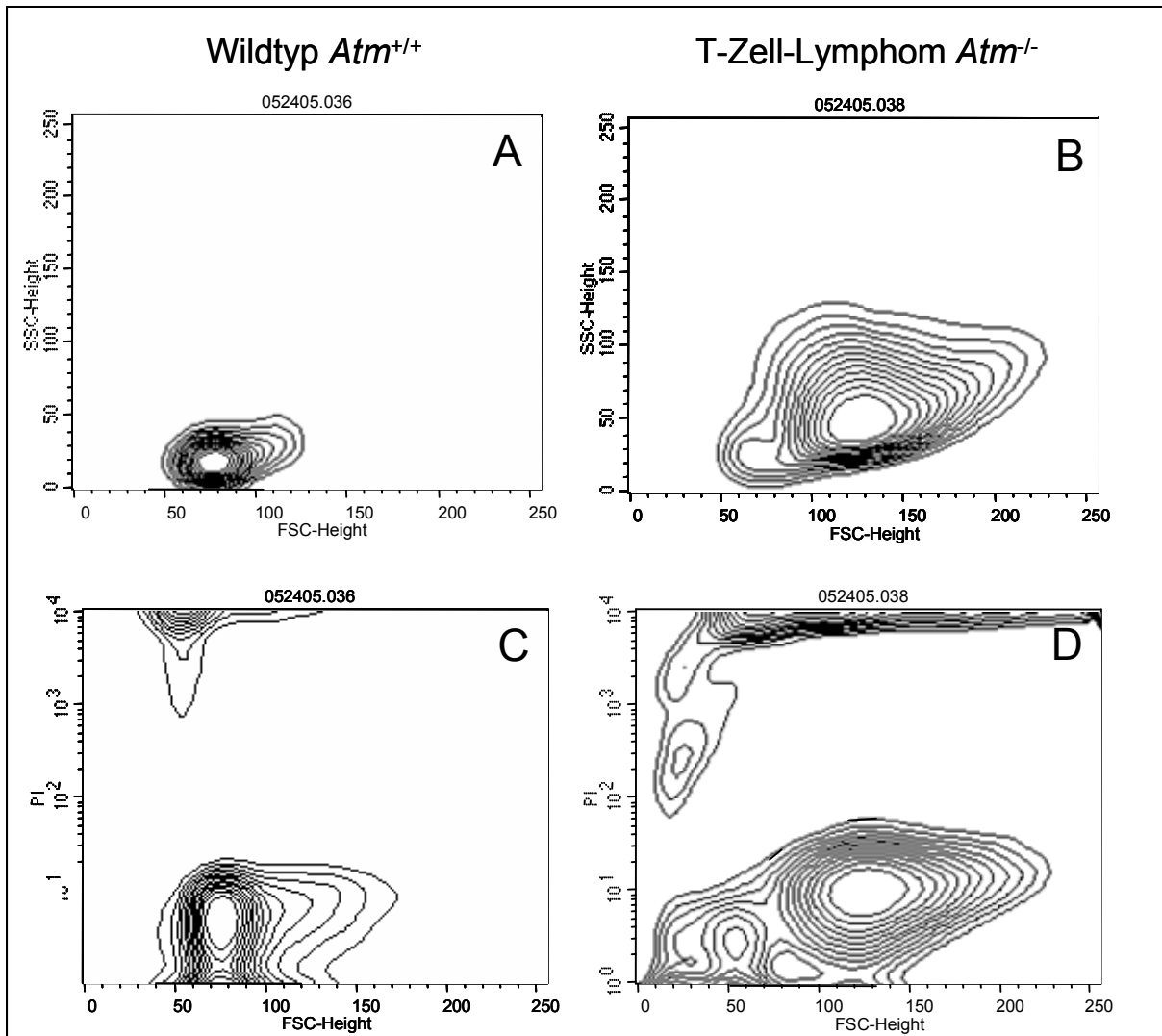
### **3.2.2. IMMUNOPHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN AUS WILDTYP-THYMUS UND THYMISCHEM LYMPHOM**

Die histopathologische Untersuchung pathologisch vergrößerter *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi lieferte konkrete Hinweise auf eine lymphozytäre Neoplasie. Um die involvierte Zellpopulation genauer charakterisieren und möglicherweise auf ein definiertes Stadium der T-Zell-Entwicklung im Thymus zurückführen zu können, wurden komplexe immunphänotypische Analysen vorgenommen. Die zu untersuchenden Wildtyp-Thymi und thymischen *Atm*<sup>-/-</sup>-Lymphome wurden hierzu entnommen, präpariert und zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen verwendet. Diese Zellen wurden anschließend definierten Antikörper- und Propidiumiodidfärbungen unterzogen (**2.2.1.11.1**). Die Analyse der Zellen erfolgte sodann am Durchflusszytometer.

So ergab eine vergleichende Analyse ungefärbter Zellen (**Abbildung 18**) bezüglich ihrer Größe und Granularität, dass die Lymphozyten der thymischen Lymphome deutlich größer waren (**Abbildung 18A, B**) als entsprechende Wildtypzellen. Das Ergebnis der Propidiumiodid-Färbung läßt darüber hinaus auf einen höheren Anteil toter Zellen in den Lymphom-Präparationen schließen (**Abbildung 18C, D**).

#### **3.2.2.1. Expression von CD4 und CD8**

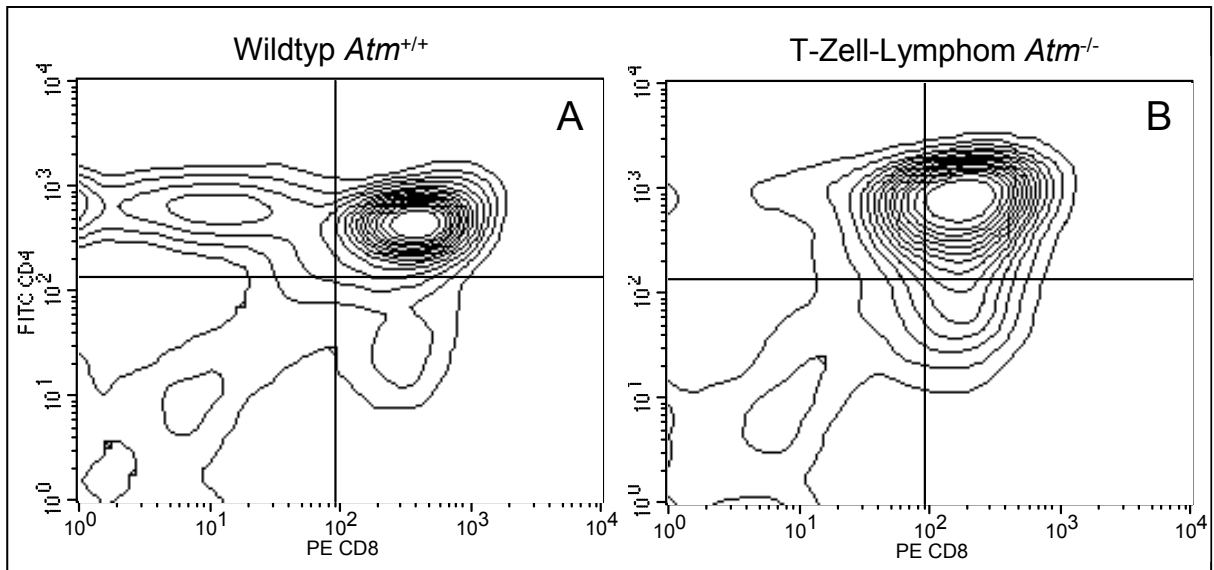
Durch Färbung von T-Zell-Lymphozyten mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4 und CD8 sowie anschließende durchflußzytometrische Analyse können verschiedene spezifische Entwicklungsstadien (siehe Kapitel **1.1.3**)



**Abbildung 18: FACS-Analyse separierter Zellen aus Wildtypthymus und thymischem  $Atm^{-/-}$  Lymphom.** In **A** und **B** sind Zellgröße (FSC-Height, forward scatter) auf der x- und Granularität (SSC-Height, sideward scatter) auf der y-Achse aufgetragen. In **C** und **D** sind ebenfalls Zellgröße auf der x- sowie die Anzahl Propidiumiodid-gefärbter Zellen (PI) auf der y-Achse aufgetragen. In **A** und **C** handelt es sich um Zellen eines frisch präparierten Wildtypthymus ( $Atm^{+/+}$ ), in **B** und **D** um Zellen eines frisch präparierten thymischen Lymphoms einer  $Atm^{-/-}$ -Maus.

von T-Zellen identifiziert und in ihrer Populationsgröße verglichen werden. Die CD4 / CD8-Färbungen von Zellpräparationen normaler Wildtyp-Thymi zeigten hier das erwartete charakteristische Bild mit unreifen, doppelt negativen (DN), doppelt positiven (DP) und reiferen, einfach positiven (SP, *single positive*) T-Lymphozyten (**Abbildung 19A**). Hingegen konnten in den Analysen thymischer Lymphome fast ausschließlich nur doppelt positive T-Zellen (DP) nachgewiesen werden (**Abbildung 19B**). Darüber hinaus konnten unter den wenigen einfach positiven Zellen mehr CD8-positive Zellen als CD4-positive Zellen beobachtet werden, was einer Umkehrung der Wildtypsituation entsprach.





**Abbildung 19: FACS-Analyse von CD4- und CD8-spezifisch gefärbten Zellen aus Wildtypthymus und  $Atm^{-/-}$ -T-Zell-Lymphom.** Mit CD8-Antikörpern gefärbte Zellen sind auf der x-Achse, mit CD4-Antikörpern gefärbte Zellen auf der y-Achse aufgetragen. In **A** handelt es sich um Zellen eines Wildtypthymus, in **B** um Zellen eines thymischen Lymphoms ( $Atm^{-/-}$ ).

Aus diesen Resultaten wurde gefolgert, dass es sich bei den im  $Atm$ -defizienten thymischen Lymphom akkumulierten Zellen um vergrößerte, granuläre, CD4 und CD8 doppelt positive T-Lymphozyten handelte. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, die neoplastischen Zellen direkt einem assoziierten, aus der normalen T-Zell-Entwicklung bekannten Stadium zuzuordnen (siehe Diskussion 4.2.).

### 3.2.2.2. Expression von CD69

Zur weiteren Charakterisierung der im thymischen  $Atm^{-/-}$  Lymphom akkumulierenden T-Zell-Population wurden im Folgenden Versuche durchgeführt, die eine engere Eingrenzung des Entwicklungsstadiums der neoplastischen Zellen ermöglichen.

Im Verlauf der intrathymischen T-Zell-Entwicklung werden CD4 / CD8 doppelt positive T-Zellen (DP) normalerweise durch Interaktion mit den MHC-präsentierenden Zellen aktiviert (Kapitel 1.1.3). Als Folge der Aktivierung präsentiert ein Teil der DP-Zellen das Oberflächenantigen CD69. Die aus den DP-Zellen differenzierenden CD4 oder CD8 einfach positiven T-Lymphozyten (SP) behalten die Expression dieses sogenannten Aktivierungsmarkers CD69 bei.

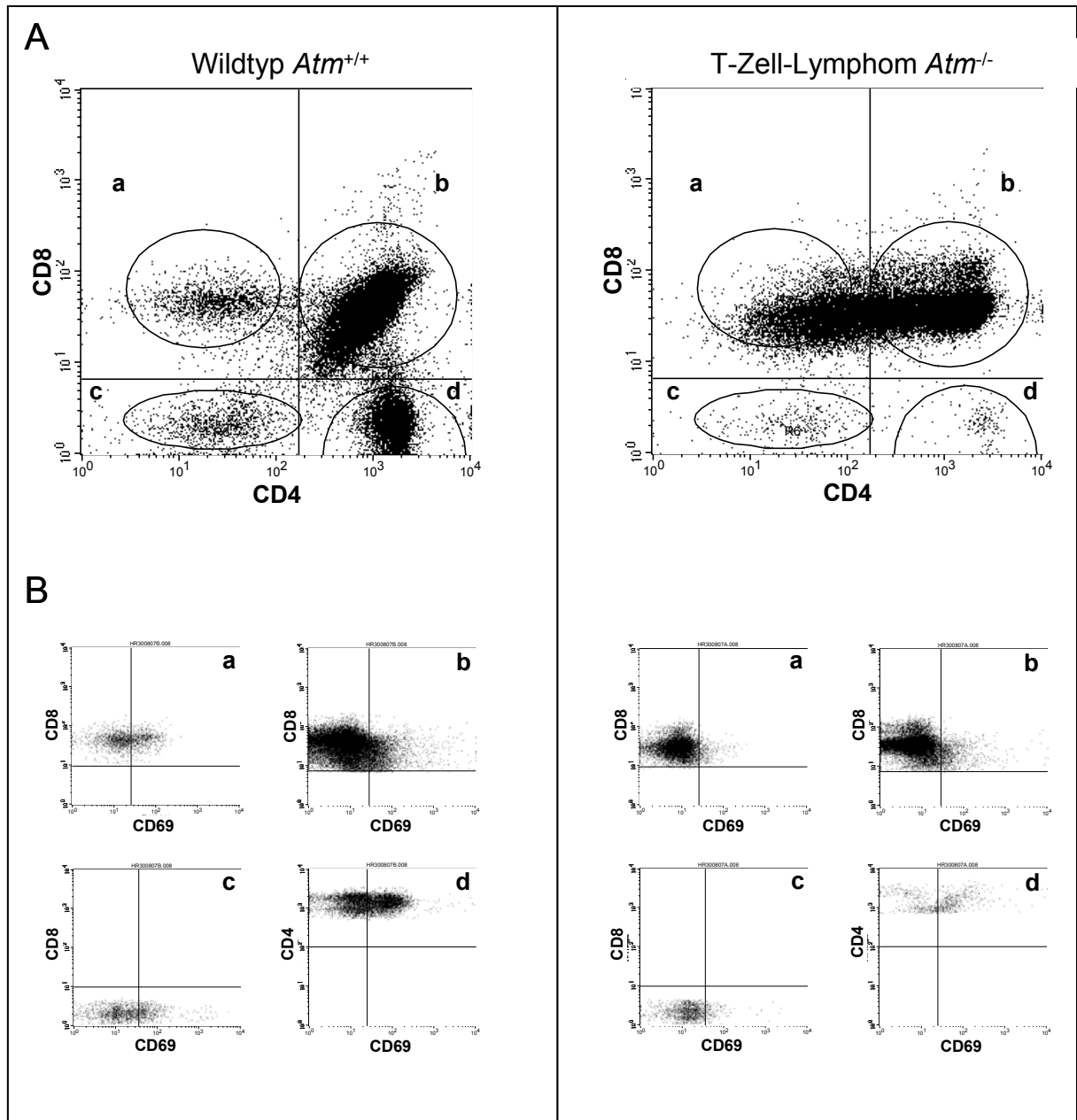
Durch Analyse thymischer Zellen, die zuvor mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD69 entsprechend gefärbt wurden, konnte der Aktivierungsstatus der

neoplastischen T-Zellpopulation im thymischen Lymphom der *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse genauer eingegrenzt werden. Das Ergebnis dieses Experiments wird in **Abbildung 20** veranschaulicht. Die charakteristischen, bei einer Färbung mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 zu beobachtenden Zellpopulationen sind links in **Abbildung 20A** (je **a-d**) für einem Wildtyp-Thymus (*Atm*<sup>+/+</sup>) und rechts in **Abbildung 20A** (je **a-d**) für ein thymisches Lymphom (*Atm*<sup>-/-</sup>) dargestellt. **Abbildung 20B** (je **a-d**) zeigt die CD69-Expression für die jeweiligen Zellpopulationen. Die CD8 SP-Population (**a**) zeigte im thymischen Lymphom eine massiv verringerte CD69-Expression (2,87 %) gegenüber dem Wildtyp (34 %). Auch die DP-Population (**b**) zeigte im thymischen Lymphom eine abgeschwächte CD69-Expression (3,89 %) gegenüber Wildtypniveau (9,74 %). Die gleiche Tendenz war darüber hinaus auch für die CD4 SP- (**d**) und die DN-Population (**c**) zu erkennen.

Diese Ergebnisse weisen deutlich auf eine Abnormität in der Aktivierung der späten, unreifen T-Zell-Entwicklungsstadien im thymischen Lymphom *Atm*-defizienter Mäuse hin. Zur weiteren Charakterisierung dieser im thymischen Lymphom entarteten Zellpopulationen, auch hinsichtlich eventueller Störungen in früheren Entwicklungsstadien, wurden die immunophänotypischen Analysen wie nachfolgend beschrieben ausgeweitet.

### 3.2.2.3. Expression von CD25 und TCR $\beta$

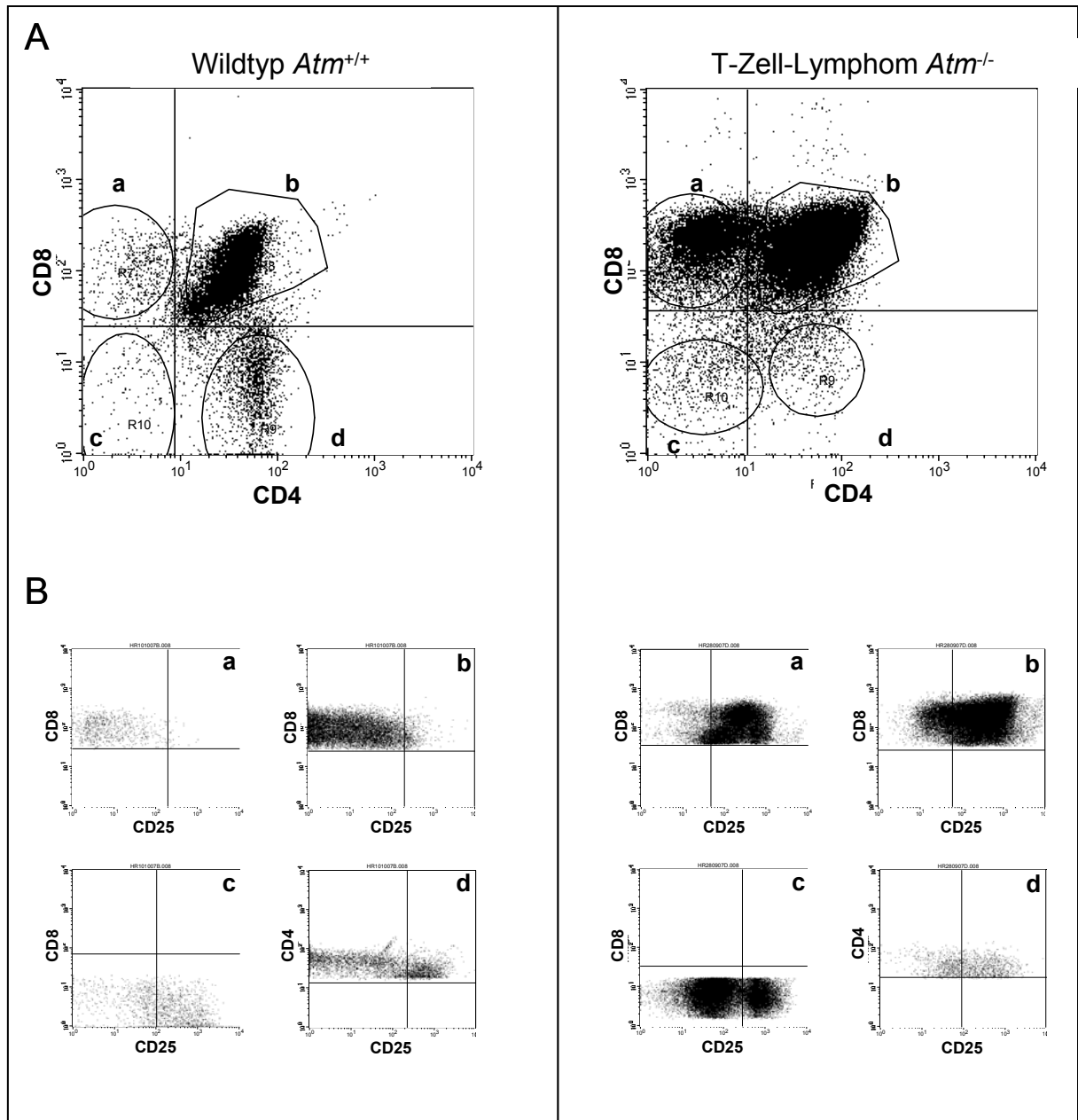
Bereits in den doppelt negativen Stadien DN2 bis DN3 der intrathymischen T-Lymphozytenentwicklung, und damit deutlich vor der T-Zellaktivierung und der damit verbundenen CD69-Expression, wird das Antigen CD25 an der Zelloberfläche von T-Lymphozyten präsentiert (siehe **Abbildung 4**). Diese Entwicklungsstufe ist vor allem durch das Rearrangement der T-Zell-Rezeptorkette  $\beta$  gekennzeichnet. Ist die Rekombination der entsprechenden Gensegmente abgeschlossen, so wird der reife T-Zell-Rezeptor  $\beta$  (TCR $\beta$ ) als Prä-T-Zell-Rezeptor an der Oberfläche repräsentiert. Gleichzeitig wird die Expression des Oberflächenantigens CD25 beendet (DN4). Nur bei einigen CD4 SP-Zellen wird die Expression dieses Antigens wieder aktiviert, sobald sie zu T-Helferzellen ausdifferenzieren und in die Medulla immigrieren. CD25 kann also prinzipiell als Marker dieser sehr frühen T-Zell-Entwicklungsstufe herangezogen werden.



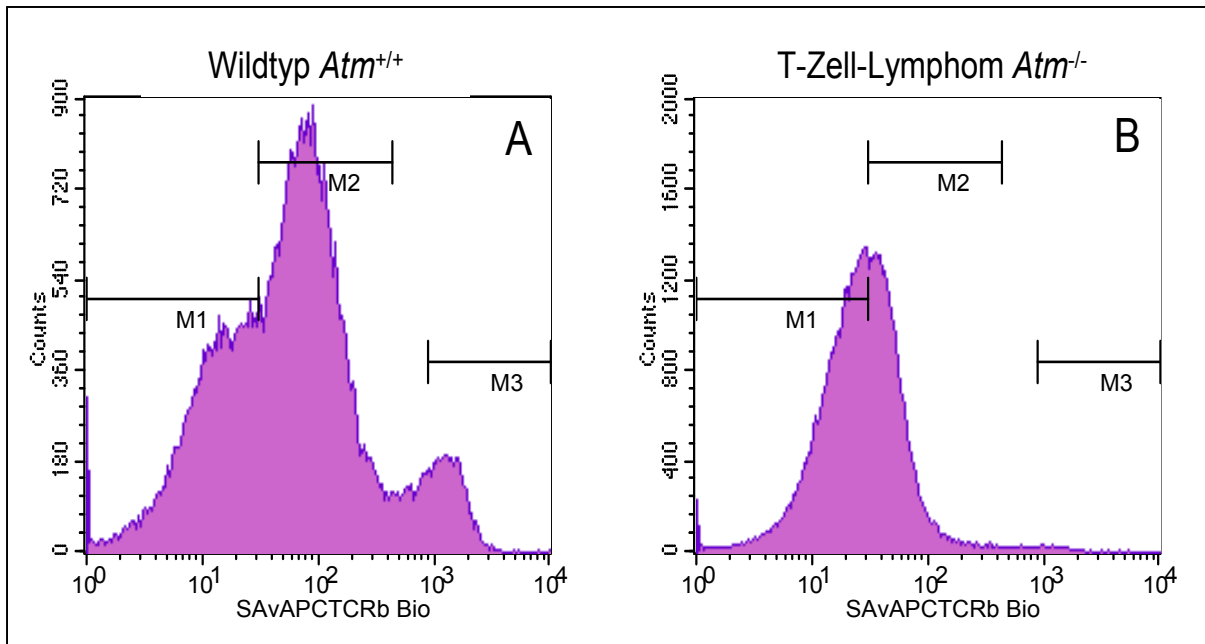
**Abbildung 20: FACS-Analyse des Aktivierungsstatus von Zellen aus Wildtyp-Thymus und  $Atm^{-/-}$ -T-Zell-Lymphom.** In **A** ist links die FACS-Analyse eines Wildtypthymus ( $Atm^{+/+}$ ) und rechts die eines thymischen Lymphoms ( $Atm^{-/-}$ ) nach Antikörperfärbung gegen CD4 (x-Achse) und CD8 (y-Achse) dargestellt. Die einzelnen Populationen (a) CD8SP (CD8 *single positive*), (b) DP (*double positive*), (c) DN (*double negative*) und (d) CD4SP (CD4 *single positive*) sind jeweils umrandet. **B** zeigt die FACS-Analyse der Populationen a-d nach Antikörperfärbung gegen CD69. Hierbei ist die CD69-Expression auf der x-Achse aufgetragen, die Expression der jeweiligen T-Zell-Marker CD8 bzw. CD4 auf der y-Achse.

Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen durchflußzytometrischen Analyse anti-CD4, -CD8 und -CD25 gefärbter T-Lymphozyten aus Wildtyp-Thymus und thymischem *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphom sind in **Abbildung 21** veranschaulicht. Die charakteristischen T-Zell-Populationen des Wildtyp-Thymus (**Abbildung 21A, links**) sind, wie in **Abbildung 21B, links** dargestellt, hinsichtlich ihrer CD25-Expression einzeln untersucht worden. Wie erwartet konnte eine sehr große, CD25-exprimierende Population an unreifen DN-Zellen (73,65 %) (**c**) beobachtet werden. Einen mit 38,12 % ebenfalls hohen Anteil CD25 positiver Zellen zeigte darüber hinaus die CD4 SP-Population (**d**). CD25 exprimierende Lymphozyten waren in der CD8 SP (**a**) und DP (**b**) Population mit 2,58 bzw. 2,36 % fast nicht zu finden. Im Gegensatz dazu war in der hier untersuchten Zellsuspension des thymischen Lymphoms (**Abbildung 21B rechts**) ein ungewöhnlich hoher Anteil an CD25 exprimierenden Zellen sowohl in der CD8 SP-Population (90,83 %, **a**) als auch in der akkumulierten DP-Population (86,26 %, **b**) zu beobachten. Auch in der CD4 SP-Population hatte sich der Anteil an CD25 positiven Zellen etwas erhöht (54,95 %, **d**), während in der DN-Population ein Rückgang (32,14 %, **c**) zu erkennen ist. In den Zellen des thymischen Lymphoms konnte also eine generelle Deregulation der Expression des Oberflächenantigens CD25 beobachtet werden, was vermuten läßt, dass erste T-Zell-entwicklungsspezifische Aberrationen der neoplastischen Zellen bereits in einem Stadium vor dem Erreichen der CD4 / CD8 doppelt positiven Stufe eintraten.

Da die CD25 Expression, welche in den Zellen des thymischen Lymphoms gestört war, normalerweise mit dem Rearrangement des TCR $\beta$  einhergeht und die Expression eines funktionellen TCR $\beta$  an der Zelloberfläche für eine weitere normale Entwicklung von essentieller Bedeutung ist (Kapitel **1.1.3**), sollte die Häufigkeitsverteilung von TCR $\beta$  präsentierenden Zellen im Wildtyp-Thymus und im thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphom festgestellt werden (**Abbildung 22**). In der hierzu durchgeführten durchflußzytometrischen Analyse mit Antikörpern gegen TCR $\beta$  konnten im Wildtyp-Thymus drei verschiedene Zellpopulationen mit niedriger, mittlerer und sehr hoher TCR $\beta$ -Expression identifiziert werden (**Abbildung 22A**), wobei die meisten Zellen eine mittlere Expression aufwiesen. Im thymischen Lymphom hingegen konnte nur eine einzige, homogene Population mit niedriger TCR $\beta$ - Expression nachgewiesen werden, die keiner der Wildtyp-Populationen



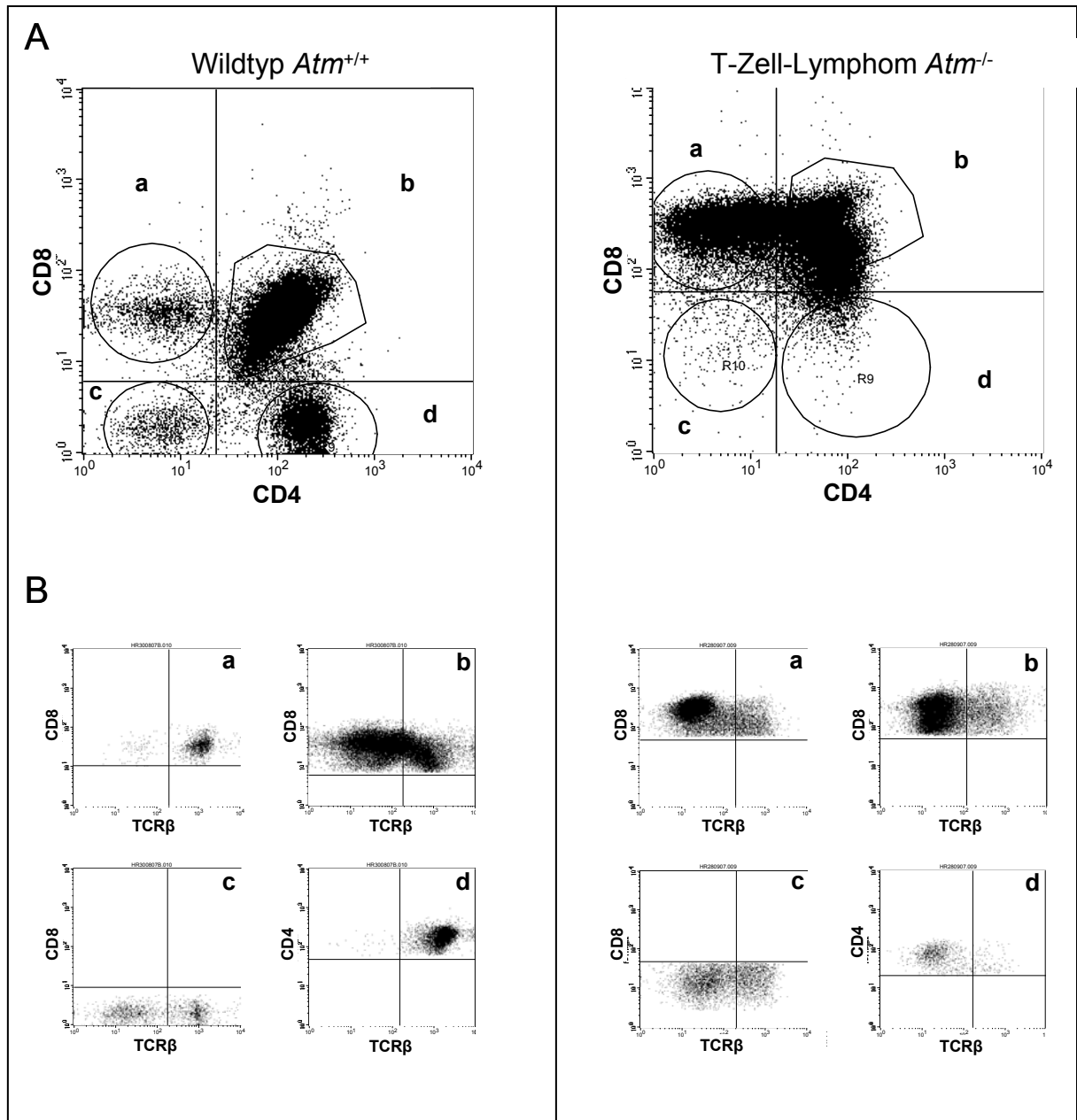
**Abbildung 21: FACS-Analyse der CD25 Expression von Zellen aus Wildtyp-Thymus und  $Atm^{-/-}$ -T-Zell-Lymphom.** In **A** ist die FACS-Analyse eines Wildtypthymus ( $Atm^{+/+}$ ) links und eines thymischen Lymphoms ( $Atm^{-/-}$ ) rechts mit Antikörpern gegen CD4 (x-Achse) und CD8 (y-Achse) dargestellt. Die einzelnen Populationen (a) CD8SP (CD8 *single positive*), (b) DP (*double positive*), (c) DN (*double negative*) und (d) CD4SP (CD4 *single positive*) sind umrandet und jeweils in der CD25-spezifischen Analyse in **B** dargestellt. Die CD25-Expression in **B** ist auf der x-Achse aufgetragen, der jeweilige T-Zell-Marker CD8 bzw. CD4 auf der y-Achse.



**Abbildung 22: FACS-Analyse der Verteilung TCR $\beta$  exprimierender Zellen aus Wildtyp-Thymus und thymischem  $Atm^{-/-}$  Lymphom .** Die T-Zell-Rezeptor  $\beta$ -Expression (SAvAPCTCRb Bio, x-Achse) ist gegen die Zahl der analysierten Zellen (*counts*, y-Achse) im Histogramm aufgetragen. In **A** ist die Analyse von Zellen eines Wildtypthymus, in **B** die eines thymischen Lymphoms dargestellt. Die Markierung M1 begrenzt eine niedrig TCR $\beta$  exprimierende, M2 eine intermediate TCR $\beta$  exprimierende, und M3 eine TCR $\beta$  hoch exprimierende Population im Wildtypthymus (**A**). Die entsprechenden Markierungen sind ebenfalls in **B** dargestellt, begrenzen hier jedoch keine definierten Populationen.

zugeordnet werden konnte (**Abbildung 22B**).

Im Verlauf der normalen T-Zell-Entwicklung exprimieren DN-Zellen ab dem Stadium DN4 (siehe **Abbildung 4**) TCR $\beta$  nach dessen Rearrangement als Prä-T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Während des Rearrangements des T-Zell-Rezeptors  $\alpha$  geht die TCR $\beta$ -Expression zurück. Gegen Ende des DP-Stadiums präsentieren die T-Zellen dann erneut den TCR $\beta$ , jedoch gemeinsam mit TCR $\alpha$  als fertigen T-Zell-Rezeptor an der Zelloberfläche. Die beiden sich hieraus entwickelnden SP-Populationen zeichnen sich schließlich durch eine sehr hohe Expression von TCR $\beta$  aus. Um die zuvor identifizierten T-Zell-Populationen bezüglich ihrer TCR $\beta$ -Expression in den entwicklungspezifischen Kontext einordnen zu können, wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und TCR $\beta$  mehrfach gefärbt und wiederum durchflußzytometrisch untersucht (**Abbildung 23**). Die in **Abbildung 23B**, links dargestellte Analyse zeigt im Wildtyp-Thymus für 94,51 % der CD8 SP (**a**) und 99,46 % der CD4 SP (**d**) Zellen eine sehr hohe TCR $\beta$ -Expression. Bei 29,74 % der DP-Population (**b**) und bei 44,55 % der DN-Population (**c**) waren hohe TCR $\beta$ -Expressionen zu beobachten. Sowohl niedrige als auch intermediäre



**Abbildung 23: FACS-Analyse der TCRβ-Expression bei Wildtyp-Thymus und T-Zell-Lymphom.** In **A** ist links die FACS-Analyse eines Wildtyp-Thymus ( $Atm^{+/+}$ ) und rechts die eines thymischen Lymphoms ( $Atm^{-/-}$ ) nach Antikörperfärbung gegen CD4 (x-Achse) und CD8 (y-Achse) dargestellt. Die einzelnen Populationen (a) CD8SP (CD8 *single positive*), (b) DP (*double positive*), (c) DN (*double negative*) und (d) CD4SP (CD4 *single positive*) sind in **A** umrandet dargestellt und werden isoliert in der TCRβ-spezifischen Analyse in **B** dargestellt. Die TCRβ-Expression in **B** ist auf der x-Achse aufgetragen, die jeweilige Expression der T-Zell-Marker CD8 bzw. CD4 auf der y-Achse.

TCR $\beta$ -Expressionsraten waren bei Zellen des Wildtyp-Thymus entsprechend bei 70,26 % bzw. 55,45 % festzustellen. Die T-Zellen des thymischen Lymphoms hingegen zeigten nur in der DN-Population (**c**) mit 32,39 % eine dem Wildtyp-Thymus ähnliche TCR $\beta$ -Expression. Weder die Zellpopulationen CD8 SP (9,11 %, **a**) noch CD4 SP (10,55 %, **d**) oder DN (11,48 %, **b**) präsentieren TCR $\beta$  auf ihren Oberflächen in mit Wildtyp-T-Zellen vergleichbarer Intensität.

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zur Charakterisierung von Zellen des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms belegen eine massive Störung sowohl in der Entwicklung als auch in der späteren Funktionalität der T-Lymphozyten. Die T-Zellen des thymischen Lymphoms *Atm*-defizienter Mäuse zeigten vor allem in der DP- sowie den SP-Populationen einen gravierenden Verlust der TCR $\beta$ -Expression, während die CD25-Expression im Gegenzug massiv erhöht war. Zusätzlich zeigten die genannten Zellpopulationen eine stark verminderte Aktivierung, nachgewiesen anhand der verminderten Expression des CD69-Markers, welche erst im Thymus durch den Kontakt mit MHC-Komplexen erfolgt.

### 3.2.3. UNTERSUCHUNGEN ZU TUMORKLONALITÄT UND TCR $\beta$ REARRANGEMENT

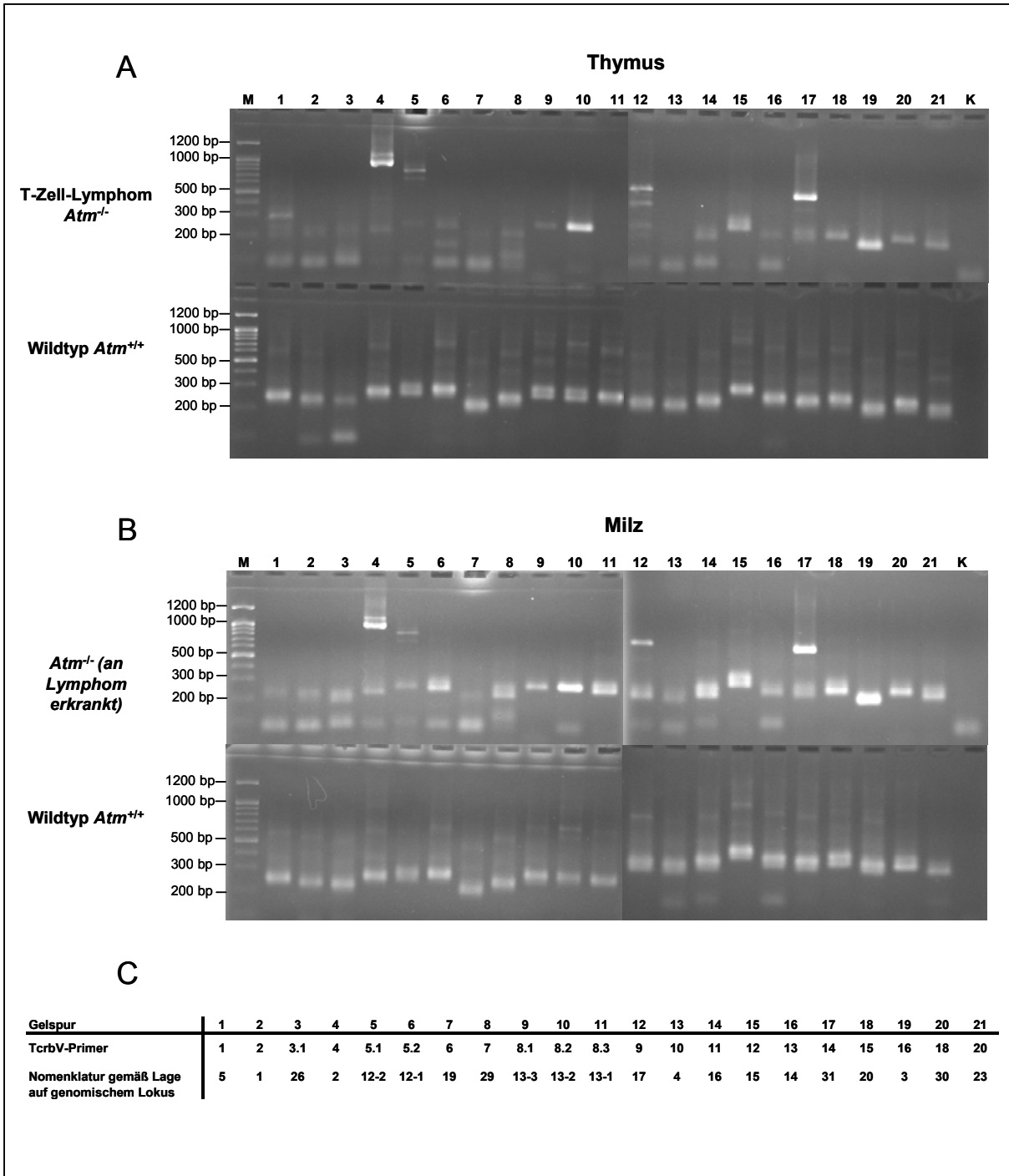
Aus der vorhergehenden Analyse der Immunophänotypen konnte gefolgert werden, dass im *Atm*-vermittelten thymischen Lymphom CD4 CD8 doppelt positive T-Zellen stark angereichert sind. Diese Zellen verfügen im Normalfall bereits über rekombinierte T-Zell-Rezeptoren  $\beta$  (TCR $\beta$ ), anhand derer sich die Klonalität der Tumoren bestimmen lässt. Die Klonalität von Tumoren gibt Aufschluß darüber, ob der Ursprung, wie bei monoklonalen Neoplasien, in der pathologischen Proliferation einer einzelnen Zelle zu suchen ist. Bei oligoklonalen Neoplasien tragen dagegen wenige, bei polyklonalen, viele verschieden entartete Zellen zur Entstehung neoplastischen Gewebes bei. Um in dieser Arbeit die Klonalität des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms zu bestimmen, wurden verschiedene PCR-Analysen durchgeführt, in welchen für jede der 20 variablen Regionen (V-Region) des TCR $\beta$  ein spezifischer 5'-Primer in Kombination mit einem für alle Reaktionen gemeinsamen 3'-Primer eingesetzt wurde. Der 3'-Primer bindet in der allen T-Zell-Rezeptoren gemeinsamen, konstanten Region (C-Region). Es ist also in einem gesunden T-Zell-System zu



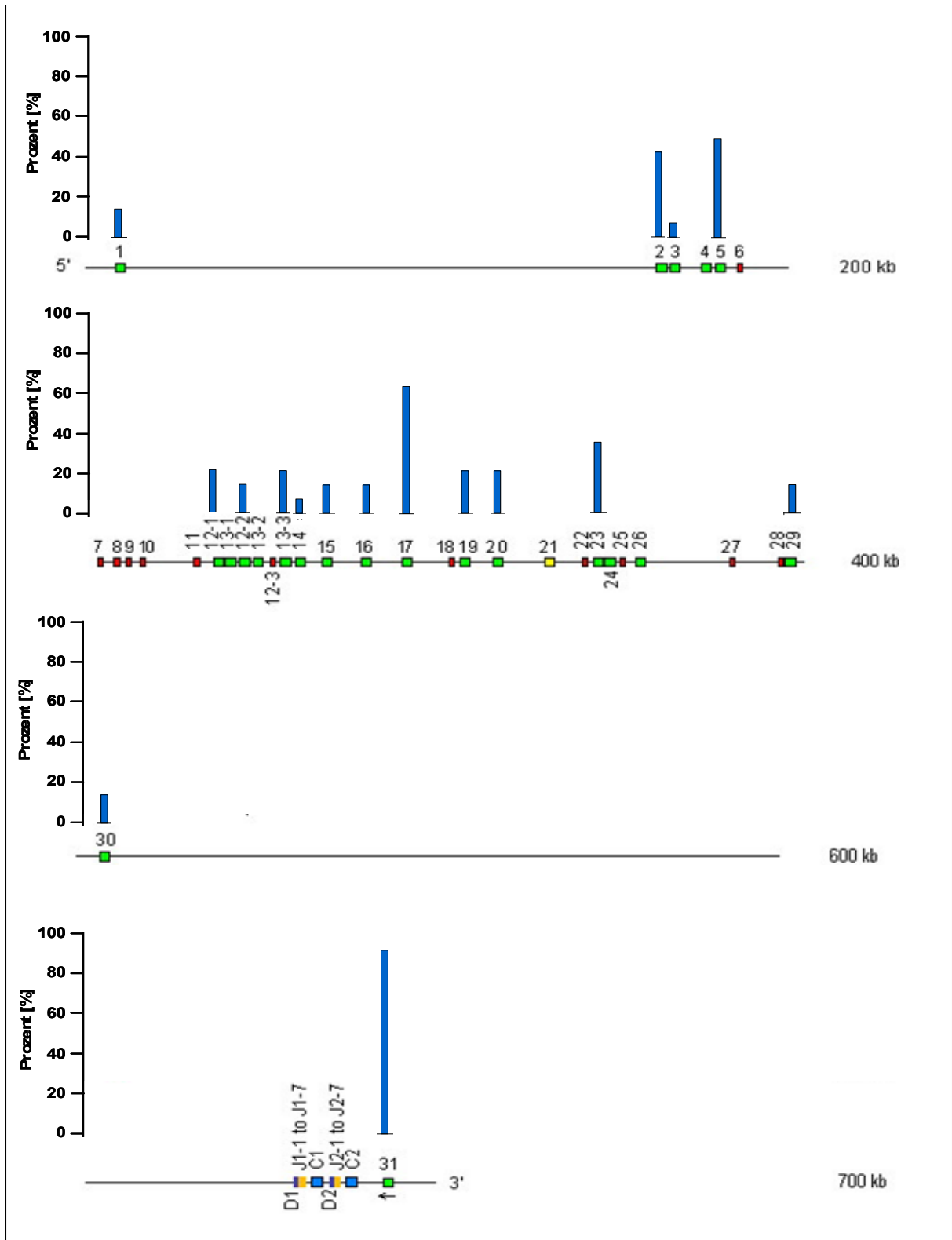
erwarten, dass, sowohl in der cDNA des Thymus als auch der der Milz, alle 20 mit der C-Region somatisch rekombinierbaren V-Regionen nachzuweisen sind.

Im Folgenden wurden die Transkripte aus 13 thymischen Lymphomen und 5 dazugehörigen Milzen sowie aus einem Thymus und einer Milz einer unauffälligen *Atm*<sup>-/-</sup>-Maus sowie zudem aus 4 Thymi und Milzen von Wildtypmäusen hinsichtlich des rekombinierten *TCRβ*-Repertoires untersucht (**Abbildung 24**). Hierzu wurde die RNA aus den Proben gewonnen, in cDNA revers transkribiert und in PCR-Reaktionen eingesetzt (Kapitel 2.2.2.7). Die PCR-Produkte wurden in Agarosegelen analysiert. In den Thymi und Milzen der Wildtypmäuse sowie der unauffälligen *Atm*<sup>-/-</sup>-Maus konnten alle 20 erwarteten variablen *TCRβ* Regionen nachgewiesen werden (siehe exemplarisch **Abbildung 24A** und **B** jeweils **unten**). Die Größe der PCR-Produkte lag zwischen 200 bp und 300 bp. In den thymischen Lymphomen hingegen zeigte sich durch das Fehlen mehrerer Gelbanden ein deutlich eingeschränktes *TCRβ*-Repertoire (siehe exemplarisch **Abbildung 24A** und **B** jeweils **oben**). Die einzelnen untersuchten Gewebeproben unterschieden sich allerdings erheblich im Grad der Reduktion des *TCRβ*-Repertoires. Sowohl ein monoklonaler als auch ein polyklonaler Ursprung der untersuchten thymischen Lymphome konnte somit ausgeschlossen werden. Vielmehr handelte es sich bei den untersuchten Tumoren um oligoklonale Neoplasien.

In der Analyse der thymischen Lymphome konnte neben den reduzierten *TCRβ*-Repertoires auch eine erhebliche Veränderung in der Größe einiger nachgewiesener PCR-Produkte beobachtet werden (**Abbildung 24A** und **B** **oben**). Die Sequenzierung der mitunter mehr als 1 kb langen und somit bis zu fünfmal größeren PCR-Produkte ergab bei Vergleich mit den DNA-Sequenzen des Mausgenoms, dass es sich hierbei um nicht vollständig rekombiniertes Material aus dem genomischen *TCRβ*-Lokus der einzelnen variablen Region handelte. Die Tatsache, dass die PCR-Produkte sich in diesen speziellen Fällen ohne vorherige Klonierung sequenzieren ließen, deutet darauf hin, dass es sich um einen einzelnen Klon des jeweiligen V-Segmentes handelte, der in entsprechend großer Menge vorlag. Ein Vergleich der verwendeten Primersysteme mit den PCR-Produkten sowie der genomischen Lokalisation der V-Gene im *TCRβ*-Lokus (**Abbildung 25**) ergab, dass die unvollständig rekombinierten, variablen Regionen besonders häufig bei den variablen



**Abbildung 24: PCR Analyse des  $TCR\beta$ -Repertoires in Zellen des Wildtyp-Thymus, des  $Atm^{-/-}$ -T-Zell-Lymphoms sowie der Milzen.** Die Abbildung zeigt photographische Aufnahmen 1,6 %iger Agarosegele, in denen die PCR-Produkte der verschiedenen, mit 1-21 nummerierten  $TCR\beta$ -Primersysteme aufgetrennt wurden. In **A** zeigt der obere Teil der Abbildung die PCR-Analyse von Transkripten eines thymischen Lymphoms, der untere Teil die Analyse der Transkripte eines Wildtyp-Thymus. In **B** sind die Analysen der jeweiligen dazugehörigen Milzen gezeigt. Die Tabelle in **C** stellt den Zusammenhang zwischen dem Primersystem, der Position auf dem jeweiligen Gel und der genomischen Position der jeweiligen variablen Region im  $TCR\beta$ -Lokus dar. **M**: 100 bp-Marker, **K**: Kontrolle ohne DNA.



**Abbildung 25: Lokalisation und Häufigkeit von Mutationen im *TCRβ*-Lokus thymischer Lymphome.** Dargestellt ist die genomische Lokalisation der einzelnen V-, D-, J- und k-Gene des T-Zell-Rezeptors  $\beta$  in 5'-3'-Orientierung. Insgesamt sind 700 kb des Locus dargestellt. Die V-Gene sind in grün, Pseudogene in rot und gelb, D-Gene in dunkelblau (D1 und D2), J-Gene in orange, sowie C-Gene in hellblau (C1 und C2) dargestellt. Der Prozentsatz an T-Zell-Lymphomen, in denen inkorrekt rekombinierte V-Gene vorliegen, ist in blauen Balken über den betroffenen Gensegmenten dargestellt und kann an der y-Achse abgelesen werden.

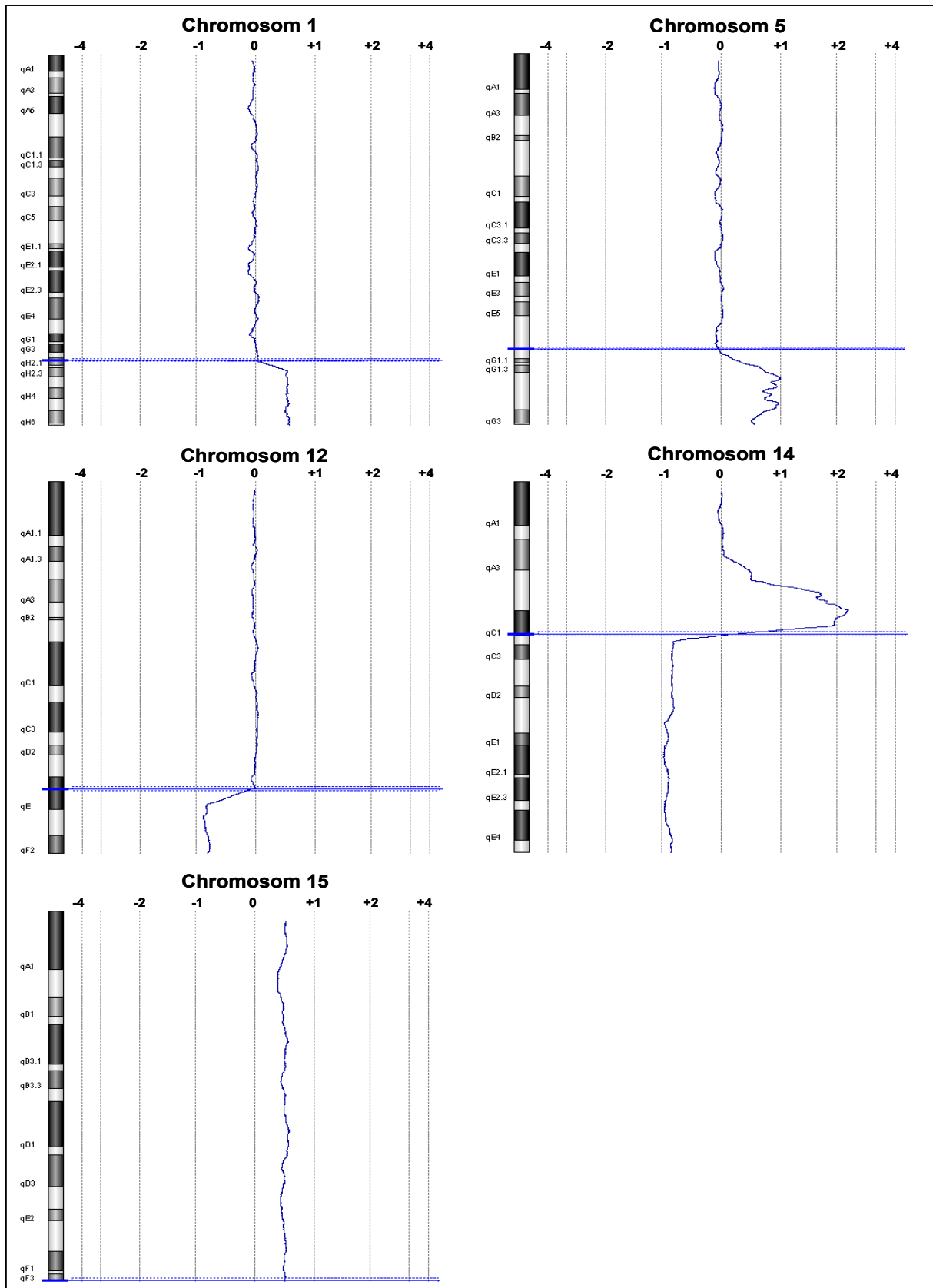
Segmenten von *TCRβV* 2 (43 %), *TCRβV* 5 (50 %), *TCRβV* 17 (64 %) und *TCRβV* 31 auftreten. Die variable Region 31 war sogar bei 93 % der untersuchten thymischen Lymphome inkorrekt rekombiniert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es sich bei den T-Zell-Lymphomen *Atm*-defizienter Mäuse um Neoplasien oligoklonalen Ursprungs handelt. Darüber hinaus war es möglich, in der Rekombination des *TCRβ*-Lokus genetische Defekte nachzuweisen, wobei jeweils einzelne dominierende Klone vorlagen, bei denen ein spezifisches V-Segment von fehlerhafter Rekombination betroffen war. In den PCR-Produkten dieser Klone konnte durch Sequenzierung atypischerweise zusätzliches genomisches Material des jeweiligen Locus nachgewiesen werden, was fehlerhafte Rekombinationsereignisse belegt. Insbesondere scheint das variable Segment 31 für inkorrekte Rekombination prädisponiert zu sein.

### 3.2.4. GENOMISCHE ANALYSE VON THYMISCHEN *ATM*<sup>-/-</sup> LYMPHOMEN

Anhand der zuvor beschriebenen, histopathologischen und immunophänotypischen Untersuchungen der vorherrschenden Zellpopulation in thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphomen konnte diese aberrante T-Zell-Population näher bestimmt werden. Um diese Zellpopulation auf genomischer Ebene weiter charakterisieren zu können, sollten im Folgenden etwaige distinkte chromosomale Imbalancen aufgespürt werden. Hierzu wurde genomische DNA aus Thymusproben von 25 *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäusen präpariert und mittels *array-based comparative genome hybridisation* (aCGH), auch als *matrix-based comparative genome hybridisation* (mCGH) bekannt, untersucht. In insgesamt 8 Fällen handelte es sich um ausgeprägte thymische Lymphome in einem Gewichtsbereich von 0,23-1,04 g je Thymus. Schon optisch waren diese thymischen Lymphome bei der Sektion deutlich als solche zu identifizieren (**Abbildung 13**). Alle anderen untersuchten Thymi der präparierten *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse waren in Bezug auf Gewicht und Größe nicht sofort als thymisches Lymphom zu diagnostizieren. DNA-Proben aus Thymi von Wildtypmäusen fungierten in der aCGH-Analyse als Referenzprobe.

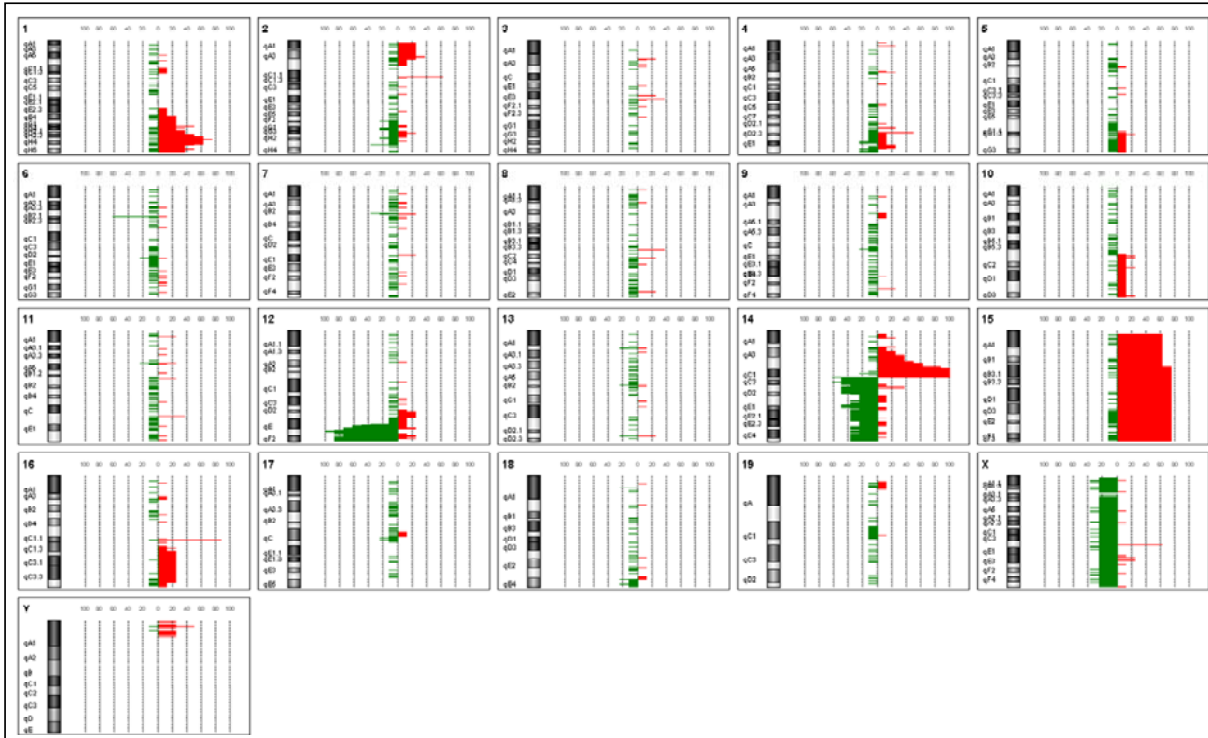
Die thymischen Lymphome zeigten in ihren aCGH-Profilen ein charakteristisches Muster chromosomaler Verluste und Zugewinne, welches in **Abbildung 26** exemplarisch für ein Lymphom gezeigt ist. Hier begann auf Chromosom 1 bei Bande



**Abbildung 26:** aCGH-Profil eines thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms (Nr. 11044). Die von chromosomalen Imbalancen betroffenen Chromosomen sind schematisch neben den Profilen gezeigt. Die blaue Linie stellt die Differenzen zwischen Tumor- und Referenzprobe in der Fluoreszenzintensität als logarithmische Werte zur Basis 2 dar ( $\log_2$ -Ratio). Rechts der Nulllinie erscheinen im thymischen Lymphom auftretende Gewinne, links Verluste genomischen Materials. Die senkrechten Linien markieren von links nach rechts die  $\log_2$ -Ratios -4, -2, -1, 0, +1, +2 und +4. Die horizontale blaue Linie kennzeichnet den Beginn der Aberration.

1H2.1 eine Amplifikation mit log<sub>2</sub>-Ratio-Werten von 0,5. Dies entspricht 1,5mal mehr Kopien des chromosomalen Materials als in der Wildtyp-Referenzprobe. Es liegen also in diesem Abschnitt insgesamt 3 Kopien der DNA vor. Der Zugewinn auf Chromosom 5 ab Bande 5G1.3 mit teilweise bis zu 4 DNA-Kopien stellte eine nur in diesem Fall vorkommende Besonderheit des exemplarisch gezeigten T-Zell-Lymphoms dar, während der DNA-Verlust von einer der beiden DNA-Kopien auf Chromosom 12 generell charakteristisch für das hier untersuchte thymische Lymphom war. Ebenfalls charakteristisch war die Amplifikation der DNA auf Chromosom 14 zwischen den Banden 14A3 und 14C1, die hier im Zusammenhang mit dem Verlust des gesamten weiteren Chromosomenarms einer der beiden Chromosomen-Kopien auftrat. Mit einer log<sub>2</sub>Ratio von 2 stellt dies eine Vervierfachung des chromosomalen Materials dar. Des Weiteren lag das gesamte Chromosom 15 in einer zusätzlichen Kopie vor.

Das Ergebnis der aCGH-Analyse sämtlicher thymischer Lymphome ist in **Abbildung 27** zusammengefasst. Es wird deutlich, dass alle hier untersuchten Lymphome eine



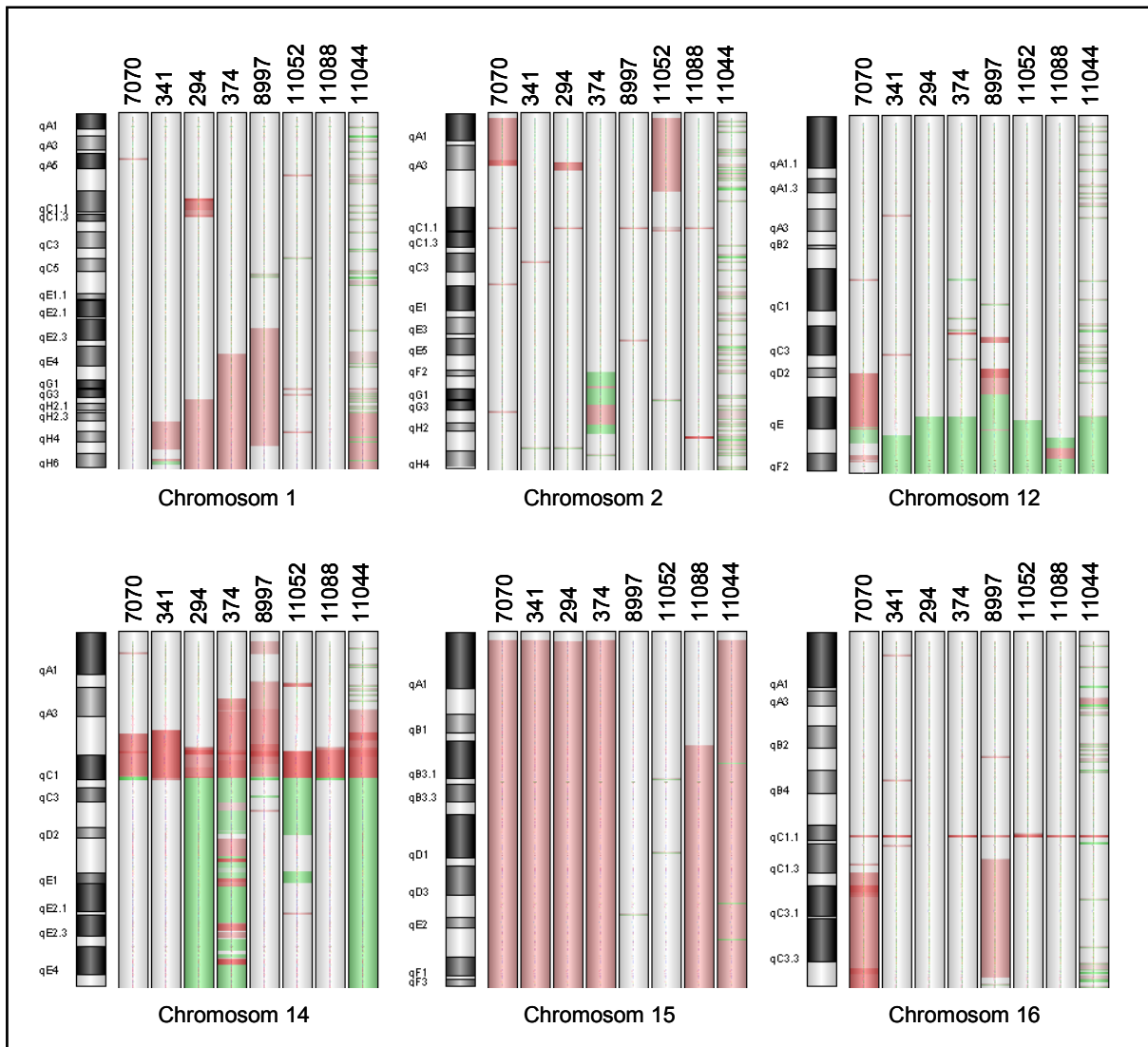
**Abbildung 27: Häufigkeitsverteilung von Amplifikationen und Deletionen aus aCGH-Profilen von 8 thymischen Lymphomen.** Jedes der 21 murinen Chromosomen wird durch ein eigenes Diagramm repräsentiert. Jeweils auf der linken Seite ist das Chromosom mit Bänderung schematisch gezeigt. In grün sind Deletionen, in rot Amplifikationen aufgetragen. Die Zahlen oberhalb der senkrechten Linien markieren den prozentualen Anteil der jeweiligen Aberration an der Proben Gesamtheit.

Amplifikation der Bande 14C1 auf Chromosom 14, häufig im Zusammenhang mit einer benachbarten Deletion in 14C1-C3 aufwies. Dies hatte in über 20 % der Fälle den Verlust eines gesamten Chromosomen-Arms zur Folge. Von Amplifikation und Deletion betroffene Regionen befanden sich auf diesem Chromosom in direkter Nachbarschaft und zudem in einem distinkten Bereich, der für die T-Zell-Rezeptor  $\alpha$ -Genfamilie kodiert. Auffällig war darüber hinaus auch eine Deletion auf Chromosom 12, die den Bereich 12E-F2 umfasst. In 100 % der untersuchten Fälle war der Verlust dieser minimal deletierten Region zu beobachten. In über 70 % der untersuchten thymischen Lymphome war ein Zugewinn auf Chromosom 15 nachweisbar, die sich in mehreren Fällen in einer Trisomie äußerte. Auf Chromosom 1 war in über 70 % der Fälle ein Zugewinn in 1H2.3 erkennbar.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Aberrationen wird in **Abbildung 28** für jede einzelne der 8 untersuchten Proben für die Chromosomen 1, 2, 12, 14, 15 und 16 dargestellt. Hier weist die farbliche Intensität auf den Grad der Ausprägung der chromosomalen Aberration hin. Bemerkenswert ist, dass der Zugewinn auf Chromosom 15 meist das gesamte Chromosom umfasste, allerdings von der Kopienzahl nie über das 1,5 fache hinausgingen. Auch bei den Deletionen, sowohl auf Chromosom 12 als auch auf Chromosom 14, handelte es sich ausnahmslos um den Verlust nur einer Kopie. Einzig bei der beschriebenen Amplifikation auf Chromosom 14 konnte bei einigen Tumoren ein Zugewinn von mehr als 6 Kopien beobachtet werden.

Von den acht durch aCGH untersuchten thymischen Lymphomen wurden vier Proben zur Validierung außerdem zusätzlich mittels klassischer CGH untersucht. Die durch aCGH entdeckten und oben beschriebenen größeren Deletionen und Zugewinne konnten alle bestätigt werden (nicht gezeigt).

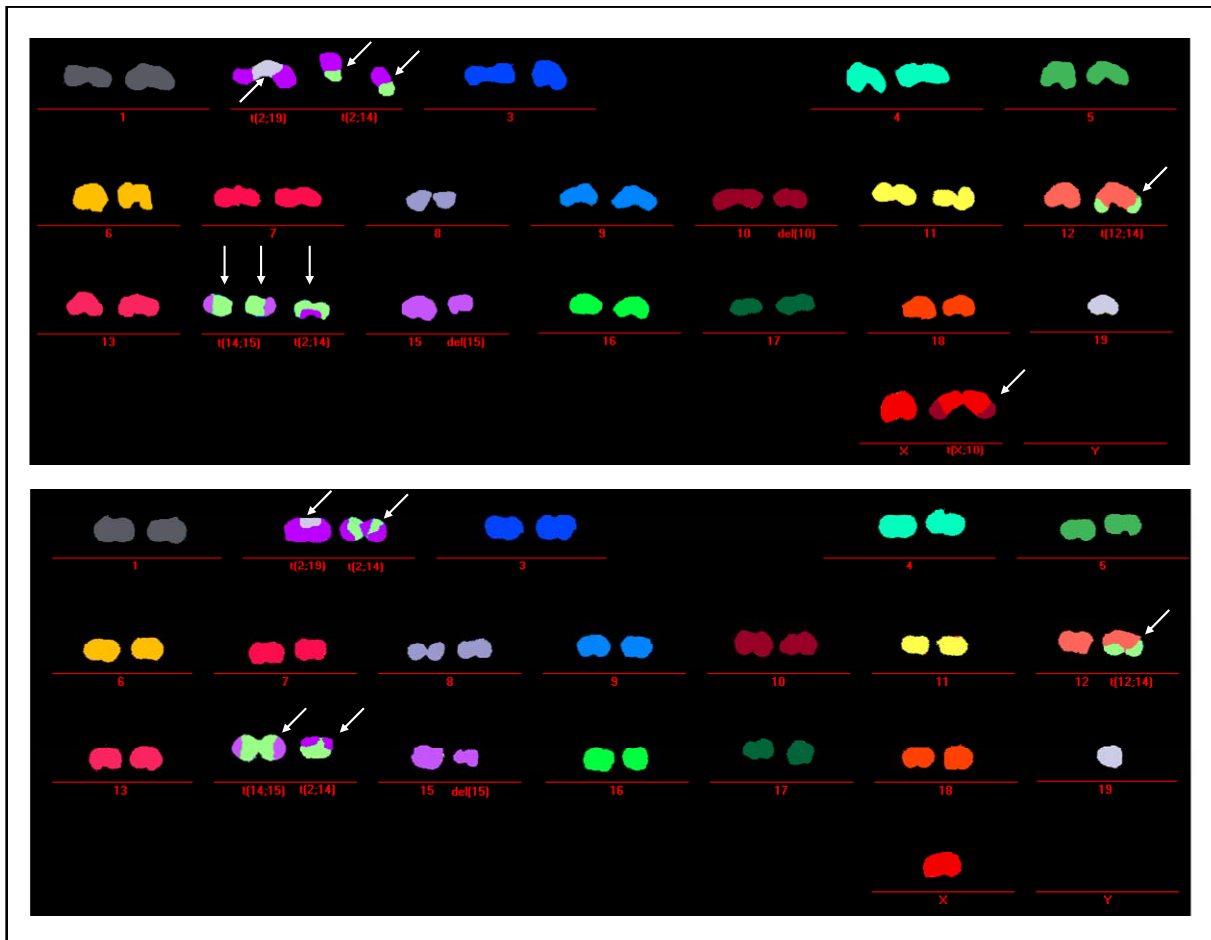
Vorherige Studien des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms beschreiben vor allem das Auftreten chromosomaler Translokationen. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten thymischen Lymphome sollten dahingehend charakterisiert werden und wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Anna Jauch, Heidelberg, einer M-FISH-Analyse unterzogen. Dabei werden chromosomenspezifische Painting-Proben mit ebenfalls chromosomenspezifischer Fluorochromzusammensetzung auf Metaphasen-chromosomen der zu untersuchenden Zellen hybridisiert. Dabei erhält das Chromatin der jeweiligen Chromosomen eine spezifische Färbung. Translokationen sind durch das Zusammenkommen unterschiedlicher



**Abbildung 28: Darstellung chromosomaler Imbalancen für 8 thymische *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome.** Links eines jeden Diagramms ist schematisch das jeweilige Chromosom mit Bänderung abgebildet. Über den Diagrammen sind die individuellen Tiernummern aufgeführt. Amplifikationen (rot) bzw. Deletionen (grün) eines jeweiligen Bereiches sind für jedes der 8 Lymphome an entsprechender Position dargestellt, wobei eine intensivere Farbgebung eine stärkere Ausprägung (extremere, vom Wert 0 abweichende log<sub>2</sub>-Ratios) der jeweiligen Aberration andeutet.

Chromosomenfarben sofort zu erkennen. In **Abbildung 29** werden die Ergebnisse für einen Fall (Nr 11088) gezeigt. Es zeigen sich in diesem Fall Translokationen zwischen den Chromosomen 2, 12, 14, 15 und 19. Die Ergebnisse der M-FISH-Analyse bestätigen somit zum einen die aus der Literatur bekannten chromosomalen Translokationen unter Einbezug des Chromosoms 14 und lassen darüber hinaus vermuten, dass zwischen den gezeigten Translokationen und den mittels aCGH nachgewiesenen chromosomalen Imbalancen ein Zusammenhang bestehen könnte.





**Abbildung 29: M-FISH-Analyse eines thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms (Nr. 11088).** Im oberen und unteren Teil der Abbildung wird jeweils eine unabhängig analysierte Metaphase des gleichen Tumors dargestellt. Die DNA eines jeden Chromosoms ist durch eine individuelle Farbe gekennzeichnet. Zweifarbige Chromosomen weisen auf eine Translokation hin. Die einzelnen Chromosomen sind nummeriert. Im Falle einer Aberration ist diese beschrieben. Deutlich sind Translokationen unter Beteiligung der Chromosomen 2, 10, 12, 14, 15 und 19 zu erkennen (weiße Pfeile).

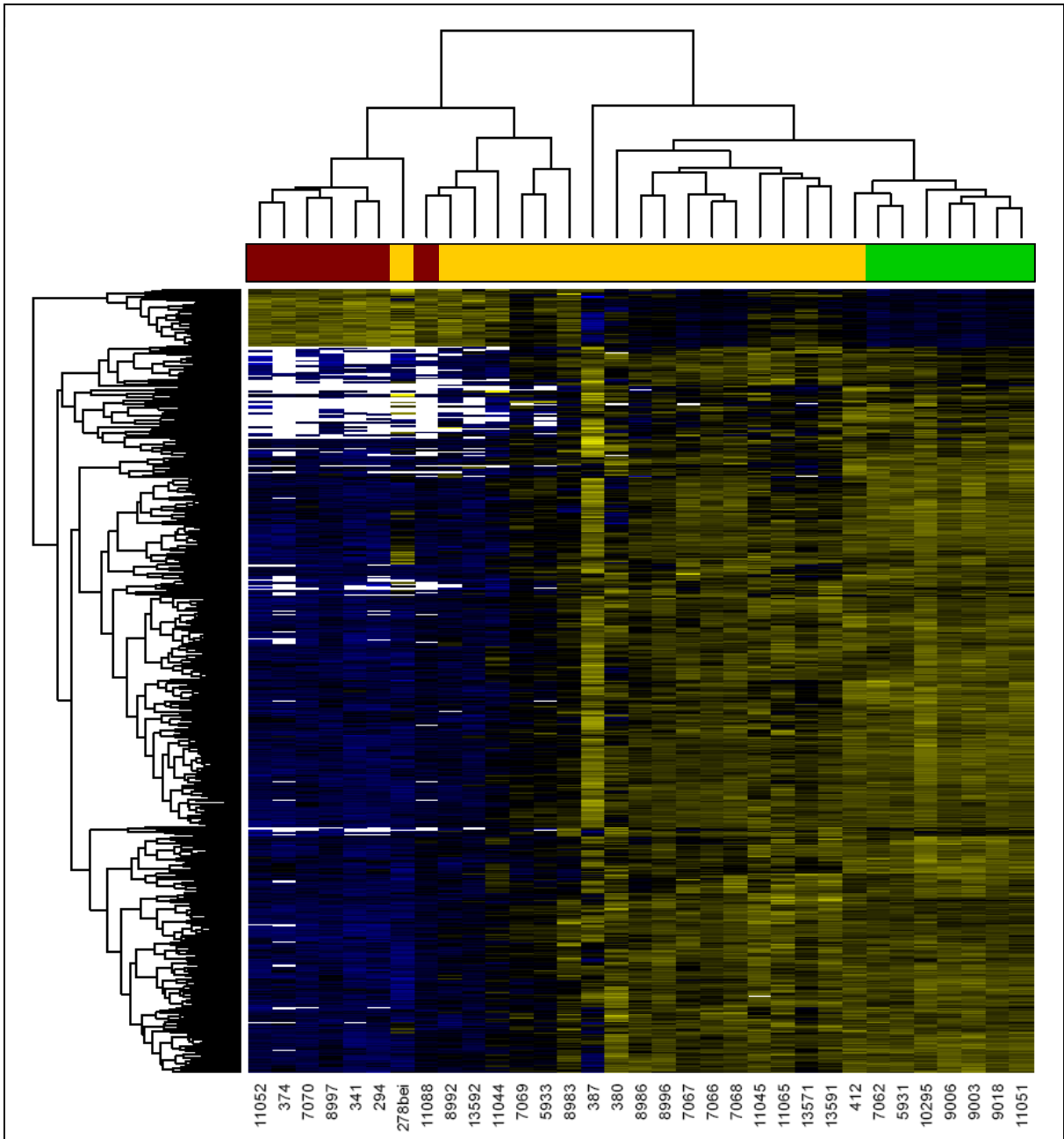
Die Thymi der 17 *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die kein makroskopisch sichtbares thymisches Lymphom aufwiesen, zeigten in der aCGH-Analyse ein heterogenes Bild. Sie sollen hinsichtlich chromosomaler Imbalancen in Kapitel 3.2.6 ausführlich behandelt werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der aCGH-Analyse, dass die thymischen Lymphome *Atm*-defizienter Mäuse über verschiedene, ihnen gemeinsame, chromosomale Imbalancen verfügen. Dabei waren sowohl die im *TCRα*-Lokus beginnende Amplifikation auf Chromosom 14 als auch eine markante Deletion auf Chromosom 12 bei 100 % der untersuchten Tumoren (n=7) zu beobachten.

### 3.2.5. GLOBALE ANALYSE DES GENEXPRESSIONSMUSTERS *ATM*-DEFIZIENTER THYMISCHER LYMPHOME

Um zusätzlich zu den genomischen Veränderungen Informationen über die differentielle Expression von Genen in thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphomen zu erhalten, wurden hiervon außerdem microarraybasierte Expressionsprofile erstellt. Insgesamt 7 thymische Lymphome, 14 *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom sowie 6 Wildtyp-Thymi wurden für die Expressionsstudie verwendet (siehe Kapitel 2.2.2.4). Die identifizierten differentiell exprimierten Gene des jeweiligen Ausgangsmaterials wurden durch Anwendung linearer Modelle (Limma, siehe 2.2.2.5) analysiert. Während sich die Expressionsmuster von 3 der oben erwähnten 4 *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi, die keine Lymphome und keine genetischen Aberrationen zeigten, nur in 12 Genen von den Expressionsmustern der Wildtyp-Thymi unterschieden (adjustierter p-Wert < 0,05), zeigte der Vergleich der Expressionsprofile der thymischen Lymphome mit den Expressionsprofilen der *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom und ohne genetische Aberration ein grundlegend verändertes Expressionsmuster in 3409 Genen (nicht dargestellt). Insgesamt wurden bei dem Vergleich der Expressionsdaten von (i) thymischen Lymphomen *versus* Wildtyp-Thymi, (ii) thymischen Lymphomen *versus Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom und ohne genetische Aberration, sowie (iii) Wildtyp-Thymi *versus Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom und ohne genetische Aberration insgesamt 7107 signifikant differentiell exprimierte Gene identifiziert. 3391 signifikant differentiell exprimierte Gene bilden die Schnittmenge der Gene aus dieser Analyse und der davor beschriebenen Analyse, wobei die logarithmischen Expressionsunterschiede (logFC; log *fold change*) einen Bereich von -6,06 bis +3,91 umfassen.

Die SAM-Analyse (siehe Kapitel 2.2.2.5) der Expressionsprofile aller untersuchten Thymi und die entsprechende Darstellung als *heatmap* zeigt eine klare Trennung der Expressionsmuster von thymischen Lymphomen und Wildtyp-Thymi (**Abbildung 30**). Insgesamt trennt die differentielle Expression von 810 Genen in dieser Analyse thymische *Atm*<sup>-/-</sup>-Lymphome von Wildtyp-Thymi. Bereits auf den ersten Blick sind zwei Gencluster zu erkennen, die signifikant unterschiedlich exprimiert sind. Ein 58 Gene umfassendes Cluster beinhaltet in thymischen Lymphomen höher exprimierte Gene. Das zweite Cluster beinhaltet 752 differentiell exprimierte Gene, die in ihrer Gesamtheit ein in Wildtyp-Geweben höheres Expressionsniveau zeigen. Auffällig ist



**Abbildung 30: heatmap einer SAM-Analyse der Expressionsprofile verschiedener Thymi.** Die Expression der jeweiligen Gene ist in gelb (erhöht gegenüber Referenz) oder blau (vermindert gegenüber Referenz) dargestellt. Weiße Flächen enthalten keine Information. Das Dendrogramm links zeigt, über alle Proben betrachtet, die Ähnlichkeit der Expressionswerte der einzelnen Gene. Die individuellen Tiernummern sind unten angegeben. Das Dendrogramm oben veranschaulicht die Ähnlichkeit der Expressionsmuster verschiedener Proben. Direkt darunter ist farblich der Genotyp bzw. der Tumorstatus des jeweils analysierten Thymus gekennzeichnet (rot: thymisches *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphom; gelb: *Atm*<sup>-/-</sup> ohne Lymphom, grün: *Atm*<sup>+/+</sup> (Wildtyp) ohne Lymphom).

hier, dass *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom zwei eigene Gruppen bilden, die das Expressionsmuster von Wildtyp-Thymi bzw. das Expressionsmuster thymischer Lymphome zeigen.

In letzterer Gruppe scheint bereits eine massive Akkumulation von aberranten T-Zellen vorzuliegen, ohne dass dies bisher mit Vergrößerung des Thymus einherging, da die Expressionsprofile weitgehend denen der Lymphome entsprechen.

Die Expressionsprofile der hier betrachteten Gruppen Wildtyp-Thymi, *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom und ohne genetische Aberration sowie thymische *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome zeigten zusammenfassend grundlegende Unterschiede, wobei die Zahl deregulierter Gene der verschiedenen Gruppen jeweils im Vergleich zu den thymischen Lymphomen am höchsten war. Diese Tatsache weist auf eine wesentlich veränderte transkriptionelle Situation in den *Atm*-defizienten T-Zell-Tumoren hin.

### **3.2.6. GENOMISCHE ANALYSE VON *ATM*<sup>-/-</sup>-THYMI OHNE MAKROSKOPISCH ERKENNBAREM T-ZELL-LYMPHOM**

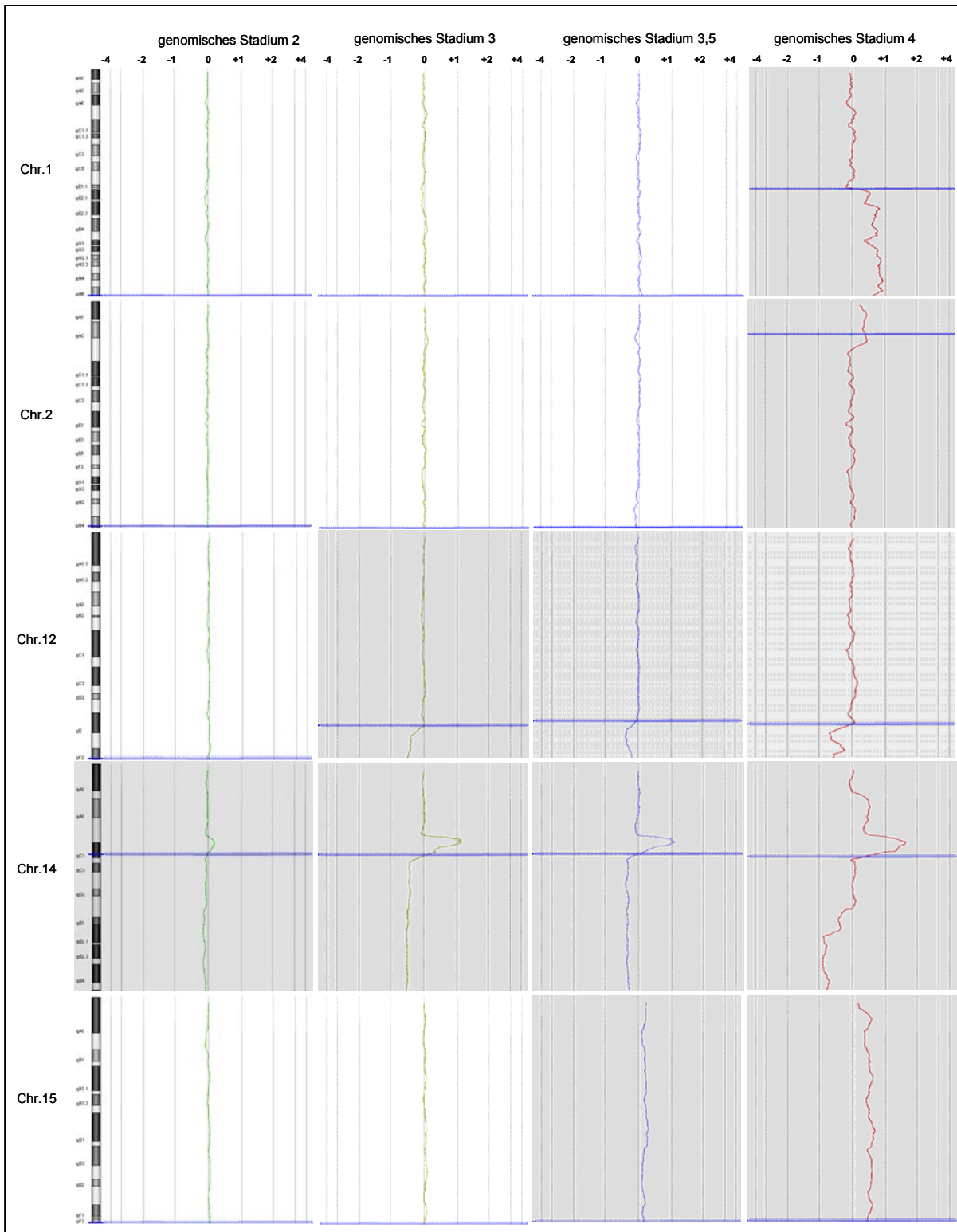
Präparierte Thymi der 17 *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die kein makroskopisch sichtbares thymisches Lymphom erkennen ließen, zeigten in der aCGH-Analyse ein heterogenes Bild. Während 4 Thymi keinerlei Veränderungen aufwiesen, waren in allen anderen untersuchten Thymi mehr oder minder ausgeprägte chromosomale Imbalancen festzustellen. 100 % der aCGH-Profile, die genomische Veränderungen aufwiesen, zeigten eine Amplifikation auf Chromosom 14, die denen der thymischen Lymphome ähnlich war, aber nicht in allen Profilen das in den thymischen Lymphomen beschriebene Ausmaß (log<sub>2</sub>-Ratio) besaß. Des Weiteren waren Deletionen der Banden qE-qF2 auf Chromosom 12 in 9 Proben zu detektieren. Ein unterschiedlich großer, aber die Kopienzahl von 3 nicht übersteigender Zugewinn auf Chromosom 15 war in 6 Fällen zu beobachten. In 4 Proben kamen weitere Imbalancen auf unterschiedlichen Chromosomen wie z. B. 1, 2 und 16 hinzu. Die Profile dieser letztgenannten Thymi glichen den aCGH-Profilen der thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome. Aufgrund dieser beschriebenen chromosomalen Imbalancen war es möglich, die Proben verschiedenen Gruppen zuzuordnen, die jeweils unterschiedlich viele Aberrationen aufwiesen und verschiedene genomische Stadien darstellen. Die Kriterien, die eine Einteilung der *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi in die verschiedenen hier

vorgeschlagenen Stadien ermöglichen, werden in **Abbildung 31** an exemplarischen aCGH-Profilen dargestellt.

Proben, die keine genomischen Imbalancen zeigten, wurden als Stadium 0 definiert (4 Fälle). In einem Fall konnten leichte Anzeichen ( $\log_2$ -Ratio  $> 0,3$ ; Länge  $< 1$  Mb) einer genomischer Amplifikation im *TCR  $\alpha$* -Lokus auf Chromosom 14 beobachtet werden (Stadium 1). In 3 Proben waren die Imbalancen im *TCR  $\alpha$* -Lokus auf Chromosom 14 deutlich umfangreicher (mehrere Mb; Stadium 2). In allen Proben der

hier definierten genomischen Stadien 1 und 2 waren keine weiteren Imbalancen auf anderen Chromosomen festzustellen. In 3 Proben konnten sowohl stärkere Amplifikationen im *TCR  $\alpha$* -Lokus auf Chromosom 14 ( $\log_2$ Ratio  $> 1$ ) als auch die in Kapitel **3.2.4** für thymische *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome beschriebene Deletion auf Chromosom 12 nachgewiesen werden (Stadium 3). In 2 Fällen kamen zudem Zugewinne auf Chromosom 15 hinzu (Stadium 3,5). Stadium 4 mit 4 vertretenen Fällen zeigt darüber hinaus genomische Imbalancen auch auf anderen Chromosomen wie z. B. Chromosom 1 und 2.

Thymi *Atm*-defizienter Mäuse können also, ohne dass sie makroskopische Vergrößerungen zeigen, bereits verschieden schwere genomische Imbalancen aufweisen. Es zeigte sich, dass, sobald erste Imbalancen festzustellen waren, bereits ausnahmslos der *TCR $\alpha$* -Lokus auf Chromosom 14 betroffen war. In den meisten Fällen konnten weitere Imbalancen beobachtet werden, in welche die Chromosomen 12, 15, 1 und 2 in spezifischer Reihenfolge involviert waren. In 4 Fällen zeigten die aCGH-Profile ein den aCGH-Profilen thymischer Lymphome ähnliches Bild. Basierend auf diesen Ergebnissen scheinen chromosomale Imbalancen in der Entwicklung thymischer Lymphome stufenweise zu akkumulieren.



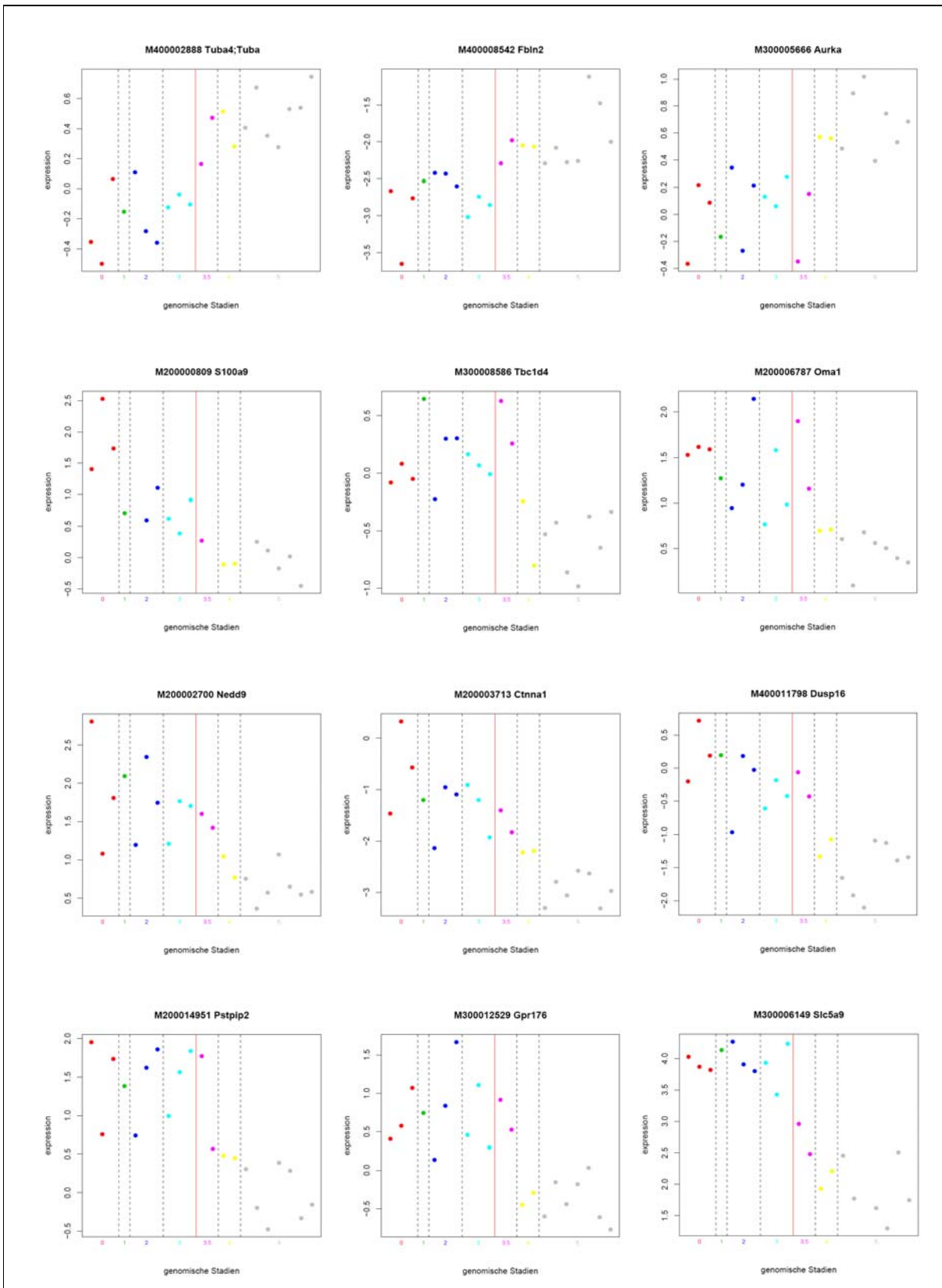
**Abbildung 31: Einteilung genomischer Stadien von *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi anhand von aCGH-Profilen.** Dargestellt sind die Profile der Chromosomen 1, 2, 12, 14 und 15. Links sind jeweils die Chromosomen mit schematischer Bänderung gezeigt. Die farbigen Linien zeigen jeweils die log<sub>2</sub>-Ratio der Proben im Vergleich zu Wildtyp an. Grau unterlegt sind Profile mit genomischen Imbalancen. Ganz links ist das genomische Stadium 2, ganz rechts das Stadium 4 zu sehen. Genauere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

### 3.2.7. „CUTPOINT“-ANALYSE

Wie im Kapitel 3.2.5 gezeigt, weisen sowohl thymische Lymphome als auch einige *Atm*-defiziente Thymi ohne erkennbares Lymphom ein gegenüber den Wildtyp-Thymi abweichendes Expressionsmuster auf. Darüber hinaus konnte in Kapitel 3.2.6 gezeigt werden, dass in vielen Thymi *Atm*-defizienter Mäuse schrittweise genomische Imbalancen akkumulieren, ohne dass bereits ein thymisches Lymphom erkennbar wäre. Im Folgenden sollten nunmehr Gene identifiziert werden, deren Expressionslevel, über die 6 in Kapitel 3.2.6 definierten Stadien genomischer Imbalancen betrachtet, nur einmalig hoch- oder herunter reguliert wird. Hierzu wurde die Stadieneinteilung einer sogenannten „cutpoint“-Analyse (siehe 2.2.2.5) der Expressionsdaten zugrundegelegt. Neben den Stadien 0, 1, 2, 3, 3,5 und 4 werden als weiteres genomisches Stadium in dieser Analyse die thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome hinzugenommen. Sie werden im Folgenden als genomisches Stadium 5 bezeichnet. In der Analyse werden Expressionsverläufe einzelner Gene auf

Grundlage der genomischen Stadien erkannt, deren Änderung zwischen zwei Stadien in Progressions-Richtung verläuft und nicht wieder revidiert wird. Die gewonnenen Resultate sind in **Abbildung 32** dargestellt. Insgesamt konnten 12 Gene identifiziert werden, die einen Wendepunkt (= *cutpoint*) ihrer Expression entlang der 7 betrachteten genomischen Stadien aufweisen. Drei dieser Gene (*Tuba4: tubulin alpha 4*; *Fbln2: fibulin 2*; *Aurka: Aurora kinase a*) zeigten eine niedrigere Expression in den genomischen Stadien 0-3 im Gegensatz zu einer in den genomischen Stadien 3,5-5 erhöhten Expression. Bei den übrigen hier identifizierten 9 Genen lässt sich der gegenläufige Trend beobachten. Es handelt sich dabei im Einzelnen um die Gene *S100a9* (*S100 calcium binding protein A9*), *Tbc1d4* (*TBC 1 domain family, member 4*), *Oma1* (*metalloprotease related protein 1*), *Nedd9* (*neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 9*), *Ctnna1* (*catenin alpha*), *Dusp16* (*dual specificity phosphatase 16*), *Pstpip2* (*proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2*), *Gpr176* (*G-protein coupled receptor 176*) und *Slc5a9* (*solute carrier family 5 member 9*).

Auf Grundlage der in genomische Stadien unterteilten Expressionsdaten konnten insgesamt 12 Gene identifiziert werden, deren Expressionswerte sich, über die Stadien hinweg betrachtet, in bestimmten Wendepunkten signifikant ändern. Obwohl



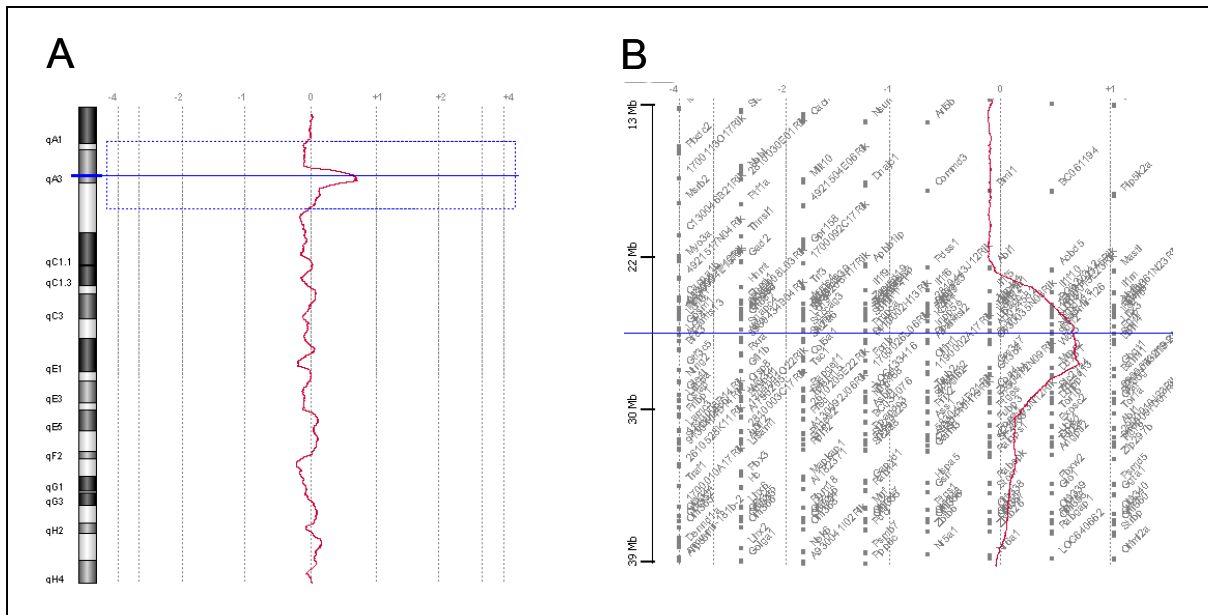
**Abbildung 32: „cutpoint“-Analyse der Expressionslevel verschiedener genomischer Stadien.** Der Verlauf der Expressionswerte über die verschiedenen genomischen Stadien ist für jedes der aus der Analyse gewonnenen Gene dargestellt. Auf der y-Achse sind die relativen Expressionswerte des jeweiligen Gens aufgetragen, auf der x-Achse sind die genomischen Stadien dargestellt. Jedes genomische Stadium ist durch eine eigene Farbe gekennzeichnet. Die Expressionswerte der jeweiligen Gene sind für jede Probe innerhalb eines genomischen Stadiums in derselben Farbe dargestellt.



diese Gene bezüglich ihrer chromosomalen Lokalisation primär unabhängig von den die genomischen Stadien definierenden Imbalancen sind, zeigen sie in ihrer Expression eine Korrelation zu den chromosomalen Veränderungen.

### 3.2.8. GENOMISCHE ANALYSEN DES *NOTCH1*-LOKUS UND EXPRESSIONSANALYSEN *NOTCH1*-REGULIERTER GENE

In 4 von 7 der mittels aCGH auf chromosomale Imbalancen hin untersuchten thymischen Lymphome konnte bei hochauflösender Betrachtung ein amplifizierter Bereich der Bande 2A3 auf Chromosom 2 identifiziert werden. In **Abbildung 33** ist exemplarisch ein aCGH-Profil von Chromosom 2, welches diesen spezifischen Zugewinn aufweist, dargestellt. Eine detaillierte Darstellung (**Abbildung 33B**) der jeweiligen Profile zeigte, dass das in diesem Bereich unter anderem kodierende *Notch1*-Gen, dessen exakt regulierte Funktion in der T-Zell-Entwicklung von großer Bedeutung ist und dessen Deregulation in der Maus zu der Entstehung von T-Zell-Neoplasien führen kann (Pear *et al.*, 1996), signifikant amplifiziert vorliegt. Dies ließ vermuten, dass eine prinzipielle Deregulation des *Notch1*-Gens die Entstehung der thymischen Lymphome in *Atm*-defizienten Mäusen erklären könnte. Die Tatsache, dass nicht alle analysierten thymischen Lymphome einen *Notch1*-Zugewinn aufzeigen, könnte darauf hindeuten, dass dort eine aus akuten myeloischen Leukämien (AML) bekannte sowie in anderen Mausmodellen beschriebene Mutation in der für die extrazelluläre Domäne des Notch1-Proteins kodierenden Region des Gens stattgefunden hat. Dies hätte eine konstitutive Aktivierung der intrazellulären Domäne des Notch1-Proteins zur Folge. Die Sequenzierung der Notch1-Transkripte aller hier in der aCGH untersuchten thymischen Lymphome sollte Aufschluss darüber liefern, ob auch hier in den Proben mit nicht amplifiziertem *Notch1*-Lokus aktivierende Mutationen vorliegen könnten. Die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigten diese Vermutung jedoch nicht: In keinem der T-Zell-Lymphome konnte eine aktivierende Mutation im *Notch1*-Transkript oder andere kodierende Aminosäure-Austausche bewirkende Mutationen festgestellt werden.

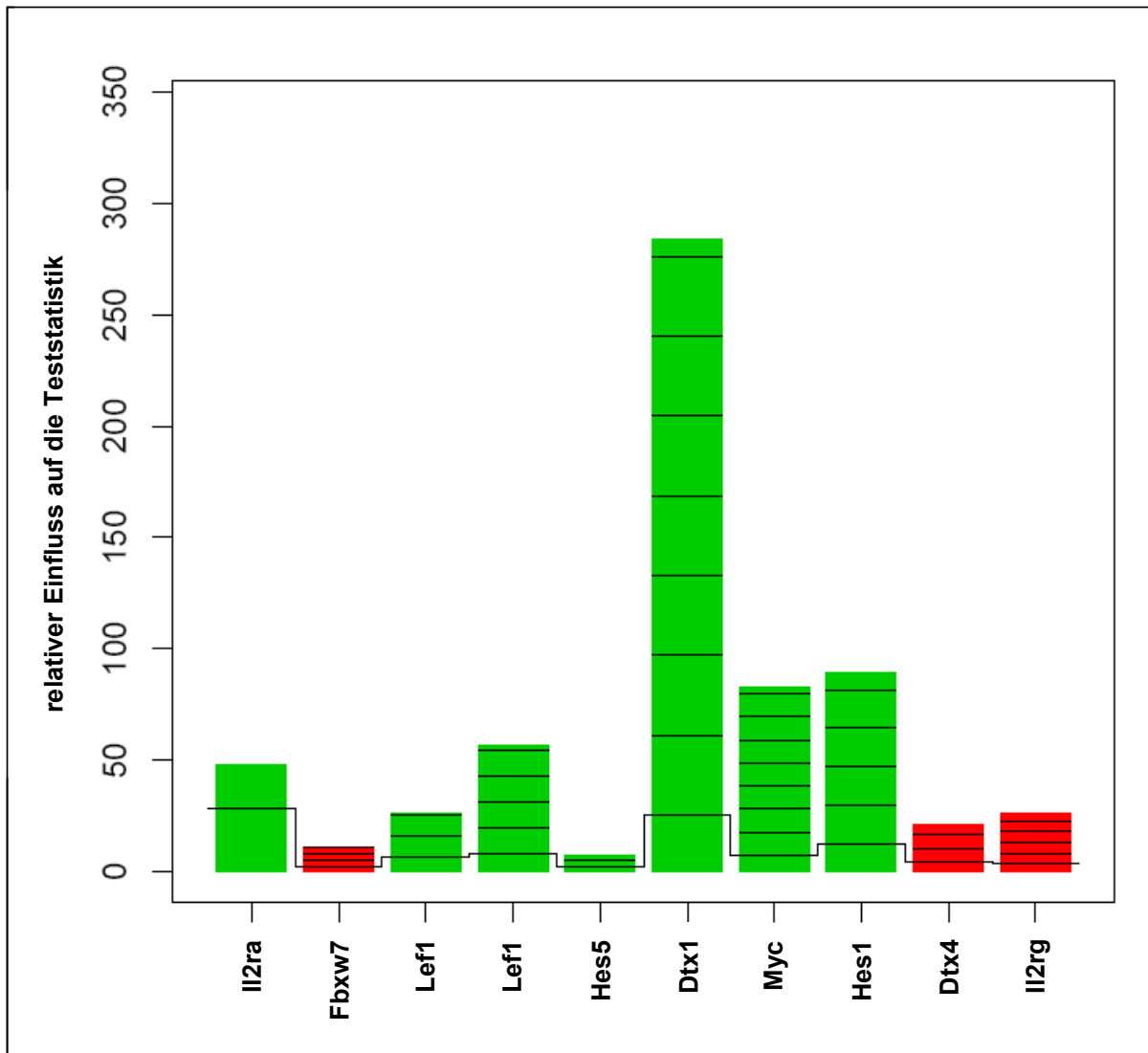


**Abbildung 33: aCGH-Profil von Chromosom 2 eines *Atm*<sup>-/-</sup> thymischen Lymphoms.** In **A** ist links neben dem Profil das Chromosom mit schematischer Bänderung gezeigt. Die rote Linie markiert den Verlauf der log<sub>2</sub>-Ratios eines thymischen Lymphoms im Vergleich zu Wildtyp-Thymus. Vertikale Parallelen zur y-Achse markieren die log<sub>2</sub>-Ratios -4, -2, -1, 0, +1, +2 und +4. Abweichungen von der Nulllinie nach rechts bedeuten Amplifikationen im thymischen Lymphom. Der blaue Rahmen markiert den in **B** vergrößert dargestellten Bereich. Hier ist auf der y-Achse die genaue chromosomale Position in Megabasen (Mb) angegeben. Die Lokalisation verschiedener Gene ist in grau eingetragen. Die blaue Linie in **A** und **B** liegt jeweils auf Höhe des *Notch1*-Genlokus.

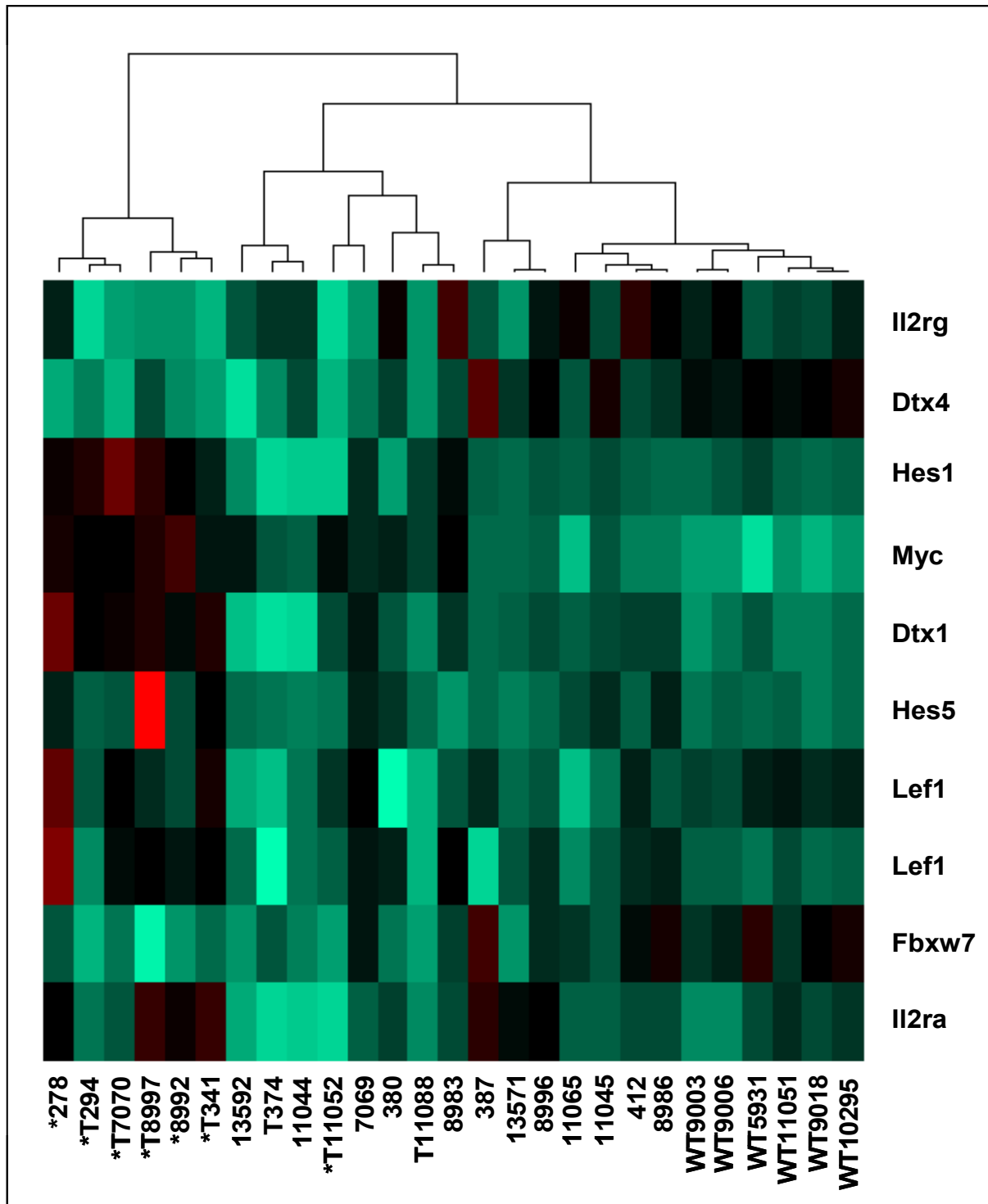
Um zu analysieren, ob der DNA-Zugewinn zu einer Deregulation der *Notch1*-Genfunktion führt und in der Folge funktionelle Auswirkungen auf die Expression der von *Notch1* regulierten Gene zeigt, wurden zunächst aus der Literatur bekannte, *Notch1*-regulierte Gene ausgewählt. Hierzu zählen sowohl die Gene *c-Myc* (*myelocytomatosis oncogen*), *Hes1* (*hairy and enhancer of split 1*) und *Lef1* (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) als auch einer der direkten *Notch1*-Liganden, *Dtx1* (*deltex 1*), der durch seine *Notch1*-vermittelte transkriptionelle Aktivierung eine positive *feedback*-Regulation erfährt. Daneben zählt *Ilra* (*interleukin receptor chain alpha*), auch bekannt als CD25, zu den von *Notch1* transkriptionell regulierten Genen. Die Bedeutung dieses Oberflächenmoleküls für die Charakterisierung von Entwicklungsstadien der normalen T-Zell-Entwicklung wurde in Kapitel 1.1.3 bereits erläutert. Die positive Deregulation der Expression der Expression von CD25 konnte zudem in Kapitel 3.2.2.3 für die *Atm*-defizienten thymischen Lymphome gezeigt werden.

Für die angestrebte Analyse *Notch1*-regulierter Gene wurden die Expressionswerte dieser Gene in den Expressionsprofilen der thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome, der

Wildtyp-Thymi und der *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom mit einem *globaltest* (siehe **2.2.2.5**) dahingehend überprüft, ob ihre Expressionsstärke mit dem genomischen *Notch1*-Status der untersuchten Thymi korrelierte. Das Ergebnis ist als *geneplot* in **Abbildung 34** dargestellt und zeigt eine höchst signifikante Korrelation ( $p = 5 \times 10^{-4}$ ). Am größten ist hier der Einfluss von *Dtx1* (*deltex 1*), *c-Myc* (*myelocytomatosis oncogen*), *Hes1* (*hairy and enhancer of split 1*) und *Lef1* (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) auf die Teststatistik. Die Expression aller dieser Gene korreliert signifikant positiv mit den genomischen *Notch1*-Zugewinnen. Dahingegen besitzen *Ilr2g* (*interleukin receptor 2 gamma chain*), *Dtx4* (*deltex 4*) und *Fbxw7* (*F-box and WD repeat domain containig 7*) aufgrund ihrer negativen Korrelation eine Aussagekraft bezüglich der Wildtypsituation des *Notch1*-Lokus. In einer *Cluster*-Analyse konnten alle untersuchten Thymusproben in Abhängigkeit von der Expression *Notch1*-regulierter Gene geordnet werden (**Abbildung 35**). Auffällig ist die klare Gruppierung jener Proben, die ein ähnliches Expressionsmuster *Notch1*-regulierter Gene sowie einen genomischen *Notch1*-Zugewinn aufweisen (in **Abbildung 35**, linker Teil: mit \* gekennzeichnete Proben). In 2 der 6 Fälle handelte es sich dabei auch um ein thymisches Lymphom. Für eine Probe eines thymischen Lymphoms mit genomischem *Notch1*-Zugewinn (Nr. 11052) konnte keine erhöhte Expression *Notch1*-regulierter Gene festgestellt werden. Die Probengruppe mit genomischen *Notch1*-Zugewinnen sowie erhöhter Expression *Notch1*-regulierter Gene unterscheidet sich signifikant von allen anderen analysierten Proben. Die verbleibenden Proben unterteilen sich in zwei weitere Probencluster, wobei eines 6 Wildtyp-Fälle sowie 7 *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom beinhaltet. Das andere, insgesamt 8 Proben umfassende Cluster schließt 3 thymische Lymphome sowie 5 *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom ein (siehe Dendrogramm in **Abbildung 35**).



**Abbildung 34: geneplot der globaltest-Analyse Notch1-regulierter Transkripte.** Aufgetragen ist der relative Einfluss der jeweiligen Expressionssonden aus der Microarray-Analyse auf die Teststatistik des *globaltests*. Bei mehreren gleichnamigen Nennungen liegen mehrere unterschiedliche Sonden für das gleiche Gen vor. In grün sind Transkripte gezeigt, deren Expression positiv mit der genomischen *Notch1*- Amplifikation korreliert, in rot sind die Transkripte gezeigt, deren Expression negativ mit der *Notch1*- Amplifikation korreliert. Die schwarze, horizontal gestufte Linie markiert die einfache Standardabweichung unter Nullhypothese. Die Querlinien in den Balken zeigen Vielfache der Standardabweichung an.



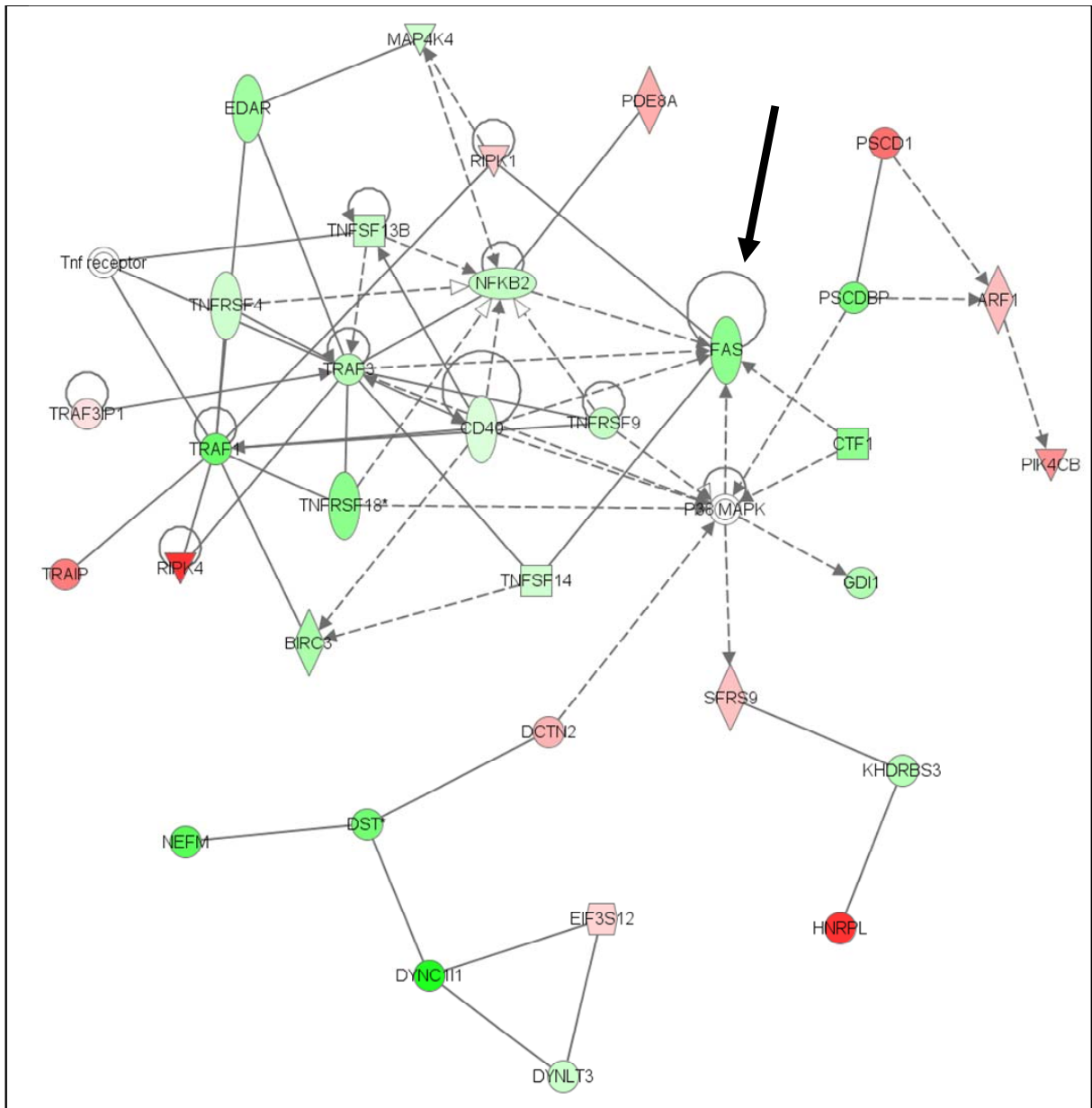
**Abbildung 35: heatmap einer cluster-Analyse Notch1-regulierter Transkripte.** Die einzelnen, untenstehend genannten Proben wurden in der Analyse anhand der Expression der rechts stehenden Transkripte geordnet. Grüne Flächen markieren eine verminderte Expression, rote Flächen eine erhöhte Expression gegenüber der Referenz-RNA. Die Farbintensität gilt als Maß für die Expressionsstärke. Die murine Identifikationsnummer bildet den Probenamen. Wildtyp-Proben steht im Namen ein „WT“, Tumorproben ein „T“ voran. Alle Proben, außer den Wildtypen, haben den Genotyp *Atm*<sup>-/-</sup>. \* kennzeichnet Proben mit einer genomischen, durch aCGH nachgewiesenen *Notch1*-Amplifikation. Das Dendrogramm am oberen Rand der Abbildung veranschaulicht den Grad der Ähnlichkeit der unten aufgeführten Proben bezüglich der Expression der rechts benannten Transkripte in.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass in einer Subgruppe thymischer Lymphome das T-Zell-entwicklungsspezifische Gen *Notch1* auf genomischer Ebene amplifiziert vorliegt und dass daraus in 86 % der Fälle eine transkriptionelle Deregulation *Notch1*-abhängig exprimierter Gene resultiert. Die Expression der aus der Literatur bekannten *Notch1*-abhängig exprimierten Gene korreliert allerdings nicht in allen Fällen auf gleiche Weise mit dem genomischen *Notch1*-Zugewinn. Besonders stark ausgeprägt assoziieren die Expressionswerte von *Dtx1*, *Lef1*, *c-Myc* und *Hes1* mit dem *Notch1*-Zugewinn. Während die Expression von *Ilra* und *Hes5* die Teststatistik in geringem Maße beeinflussen, korreliert die Expression von *Fbxw7*, *Ilrg* und *Dtx4* negativ mit dem genomischen Zugewinn von *Notch1*.

### 3.2.9. NETZWERKANALYSE VON EXPRESSIONSDATEN UND DEREN DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE VALIDIERUNG

Die Deregulation bestimmter Signalkaskaden oder regulatorischer Netzwerke ist ein in der Tumorgenese häufig beobachtetes Phänomen. Durch Abgleich der in Abschnitt 3.2.5 identifizierten 3391 signifikant differentiell exprimierten Gene in thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphomen mit der *software*-integrierten Literaturliteraturdatenbank *Ingenuity* war es hier möglich, Netzwerke deregulierter Gene zu entwerfen. Dabei wurden die zu überprüfenden Expressionsdaten mit den kuriierten Datenbankeinträgen aus Literaturangaben verglichen. In dieser Datenbank sind sowohl Funktionen des jeweiligen Genprodukts als auch alle bekannten Interaktionen mit anderen Genen und Genprodukten hinterlegt. Gene, die in ihren Expressionsdaten dereguliert sind und deren Genprodukte in irgendeiner Weise in der Datenbank miteinander in Beziehung stehen, werden hinsichtlich ihrer Funktion zusammen gruppiert. So ist es einerseits möglich, Genen in bereits bekannten kanonischen Regulationswegen Expressionsdaten zuzuordnen, andererseits können völlig neue Netzwerke auf Grundlage von Literatur- und Expressionsdaten erzeugt werden.

In **Abbildung 36** ist exemplarisch ein 33 Gene umfassendes, regulatorisches Netzkonstrukt gezeigt, welches auf Basis der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Expressionsdaten erstellt wurde. Es zeichnet sich vor allem durch Einbezug Apoptose assoziierter Gene aus. Der Algorithmus wies diesem Netzwerk unter den insgesamt 65 entworfenen Netzwerken die höchste Signifikanz zu. Als zentrales



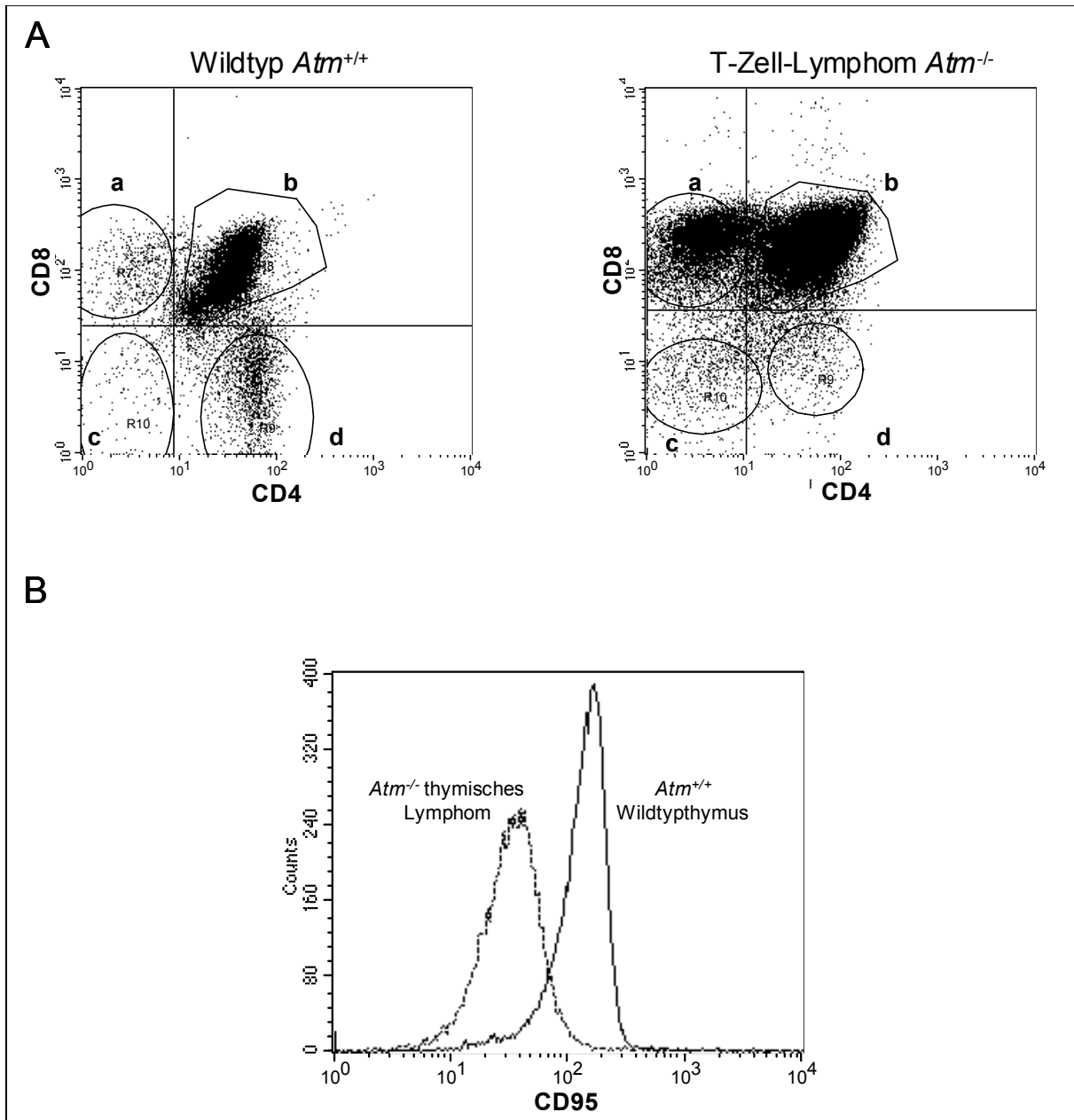
**Abbildung 36: Netzwerkanalyse mit in T-Zell-Lymphomen differenziell exprimierten Genen.** Schematisch dargestellt sind die Gene eines mit der software *ingenuity* gebildeten Netzwerkes. Eine rote Unterlegung des jeweiligen Symbols kennzeichnet die Überexpression des Gens in thymischen Lymphomen, die grüne Unterlegung zeigt eine verminderte Expression an. Aktivierende Interaktionen der dazugehörigen Genprodukte sind durch Pfeile, inaktivierende durch unterbrochene Pfeile dargestellt. Ein breiter schwarzer Pfeil weist auf FAS (CD95, Apo1) hin.

Molekül kann in diesem regulatorischen Netzwerk das Genprodukt CD95 (Apo1, Fas) betrachtet werden. Die Expressionsdaten zeigen eine negative Regulation der Expression dieses Apoptose-Rezeptors in thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphomen. Da CD95 in der induzierten Apoptose eine zentrale Funktion einnimmt, lag der Verdacht nahe, dass die Inaktivierung oder die im Verhältnis zu Wildtyp-T-Zellen reduzierte Oberflächenexpression zu einem verminderten Ansprechen auf apoptotische Stimuli

führen könnte. Um die aus Microarray-Daten abgeleitete Beobachtung der reduzierten CD95-Expression mit einer unabhängigen Methode zu validieren sowie zu überprüfen, ob die reduzierte Expression auch eine verringerte CD95-Präsentation an der Zelloberfläche der jeweiligen Zellen zur Folge hat, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. T-Zellen des Wildtyp-Thymus und Zellen aus einem thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphom wurden hierzu mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD95 gefärbt und analysiert. In **Abbildung 37** werden die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt. Die Analyse der Antikörperfärbung gegen CD4 und CD8 (**Abbildung 37A**) zeigte die in Kapitel 3.2.2.1 bereits ausführlich beschriebene Verteilung der spezifischen T-Zell-Entwicklungsstufen eines Wildtyp-Thymus, während im thymischen Lymphom die Akkumulation der DP- und CD8 SP-Population erneut bestätigt werden konnte. Die in **Abbildung 37B** übereinander gelegten Analysen der jeweiligen DP-Zellen von Wildtyp-Thymus und Lymphom zeigen eine Reduktion der CD95-Expression an den Zelloberflächen von Zellen des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms auf 1/10 des Wertes normaler T-Zellen.

Mit der *ingenuity*-gestützten Auswertung der Expressionsdaten thymischer Lymphome ist es also gelungen, Netzwerke differentiell exprimierter Gene zu bilden. Das Netzwerk mit höchster Signifikanz stellte in der Mehrheit Apoptose assoziierte Gene dar. Hier fiel unter anderem das proapoptotische Gen *CD95* (*Apo1*, *Fas*) durch verminderte Expression in thymischen Lymphomen auf. Als Validierung auf Proteinebene kann das durchflusszytometrische Ergebnis der reduzierten CD95-Expression auf der Zelloberfläche von T-Zellen des thymischen Lymphoms gelten. Die konkrete Bedeutung dieser Expressionsminderung für den Mechanismus der Entstehung des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms muss jedoch durch weitere Studien erforscht werden.





**Abbildung 37: FACS-Analyse von Zellen aus Wildtyp-Thymus bzw.  $Atm^{-/-}$  T-Zell-Lymphom hinsichtlich der Expression von CD95.** In **A** ist die FACS-Analyse von Zellen eines Wildtyp-Thymus ( $Atm^{+/+}$ ) links und eines thymischen Lymphoms ( $Atm^{-/-}$ ) rechts nach Antikörperfärbung gegen CD4 (x-Achse) und CD8 (y-Achse) dargestellt. Die einzelnen Populationen (**a**) CD8SP (CD8 *single positive*), (**b**) DP (*double positive*), (**c**) DN (*double negative*) und (**d**) CD4SP (CD4 *single positive*) sind umrandet. Die CD95-spezifischen Anlaysen der DP Populationen aus jeweils **b** wurden in **B** übereinandergelegt. In diesem Histogramm ist die Intensität der CD95-Expression auf der x-Achse aufgetragen, die Anzahl gezählter Zellen auf der y-Achse. Der mit einer durchgezogenen Linie dargestellte Graph im Histogramm zeigt die CD95-positiven Zellen der DP Wildtyp-Population an, der unterbrochene Graph kennzeichnet die CD95-positiven Zellen der DP Population des  $Atm^{-/-}$  thymischen Lymphoms.



## 4. Diskussion

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) zählt aufgrund seines aggressiven Verlaufs zu den hochmalignen B-Zell-Lymphomen, dessen derzeitige Therapien keinerlei kurative Option bieten. Eine Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zur Entstehung dieser lymphatischen Neoplasie führen, ist deshalb von großer Relevanz.

Die Überexpression des Zellzykluspromotors *CCND1* als Folge der chromosomalen Translokation t(11;14) gilt als Kennzeichen des Mantelzell-Lymphoms. Bisherige Versuche, ein murines Modellsystem unter alleiniger Einbeziehung der *Cyclin D1*-Überexpression zu etablieren, scheiterten jedoch. Vielmehr scheinen zusätzliche genetische Aberrationen essentiell zur Entstehung dieser B-Zellneoplasie beizutragen. Als eine mögliche Schlüsselkomponente in den initialen Ereignissen der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms ist das Tumorsuppressorgen *ATM* identifiziert worden. Die Inaktivierung dieses Gens ist bereits in mehreren hämatopoetischen Neoplasien beobachtet worden und führt zu Defekten im DNA-Doppelstrangbruch-Reparatursystem sowie der Zellzykluskontrolle. Diese Prozesse sind auch in der somatischen Rekombination von B- und T-Zellrezeptoren von grundlegender Bedeutung. Im Mantelzell-Lymphom gerät das *Cyclin D1*-Gen, infolge von funktionellen Defekten in diesen Mechanismen, während der somatischen Rekombination des B-Zell-Rezeptors unter die transkriptionelle Kontrolle eines Immunglobulinpromotors. Die Kombination von *Cyclin D1*-Überexpression und *Atm*-Inaktivierung im murinen System erschien daher zur Etablierung eines Tiermodells der B-Zell-Lymphom-Pathogenese sinnvoll und stellte einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

Bereits die singuläre Inaktivierung des *Atm*-Gens in der Maus führt zunächst zu Defekten in der T-Zell-Entwicklung und resultiert langfristig in der Entstehung thymischer Lymphome. Die genaue, immunophänotypische Charakterisierung der neoplastischen T-Zellen sowie die molekulargenetische Untersuchung dieser lymphatischen T-Zell-Neoplasie stellten den zweiten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar.

## 4.1. Das murine Mantelzell-Lymphom-Modell

Zur Nachbildung der pathogenetischen Situation des humanen Mantelzell-Lymphoms in der Maus wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurde durch Kreuzung *Atm*-defizienter Mäuse mit *Cyclin D1*-transgenen Mäusen die Kombination der beiden genetischen Aberrationen in allen Körperzellen des jeweiligen Individuums erzielt. Die aus den Kreuzungen resultierenden Genotypen wurden immunophänotypisch charakterisiert und beobachtet. Während alle *Atm*-defizienten Mäuse, unabhängig vom *Ccnd1*-Genotyp, an thymischen Lymphomen erkrankten und starben (3.1.1.3), entwickelte keine der durch Kreuzung erzeugten Mäuse eine B-Zell-Neoplasie (**Abbildung 14**).

Zum anderen wurde in einem Knochenmarkstransplantationsmodell *Atm*-defizientes Knochenmark isoliert und erfolgreich mit *Cyclin D1*-rekombinanten Vektoren oder Kontroll-Vektoren retroviral infiziert. Die daraus resultierenden *Cyclin D1*-überexprimierenden und *Atm*-defizienten oder nur *Atm*-defizienten hämatopoetischen Stammzellen wurden in letal bestrahlte Wildtypmäuse transplantiert. Das hämatopoetische System dieser Mäuse wurde durch die genetisch veränderten Stammzellen erfolgreich repopuliert. In der Langzeitbeobachtung dieser Mäuse stellte sich jedoch heraus, dass keine der transplantierten Mäuse ein Mantelzell-Lymphom oder irgendeine andere B-Zell-Neoplasie entwickelten. Eine geringe Anzahl transplantiertter Mäuse erkrankte an einem thymischen Lymphom. Dies geschah unabhängig davon, ob ein Kontrollvektor oder ein *Cyclin D1*-überexprimierender Vektor in das Genom der *Atm*-defizienten Stammzellen integriert war (3.1.2.2).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine *Atm*-Inaktivierung keinen signifikanten dominanten Einfluss auf die B-Zellentwicklung der Maus hat. Sämtliche Immunglobuline der B-Zellen wurden scheinbar korrekt rekombiniert und in normalen Mengen an der Zelloberfläche präsentiert. Das in dieser Arbeit beobachtete Phänomen der Ansammlung IgM exprimierender B-Zellen im Knochenmark von *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäusen (3.1.1.2.1) konnte hier nur im Zusammenhang mit der Entstehung eines thymischen Lymphoms festgestellt werden. Da alle untersuchten *Atm*-defizienten Tiere in der Peripherie normale B-Zell-Häufigkeiten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei zwar um die Folge einer beschleunigten B-Zell-Reifung im Knochenmark handelt, sich diese aber auf einen distinkten

Entwicklungsschritt beschränkt. Es handelt sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um den in **Abbildung 2e** geschilderten Übergang von der kleinen Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle. Eine Veränderung des in **Abbildung 2d** gezeigten, mit einer Proliferation verbundenen Übergangs der großen Prä-B-Zelle zur kleinen Prä-B-Zelle konnte durch die Tatsache, dass die B-Zell-Zahlen insgesamt nicht verändert waren, ausgeschlossen werden. Der mechanistische Zusammenhang zwischen der Entstehung eines T-Zell-Lymphoms und der beobachteten Veränderung in der frühen B-Zell-Entwicklung bleibt zu ergründen.

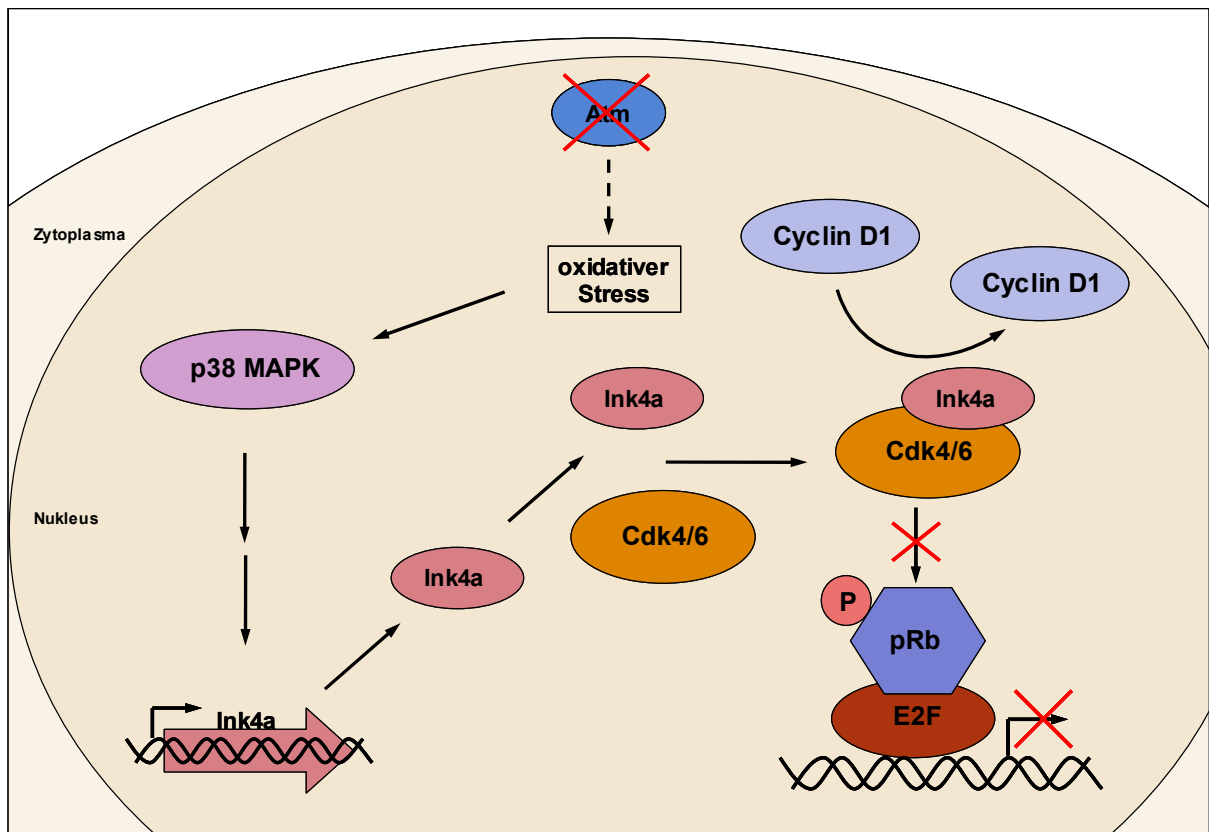
Interessanterweise fallen *Cyclin D1*-transgene Mäuse durch den Nachweis eines ungewöhnlichen B-Zell-Phänotyps auf, auch wenn in diesen Tieren keine neoplastischen Veränderungen zu beobachten waren. So wurde in allen untersuchten Mäusen, die ein *Cyclin D1*-Transgen unter der Kontrolle eines  $E\mu$ -Promotors exprimierten und bezüglich *Atm* einen Wildtyphintergrund aufwiesen, zunächst eine drastisch verminderte Anzahl der B-Zellen im Knochenmark festgestellt (**3.1.1.2.2**). Eine Veränderung der B-Zellen in der Peripherie konnte aber auch in diesem Fall nicht beobachtet werden. Vermutlich liegt in diesem Fall eine generelle *Cyclin D1*-abhängige Beschleunigung der B-Lymphozytenentwicklung vor, so dass die betroffenen B-Zellen das Knochenmark letztlich schneller verlassen als es in Wildtypmäusen der Fall ist. Tatsächlich bestätigen diese Ergebnisse die in der Literatur beschriebene Beobachtungen (Bodrug *et al.*, 1994).

Die immunphänotypische Untersuchung der B-Zellen dieser Tiere führte des weiteren zur Beobachtung, dass in Mäusen, die zusätzlich zum *Cyclin D1*-Transgen über eine hetero- oder homozygote inaktivierende Mutation des *Atm*-Gens verfügten, die beschriebene, in ihrer Zellzahl verminderte B-Zellpopulation wieder Wildtypniveau erreichte (**3.1.1.2.2**). Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass bereits ein monoallelischer Verlust von *Atm* einen zellulären Phänotyp in den B-Zellen der Maus hervorruft. Die einzige bisher beschriebene Beobachtung eines Phänotyps für *Atm*-heterozygote Mäuse wurde im Hinblick auf die Sensitivität für ionisierende Strahlung gemacht (Barlow *et al.*, 1999). Hier zeigte sich, dass *Atm*<sup>+/-</sup>-Mäuse nach Bestrahlung deutlich früher ergrauten als Wildtypmäuse. Das Ergrauen des Fells ist bei Mäusen grundsätzlich nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung zu beobachten und wurde auch in der vorliegenden Arbeit bei knochenmarktransplantierten Mäusen

festgestellt. Darüber hinaus war die Lebensdauer der *Atm*<sup>+/-</sup>-Mäuse nach Bestrahlung signifikant reduziert (Barlow *et al.*, 1999). Beide Beobachtungen geben Hinweise auf einen Phänotyp heterozygoter *Atm-knock-out*-Mäuse.

Aus der Beobachtung, dass *Cyclin D1*-transgene Mäuse mit zusätzlicher hetero- oder homozygoter Mutation des *Atm*-Gens, im Gegensatz zu *Cyclin D1*-transgenen Tieren mit Wildtypintergrund, über ein mit Wildtypmäusen vergleichbares Maß an B-Zellen im Knochenmark verfügen, lässt sich des weiteren schließen, dass der durch die *Atm*-Mutation stimulierte Mechanismus dem des *Cyclin D1*-Transgens entgegengerichtet ist. Cyclin D1 bindet und aktiviert als Zellzykluspromotor die cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk 4 / 6). Im Komplex hyperphosphorylieren sie das Retinoblastoma-Protein (pRB), wodurch die Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F aufgehoben und die Transkription von in der S-Phase des Zellzyklus benötigten Faktoren ermöglicht wird. Die Bindung von Cyclin D1 an Cdk 4 / 6 wird von dem Protein Ink4a durch Konkurrenz um die Bindungsstelle an Cdk 4 / 6 inhibiert, wodurch letztlich eine Regulation des Zellzykluspromotors Cyclin D1 erfolgt. Interessanterweise führt der Verlust von *Atm* in hämatopoetischen Stammzellen zu erhöhtem intrazellulären oxidativen Stress (Ito *et al.*, 2004), wodurch das Zellzyklusgeschehen direkt beeinflusst wird. Man geht davon aus, dass durch den oxidativen Stress der p38MAPK-Signaltransduktionsweg aktiviert (Ito *et al.*, 2006) und somit die Transkription von *Ink4a* stimuliert wird. In der Folge wird Cyclin D1 von den Bindungsstellen an Cdk 4 / 6 verdrängt, eine den Zellzyklus aktivierende Phosphorylierung des pRB verhindert und somit das Fortschreiten des Zellzyklus unterbunden (siehe **Abbildung 38**).

Diese Hypothese wird mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Zusammenhang mit einem *Cyclin D1*-Transgen Modell erstmals experimentell untermauert. Durch erhöhten oxidativen Stress (**Abbildung 38**), der offenbar bereits durch den Verlust eines einzigen *Atm*-Allels zum Tragen kommt, wird der B-lymphozytische Phänotyp des transgenen *Cyclin D1* aufgehoben (siehe Kapitel **3.1.1.2.2**). Die inaktivierende Mutation von *Atm* wirkt der Zellzyklusaktivierung durch *Cyclin D1* also direkt entgegen. Dies ist vermutlich der Grund, warum die Entstehung neoplastischer B-Zell-Veränderungen, wie sie durch die Kombination von *Cyclin D1*-Überexpression und *Atm*-Inaktivierung zu Beginn dieser Arbeit erwartet wurde, unterblieb. Ein murines Modell des Mantelzell-Lymphoms konnte somit, zumindest



**Abbildung 38: Schematische Darstellung des Cyclin D1 Funktionsmechanismus bei *Atm*-Verlust.** Durch den Verlust von *Atm* entsteht oxidativer Stress (Ito *et al.*, 2004). In Folge wird über den p38 Mapk Signalweg die Expression von Ink4a erhöht. Ink4a konkurriert mit Cyclin D1 um die gemeinsame Bindungsstelle von Cdk 4 / 6. Da das Retinoblastoma-Protein (pRb) folglich nicht phosphoryliert wird, inhibiert es weiterhin den Transkriptionsfaktor E2F und dadurch die Progression des Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase.

auf Grundlage des initial gewählten Mausmodellansatzes, nicht realisiert werden. Um dennoch die zu erwartenden Rekombinationsdefekte bei *Atm*-Inaktivierung und *Cyclin D1*-Überexpression im Hinblick auf darauffolgende neoplastische Veränderungen im Mausmodell untersuchen zu können, müsste der durch *Atm*-Inaktivierung entstehende oxidative Stress unterbunden werden. Dies könnte durch Injektion oder diätätische Gabe von Antioxidantien wie z. B. N-Acetylcystein erzielt werden. Alternativ bestünde die Möglichkeit, einen Teil der molekulargenetischen Konsequenzen des oxidativen Stresses durch das Einbringen und Überexprimieren des Gens *Bmi1*, als zusätzliches Transgen, abzufangen. *Bmi1* unterbindet die transkriptionelle Aktivierung des Cyclin D1-Kompetitors Ink4a. So konnte bereits in anderen Studien durch Überexpression des *Bmi1*-Gens in *Atm*-defizienten hämatopoetischen Stammzellen das durch oxidativen Stress bedingte, reduzierte Rekonstitutionspotential wiederhergestellt werden (Ito *et al.*, 2004). Durch die Überexpression von *Bmi1* und der damit einhergehenden *Ink4a*-Suppression könnte

also das transgene Cyclin D1 trotz des durch *Atm*-Inaktivierung entstehenden oxidativen Stresses an Cdk 4 / 6 binden und somit das Fortschreiten des Zellzyklus bewirken. Interessanterweise wurden, besonders in der aggressiven, blastischen Variante des Mantelzell-Lymphoms, sowohl die Überexpression des *Bmi1*-Gens infolge einer genomischen Amplifikation (Bea *et al.*, 2001) als auch die Deletion des *Ink4a* Locus nachgewiesen (Dreyling *et al.*, 1997; Pinyol *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist *Bmi1* auch in den thymischen Lymphomen *Atm*-defizienter Mäuse, die in dieser Arbeit umfangreich molekulargenetisch untersucht wurden, überexprimiert. Es liegt somit nahe, dass bei *Atm*-Defizienz die Inhibition des *Ink4a*-Lokus oder seines Genprodukts eine Voraussetzung für die Entwicklung einer lymphatischen Neoplasie darstellt.

Neuere Studien beschreiben auch andere Ansätze der Etablierung eines murinen Mantelzell-Lymphom-Modells. Einerseits wurde in diesen anstelle des in der vorliegenden Arbeit verwendeten transgenen Cyclin D1 eine trunkierte Variante des Cyclin D1 als Transgen verwendet. Diesem trunkierten Cyclin D1 fehlt die nukleäre Exportsequenz. Das translatierte Protein ist deswegen konstitutiv im Kern vorhanden. Als Folge davon entwickeln die Mäuse Lymphome der reifen B-Zellen (Gladden *et al.*, 2006). Grundsätzlich ähnelt das in diesen Experimenten verwendete Transgen einer natürlich vorkommenden Transkriptvariante des *Cyclin D1*-Gens. Allerdings handelt es sich bei dem im Mantelzell-Lymphom überexprimierten *Cyclin D1* nur in den seltensten Fällen um dieses Transkript. Es kann also als fraglich gelten, ob dieses Modell der humanpathologischen Situation entspricht.

In einem weiteren Ansatz wurden die auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Cyclin D1*-überexprimierenden Mäuse in fortgeschrittenem Alter wiederholt mit Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan), einem Immunsuppressivum, behandelt. Nach einiger Zeit entwickelten diese Mäuse B-Zell-Lymphome (Smith *et al.*, 2006). Da der positive Einfluss von Pristan auf die Induktion von Plasmazytomen bei der Antikörperproduktion in Mäusen bekannt ist, scheint es sich hier allerdings nicht um ein mechanistisches Modell des Mantelzell-Lymphoms zu handeln. Des Weiteren ist die Praktikabilität dieses Modells dadurch eingeschränkt, dass die Mäuse bereits vor der Behandlung ein sehr hohes Alter aufweisen müssen.

Anderweitige Versuche, ein murines Mantelzell-Lymphom-Modell, beispielsweise durch die Kombination der Überexpression von *Cyclin D1* mit einer Defizienz des



Tumorsuppressors p53, zu entwickeln, entsprachen eher der humanpathologischen Situation, da in der Tat eine Inaktivierung von p53 für die aggressive Variante des Mantelzell-Lymphoms nachgewiesen werden konnte (Greiner *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 1996). Dieses Mausmodell führte allerdings neben verschiedensten B-Zell-Lymphomen auch zur Entwicklung von T-Zell-Lymphomen und Osteosarkomen (Smith, persönliche Mitteilung, Atlanta, 2005).

Letztendlich konnte durch die Kreuzung zweier transgener Mäuse folgendes Mausmodell für die aggressive, blastoide Variante des Mantelzell-Lymphoms erzeugt werden: Bei den Transgenen handelte es sich zum einen um das Protoonkogen *c-Myc*, einen Transkriptionsfaktor, welcher als Transgen allein bereits B-Zell-Lymphome in Mäusen verursachen kann (Harris *et al.*, 1988). Zum anderen handelt es sich um *Interleukin 14*. *Interleukin 14* (IL14) wurde zuerst in Burkitt-Lymphom-Zelllinien identifiziert und als *high molecular weight B-cell growth factor* benannt. Interessanterweise zeigen die in den *c-Myc / Il14* doppelt transgenen Mäusen entstehenden Tumoren nicht nur die immunologischen Phänotypen der blastoiden Variante des Mantelzell-Lymphoms, sondern auch eine Cyclin D1-Überexpression. Allerdings ist die Verwendung von *Il14* als Transgen in einem Mausmodell des Mantelzell-Lymphoms fragwürdig, da für *Il14* in der humanpathologischen Situation bisher keinerlei Auffälligkeiten beobachtet werden konnten. Es scheint sich hier also um eine B-Zell-Neoplasie in der Maus zu handeln, welcher dem Mantelzell-Lymphom ähnliche Mechanismen zugrunde liegen, die in ihren molekularen Ursachen jedoch keine Gemeinsamkeiten mit dem humanen Mantelzell-Lymphom besitzt.

Zuletzt sei erwähnt, dass unterschiedliche Xenotransplantationsmodelle des Mantelzell-Lymphoms erzeugt wurden (M'Kacher *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007), die jedoch aufgrund der Methode kaum Einblicke in die ursächlichen Mechanismen der Pathogenese dieses Lymphoms gestatten (siehe Kapitel 1.3). Zusammenfassend betrachtet sind die derzeitigen Möglichkeiten, die grundlegenden Mechanismen des humanen Mantelzell-Lymphoms mit Hilfe muriner Modellsysteme zu erforschen, leider sehr begrenzt.

## 4.2. Die Ursprungszellen des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Atm*-defizienten Mäuse entwickelten thymische Lymphome und verstarben hieran in einem medianen Alter von 128 Tagen. Die Sektion der Tiere ergab, dass der Thymus derartig stark vergrößert vorlag, dass sowohl Herz als auch Lunge disloziert wurden. Die Untersuchung dieser Tumoren unter Verwendung immunologischer und molekulargenetischer Methoden war ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Durch die gewonnenen Erkenntnisse sollte das Verständnis der Bedeutung von *Atm* für die Tumorgenese vertieft werden. Zudem sollten Anhaltspunkte für die Ursache der Tumorentstehung in Folge von *Atm*-Defizienz geliefert werden.

Die histologische Analyse der präparierten thymischen Lymphome aus *Atm*-defizienten Mäusen zeigte, dass die Architektur des Thymus zerstört und eine Unterscheidung von Mark und Cortex nicht mehr möglich war. Das neoplastische Gewebe bestand überwiegend aus vergrößerten, granulären Zellen, welche blastischen T-Zellen ähnelten (Kapitel 3.2.1). Diese Beobachtungen hinsichtlich der Zellmorphologie decken sich dabei mit den in der Literatur beschriebenen (Barlow *et al.*, 1996).

Um die akkumulierenden T-Lymphozyten genauer einem spezifischen Stadium der intrathymischen T-Zell-Entwicklung zuordnen zu können, wurden sie vielfältigen spezifischen Antikörperfärbungen gegen immunologisch relevante Oberflächenmarker unterzogen und durchflusszytometrisch untersucht. Wie in der histopathologischen Studien konnte auch in der durchflusszytometrischen Untersuchung eine erhebliche Vergrößerung sowie eine hohe Granularität der Tumorzellen festgestellt werden. Das Ergebnis der Untersuchung mit den Antikörpern gegen CD4 und CD8 zeigte deutlich, dass es sich bei den Zellen des thymischen Lymphoms um doppelt positive (DP) T-Zellen handelte und dass sich darüber hinaus das Verhältnis von CD4 zu CD8 positiven Zellen im thymischen Lymphom deutlich zugunsten der CD8 positiven Zellen verschoben hatte (Kapitel 3.2.2.1). Bei den CD8 einfach positiven (SP) Zellen handelt es sich sehr wahrscheinlich um die Population der normalerweise nur in geringer Anzahl vorhandenen unreifen ISPs (*immature single positive*), die bereits CD8 aber noch kein CD4 exprimieren. Auch diese Beobachtung wurde bereits in vorherigen Studien

beschrieben (Barlow *et al.*, 1996; Elson *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Matei *et al.*, 2007). Der thymische Phänotyp der hier verwendeten Mäuse entspricht dem der Literatur, so dass hier gefundene weitere Effekte entsprechend von allgemeiner Bedeutung für das *Atm*<sup>-/-</sup> Mausmodell sein sollten.

In der normalen T-Lymphopoese werden ein Teil der CD4 CD8 DP T-Lymphozyten sowie die sich aus ihnen differenzierenden SP Zellen durch die Interaktion mit MHC-präsentierenden Zellen aktiviert. Als Folge dieser Aktivierung differenzieren sie weiter und repräsentieren unter anderem das Oberflächenantigen CD69. In der durchflusszytometrischen Analyse thymischer Lymphome mit gegen CD69 gerichteten Antikörpern konnte erstmalig beobachtet werden, dass die Aktivierung in den Zellen der untersuchten Lymphome massiv reduziert war (Kapitel **3.2.2.2**). Es lässt sich somit ableiten, dass die neoplastisch veränderten T-Zellen weder auf einen Kontakt mit den MHC-Komplexen reagieren, noch den Differenzierungsschritt zur Reifung in CD4 oder CD8 SP-Zellen vollziehen können. Folglich repräsentieren die Zellen des thymischen Lymphoms ein T-Zell-Entwicklungsstadium innerhalb der CD4 CD8 DP T-Zellen, in welchem kein Kontakt zu MHC-Komplexen etabliert werden konnte.

Bei den in dieser Arbeit weiter durchgeführten Analysen mit anti-CD25-Antikörpern ließ sich eine erhöhte Expression dieses Oberflächenmoleküls in den akkumulierten DP T-Zellen des thymischen Lymphoms nachweisen. CD25 ist auch als Interleukin 2-Rezeptor  $\alpha$  (Il $\alpha$ ) bekannt. Für normal entwickelnde T-Zellen ist die Expression dieses Moleküls ein charakteristischer Marker für doppelt negative (DN) Zellen des Stadiums DN2 und DN3, die sich in der Rekombination des T-Zell-Rezeptors  $\beta$  befinden. Eine hier beobachtete Deregulation der CD25-Expression spricht somit für schon in diesem frühen Stadium erfolgende, grundlegende Veränderungen in der T-Zell-Entwicklung der untersuchten neoplastischen Zellpopulation. Inwieweit die Überexpression von CD25 in seiner Funktion als Wachstumsfaktorrezeptor zur Proliferation und Akkumulation der aberranten T-Zellen beiträgt, bleibt in weiteren Studien zu klären.

Erstaunlich ist die in dieser Arbeit beobachtete niedrige Expression des T-Zell-Rezeptors  $\beta$  an der Zelloberfläche der neoplastischen T-Zellen des thymischen Lymphoms. Der Vergleich mit Wildtypzellen eines unveränderten Thymus zeigte, dass sowohl die DP-Zellen als auch die SP-Zellen unter normalen Umständen hohe

Expressionsniveaus dieses Rezeptors zeigen. Die hohe Expression an der Zelloberfläche ist notwendig, da in diesen T-Zellentwicklungsstadien die Rekombination der Rezeptoren abgeschlossen ist und diese mit den MHC-Komplexen der sie umgebenden kortikalen dendritischen Zellen oder Makrophagen zum Zwecke der negativen und positiven Selektion in Kontakt treten (siehe Kapitel **1.1.3**). In den Zellen der hier untersuchten thymischen Lymphome scheint diese Selektion stark eingeschränkt. Diese Vermutung wurde auch durch die Detektion der reduzierten CD69 Expression an der Zelloberfläche neoplastischer T-Zellen bestärkt, da CD69 als Marker für eine vorangegangene Aktivierung betrachtet wird.

Die reduzierte T-Zell-Rezeptor  $\beta$ -Expression scheint jedoch dahingehend überraschend, dass in PCR-Analysen zur Untersuchung der Tumorklonalität unter anderem festgestellt werden konnte, dass sich in den Transkripten mehrerer T-Zell- $\beta$ -Rezeptoren unvollständig rekombinierte, genomische Sequenzen der jeweiligen Loci der variablen Segmente wieder finden (**3.2.3**). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sich erste Aberrationen bereits in den sehr frühen Stadien DN2 und DN3 manifestieren. Dabei ist die in nahezu allen thymischen Lymphomen gefundene aberrante Rekombination des variablen Segments 31 besonders auffällig. Es kann nur vermutet werden, dass diese Häufung mit der ungewöhnlichen Lage des variablen Segments 31 innerhalb des *TCR $\beta$* -Lokus in Zusammenhang steht. Dieses variable Segment liegt in umgekehrter Leserichtung hinter den *D*-, *J*- und *C*-Segmenten (siehe **Abbildung 25**), wodurch die Rekombination dieses Segments womöglich ein besonders kritisches Ereignis darstellt. Die Tatsache, dass in thymischen Lymphomen *Atm*-defizienter Mäuse eine Anhäufung aberranter Rekombinationsereignisse des variablen Segments 31 zu beobachten ist, stützt deshalb die Annahme, dass *Atm* in der Rekombination der V-Segmente eine stabilisierende Rolle übernehmen könnte (Bredemeyer *et al.*, 2006).

In bisherigen Studien wurde zumeist vermutet, dass die Zellen des thymischen Lymphoms *Atm*-defizienter Mäuse in der Entwicklungsstufe jener CD4 CD8 doppelt positiven Zellen entsprechen (Winrow *et al.*, 2005; Matei *et al.*, 2007) und über einen normal rearrangierten T-Zell-Rezeptor  $\beta$  verfügen. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass erste genomische Aberrationen bereits im Entwicklungsstadium DN2 oder DN3 während des Rearrangements des T-Zell-Rezeptors  $\beta$  entstehen und zu einem inkorrekten T-Zell-Rezeptor  $\beta$ -Transkript

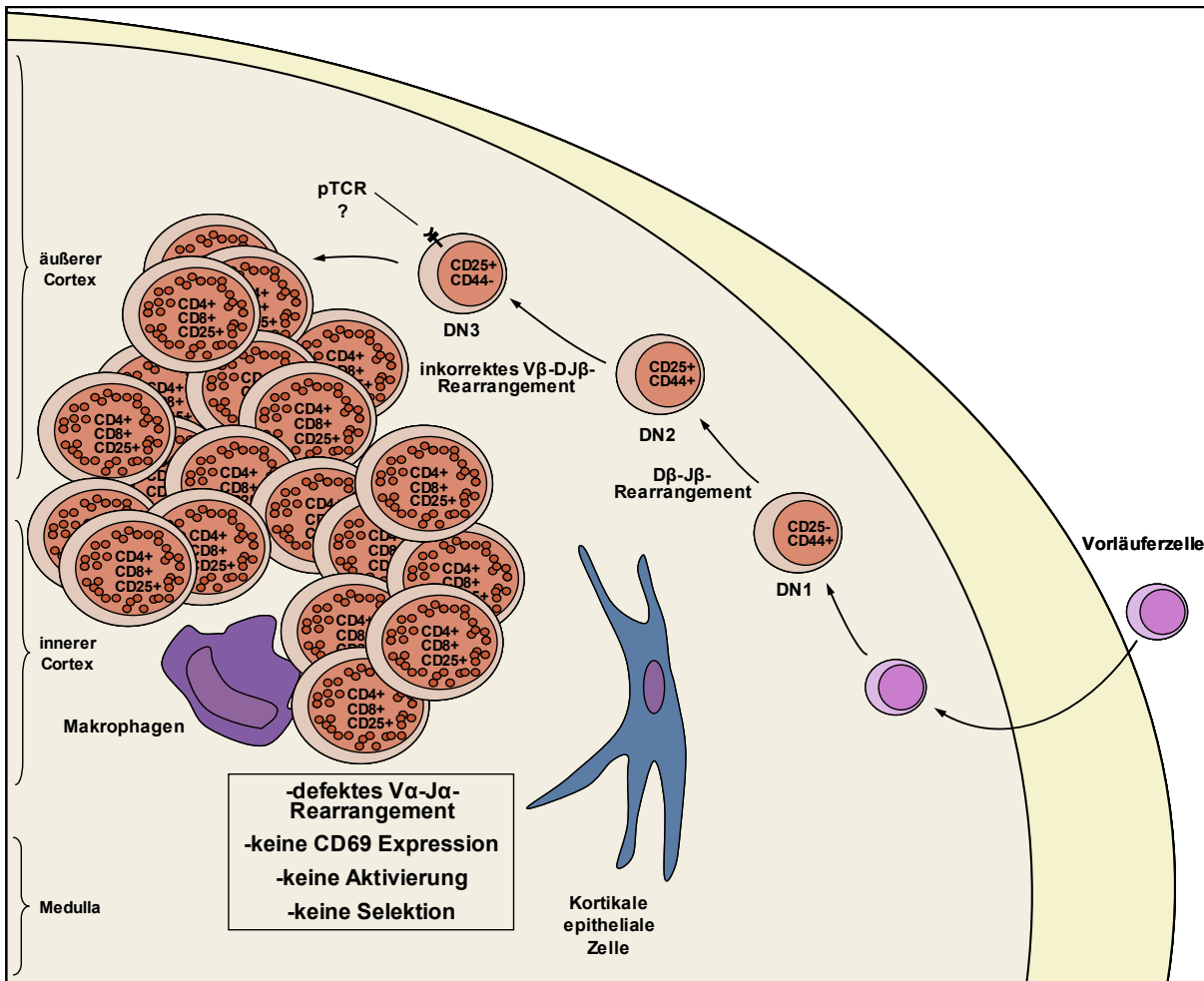
führen. Womöglich sind die neoplastischen Zellen des thymischen Lymphoms deshalb nicht befähigt, die Expression von CD25 auf der Zelloberfläche zu reduzieren, obwohl die Expression dieses Moleküls nicht der assoziierten Entwicklungsstufe in der normalen T-Zell-Entwicklung entspricht.

Unter Berücksichtigung der in den Zellen beobachteten blockierten Aktivierung, welche durch die verminderte CD69-Expression nachgewiesen werden konnte, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die ursprünglichen Zellen des thymischen Lymphoms schon Aberrationen während der Entwicklung der DN T-Zellen anhäufen, bevor sie in ihrer weiteren Reifung und Differenzierung blockiert werden und akkumulieren. Darüber hinaus konnte hier erstmalig der oligoklonale Ursprung von thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphomen nachgewiesen werden (siehe Kapitel **3.2.3**). Bislang war lediglich ein monoklonaler Ursprung vermutet worden (Matei *et al.*, 2007).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im Stadium DN2 oder DN3 der T-Zell-Entwicklung *Atm*-defizienter Mäuse die Rekombination des T-Zell-Rezeptors  $\beta$  späterer Tumorzellen unvollständig erfolgt. Obwohl diese Zellen durch den Entzug von Wachstumsfaktoren die Apoptose einleiten müssten, können sie sich zu DP T-Lymphozyten weiterentwickeln. Hier sind sie schließlich in der weiteren Entwicklung blockiert, da sie nicht durch Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit den MHC-Molekülen aktiviert werden können. Die Akkumulation dieser Zellpopulation, welche die Charakteristika mehrerer T-Zell-Entwicklungsstufen unvollständig vereint, ist in **Abbildung 39** schematisch skizziert.

#### **4.3. Frühe genomische Imbalancen auf den Chromosomen 12, 14 und 15 im thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphom**

Bisherige genomische Charakterisierungen des thymischen Lymphoms *Atm*-defizienter Mäuse erbrachten den Nachweis verschiedener chromosomaler Translokationen, die allerdings vor allem das Chromosom 14 einbezogen (Barlow *et al.*, 1996; Liyanage *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse beruhen ausschließlich auf M-FISH-Versuchen. Diese haben zwar den Vorteil, Translokationen innerhalb eines Chromosomensatzes darstellen zu können, sind aber andererseits in der Auflösung



**Abbildung 39: Fehlerhafte T-Zell-Entwicklung in *Atm*<sup>-/-</sup> thymischen Lymphome.** Schematische Darstellung der T-Zell-Entwicklung *Atm*-defizienter Mäuse von Eintritt der Vorläuferzelle in den Thymus bis zur Entstehung der abnormen, vergrößerten, doppelt positiven T-Lymphozyten. Die Stadien DN1: Doppelt Negativ 1 bis DN4: Doppelt Negativ 4 sind gekennzeichnet. In den Zellen sind die charakteristischen repräsentierten Antigene des jeweiligen Entwicklungsstadiums aufgeführt. pTCR: prä-T-Zell-Rezeptor. Auf die Thymusregionen wird mit gepunkteten Linien hingewiesen. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

detektierter Imbalancen unzureichend. Trotzdem gelang es in unabhängigen Studien, eine Deletion auf Chromosom 12 und einen Zugewinn auf Chromosom 15 nachzuweisen (Barlow *et al.*, 1996; Liyanage *et al.*, 2000; Winrow *et al.*, 2005). Die Entstehung der Translokation unter Beteiligung Chromosom 14 konnte durch Rekombinationsdefekte des T-Zell-Rezeptors  $\alpha$  begründet werden (Liyanage *et al.*, 2000). Ob diese Aberration allerdings zu den initialen Ereignissen in der Tumorentstehung zählt und ob sie für den Mechanismus der Tumorentstehung relevant ist, wird kontrovers diskutiert (Liao *et al.*, 1999; Petiniot *et al.*, 2000; Petiniot *et al.*, 2002).

Durch die hier durchgeführten, hochauflösenden *array-based comparative genome hybridisation* -Analysen an thymischen Lymphomen sowie an Thymi *Atm*-defizienter Mäuse, die makroskopisch keinerlei Veränderungen aufwiesen, konnten eine Vielzahl zuvor bekannter als auch unbekannter genomischer Imbalancen detektiert werden. Bedingt durch die hohe Auflösung der hier verwendeten Technik konnten auch kleine Gewinne oder Verluste chromosomalen Materials, wie sie zum Beispiel als Folge von Translokationen entstehen, analysiert werden.

So ist wahrscheinlich, dass die in sämtlichen Proben des thymischen Lymphoms detektierte Amplifikation in der Region von *TCR $\alpha$*  auf Chromosom 14, welche häufig mit einer benachbarten Deletion einhergeht, auf ein in der M-FISH-Analyse häufig beobachtetes Translokationsereignis zurückzuführen ist. Darüber hinaus konnten auch die Deletion auf Chromosom 12 sowie ein relativ häufiger, umfangreicher Zugewinn auf Chromosom 15 in den Zellen der thymischen Lymphome bestätigt werden. In den aCGH-Profilen waren außerdem weitere chromosomale Imbalancen festzustellen, die allerdings nicht in allen untersuchten Proben zu detektieren waren. Dazu zählen Zugewinne auf Chromosom 1, 2 und 16.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es darüber hinaus möglich, bereits in *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom chromosomale Imbalancen aufzudecken. Publierte molekulargenetische Daten sind bisher auf thymische *Atm*<sup>-/-</sup>Lymphome begrenzt (Barlow *et al.*, 1996; Liyanage *et al.*, 2000; Winrow *et al.*, 2005). Dabei ist als auffällig zu bewerten, dass als erste detektierbare chromosomale Imbalance im Verlauf der neoplastischen Entwicklung ein Zugewinn auf Chromosom 14 im Bereich des T-Zell-Rezeptors  $\alpha$  auftritt. Diesem Zugewinn folgen die beschriebene Deletion auf Chromosom 12 und ein möglicher Zugewinn auf Chromosom 15. Auch weitere chromosomale Aberrationen, vor allem auf den Chromosomen 1 und 2, konnten in einigen *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom nachgewiesen werden. Die Anzahl und das Ausmaß der chromosomalen Aberrationen ist somit wohl ein Maß für das Vorschreiten der neoplastischen Entwicklung. Basierend auf dieser Annahme konnten die untersuchten Proben in verschiedene genomische Stadien eingeteilt werden, die jeweils eine bestimmte Phase in der Progression des Lymphoms reflektieren und zeitlich aufeinander folgen (siehe Kapitel **3.2.6**).

Die Untersuchung der *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom mittels aCGH-Technik erbrachte in der vorliegenden Arbeit den Beleg, dass die erste detektierbare Aberration den

Bereich des T-Zell-Rezeptor  $\alpha$  betrifft und vermutlich durch eine Translokation verursacht wird. Erst in Folge ist eine Deletion auf Chromosom 12 zu detektieren. Zu diesem Zeitpunkt des Voranschreitens der Tumorentstehung, an dem eine chromosomale Imbalance feststellbar wird, muss bereits eine massive Proliferation neoplastischer T-Zellklone stattgefunden haben, da dieses Stadium sonst mit den hier verwendeten Methoden nicht nachweisbar gewesen wäre. Basierend auf diesen Ergebnissen kann deshalb, entgegen der Vermutungen früherer Studien (Petiniot *et al.*, 2000; Petiniot *et al.*, 2002) ausgeschlossen werden, dass die Deletion auf Chromosom 12 das initiale Ereignis der Neoplasie darstellt.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten aCGH-Studie belegen zudem einen umfangreichen Zugewinn des Chromosoms 15 als häufige chromosomale Aberration der thymischen Lymphome, die in den meisten untersuchten Fällen das gesamte Chromosom betrafen (**Abbildung 28**). Dieser auch in anderen Studien beobachtete Zugewinn wurde bisher zumeist mit der Überexpression des *c-Myc*-Gens und einer damit verbundenen erhöhten Zellproliferation in Verbindung gebracht (Winrow *et al.*, 2005). In der vorliegenden aCGH-Studie konnte in Verbindung mit der Analyse von Genexpressionsdaten der thymischen Lymphome dagegen gezeigt werden, dass eine hohe *c-Myc*-Expression nicht mit dem genomischen Zugewinn einhergeht. Hieraus kann gefolgert werden, dass die erhöhte *c-Myc*-Expression im Fall der thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome auf einen anderen, von dem genomischen Zugewinn des Lokus unabhängigen Mechanismus zurückzuführen sein muss, der in Kapitel 4.5 eingehend diskutiert werden soll.

#### **4.4. Deregulierte Genexpression in verschiedenen genomischen Stadien des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsstudien an thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphomen und *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom bieten in Verbindung mit den für diese Proben ebenfalls erstellten aCGH-Profilen die Möglichkeit, Änderungen im Expressionsprofil mit dem genomischen Aberrationsstatus korrespondierender genomischer Regionen und Genloci zu korlieren. Zunächst konnte durch die Expressionsanalyse der thymischen Lymphome festgestellt werden, dass sich deren



globale Expressionsmuster massiv von dem der ebenfalls untersuchten Wildtyp-Thymi unterscheiden (Kapitel **3.2.5**). Die hohe Anzahl an deregulierten Genen im Vergleich zu Wildtyp-Proben verdeutlichen diese Aussage und bestätigt im wesentlichen die Ergebnisse einer anderen Studie (Winrow *et al.*, 2005).

Basierend auf der hier getroffenen und eingeführten Einteilung der untersuchten Thymi in unterschiedliche genomische Stadien (**3.2.6**) konnte darüber hinaus nach Genen gesucht werden, deren Expression sich im Verlauf der unterschiedlichen Stadien der Tumorprogression systematisch nur einmalig änderte. Das bedeutet, dass die Expression eines Gens vor dem Hintergrund der den Proben zugeordneten genomischen Stadien einen sogenannten Wendepunkt (= *cutpoint*) aufweisen soll. Bei den genomischen Stadien handelt es sich dabei um die in Abschnitt **3.2.6** vorgestellte Einteilung der Proben anhand der Ergebnisse der aCGH-Analysen. Je höher die Nummer des bezeichneten genomischen Stadiums ist, desto mehr der für *Atm*<sup>-/-</sup>-Lymphome typische chromosomale Imbalancen wurden nachgewiesen. Tatsächlich konnten in dieser Analyse 3 Gene ausgemacht werden, deren Expression mit den höheren genomischen Stadien steigt. Dabei handelt es sich um die im Zusammenhang mit Neoplasien bekannten Gene *Tuba4*, *Fbln2*, *Aurka*.

Die Überexpression von *Tubulin A* bestätigt dabei in erster Linie, dass es sich bei den untersuchten Proben um proliferatives Gewebe handelt. Tubulin ist schon früh als ein für die Zellteilung unentbehrliches Protein erkannt worden (Jacobs *et al.*, 1977), da es nicht nur die Mikrotubuli des Cytoskeletts bildet, sondern durch seine Polymerisierung und Depolymerisierung den Spindelapparat während der Mitose aufbaut und so die Schwesterchromatiden auf die entstehenden Tochterzellen aufteilt (Jacobs *et al.*, 1977). In der heutigen Therapie von Tumoren wird diese Funktion gezielt unterbunden, indem die Depolymerisierung durch Paclitaxel oder die semisynthetische Variante Docetaxel blockiert werden kann (Ringel *et al.*, 1991). Als Folge werden weitere Zellteilungen unmöglich. Aufgrund der sehr unspezifischen Wirkung sind allerdings schwere Nebenwirkungen zu beobachten. Bei der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Expressionsänderung thymischer Lymphome fällt auf, dass *Tubulin A* schon im genomischen Stadium 3,5 eine erhöhte Expression aufweist. Ob die neoplastischen T-Zellen bereits in diesem genomischen Stadium eine erhöhte Proliferationsrate zeigen, muss in weiterführenden Studien ergründet werden.

Auch für *Fibulin 2* konnte eine Zunahme der Expressionsrate am Übergang vom genomischen Stadium 3 zu Stadium 3,5 beobachtet werden. Allerdings zeigten sich die Unterschiede weniger ausgeprägt als bei *Tubulin A*. *Fibulin 2* ist ein mit der Basalmembran assoziiertes Protein als Komponente der extrazellulären Matrix. Interessanterweise konnte *Fibulin 2* in einer anderen Studie in einer Gensignatur gefunden werden, die wiederum Aussagen über die Metastasierung von soliden Primärtumoren zulässt (Ramaswamy *et al.*, 2003). Die erhöhte Expression in einigen untersuchten thymischen Lymphomen des genomischen Stadiums 5 deutet ebenfalls darauf hin, dass *Fibulin 2* als Marker für weit in der Pathogenese vorangeschrittene Neoplasien betrachtet werden kann.

Die erhöhte Expression der *Aurora Kinase A* (*Aurka*) sowohl in thymischen Lymphomen als auch in *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom des genetischen Stadiums 4 ist aufgrund ihrer wichtigen regulatorischen Funktion in der Mitose besonders bezeichnend und passt ebenfalls sehr gut in das Bild einer proliferativen Erkrankung. *Aurka* reguliert dabei sowohl die Initiation des Spindelapparates (Hirota *et al.*, 2003) und die Separation der Centrosomen (Hannak *et al.*, 2001) als auch den Eintritt der sich teilenden Zelle von der G2-Phase in die Mitose (Du *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist *Aurka* in über 50 % der kolorektalen, ovariellen und gastrischen Tumoren sowie in 94 % der invasiven duktaalen Adenokarzinome der Brust überexprimiert (Harrington *et al.*, 2004). Des Weiteren wird die Überexpression von *Aurka* in Medulloblastomen mit einer besonders ungünstigen Prognose in Verbindung gebracht (Neben *et al.*, 2004). Allerdings ist derzeit unklar, ob *Aurka* zu den Onkogenen zu zählen ist, da eine Transformation von Zelllinien als Folge einer Überexpression bisher nicht gezeigt werden konnte. Auch die Tatsache, dass durch die Überexpression von *Aurka* in Mäusen keine malignen Tumoren induziert werden konnten, spricht eher für eine die Tumorgenese unterstützende Funktion als für eine klassisch onkogene Funktion (Zhang *et al.*, 2004).

In der auf einem Vergleich der genomischen Stadien und der Expressionsdaten basierenden *cutpoint*-Analyse wurden 9 weitere Gene gefunden, deren Expressionsrate einen Wendepunkt in Hinblick auf die genomischen Stadien der *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi aufzeigten. Im Gegensatz zu den 3 oben aufgeführten Genen war die Expression dieser 9 Gene in den höheren genomischen Stadien stark erniedrigt (Kapitel 3.2.7). Auch sie sollen zum Teil im Folgenden kurz diskutiert werden.

Die verminderte Expression von Catenin  $\alpha$  (*Ctnna1*) im 4. und 5. genomischen Stadium der *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ähnelt dem Expressionsstatus dieses Proteins in humanen Neoplasien. In diesen konnte, im Gegensatz zu Catenin  $\beta$  tatsächlich häufig eine verminderte Expression von Catenin  $\alpha$  beobachtet werden (Shimazui *et al.*, 1997; Toyoyama *et al.*, 1999).

Die deutlich reduzierte Expression von *Oma1* (*Dab1*) konnte ebenfalls in humanen Neoplasien beobachtet werden. Allerdings sind sowohl die Funktion dieses Gens als auch der Zusammenhang mit proliferativen Erkrankungen bisher ungeklärt (McAvoy *et al.*, 2007).

Kontrovers zu den Ergebnissen anderer Studien ist hingegen die verminderte Expression von *S100a9* und *Nedd9* (*Hef1*). Sowohl für *S100a9* (Gebhardt *et al.*, 2006) als auch für *Nedd9* ist eine Überexpression in humanen Tumoren beschrieben worden (Singh *et al.*, 2007). Völlig unverstanden ist darüber hinaus die Rolle der weiteren in der *cutpoint*-Analyse identifizierten Gene (Kapitel 3.2.7) in der Entwicklung thymischer Lymphome *Atm*-defizienter Mäuse.

Die Ergebnisse der *cutpoint*-Analyse, deren Stadieneinteilung auf Grundlage der genomischen Analyse mittels aCGH erfolgte, zeigen Expressionsänderungen von 12 Genen. Allen ist ein Wendepunkt der Expressionslevel im genomischen Stadium 3,5 gemein, wobei 3 der Gene in den hohen genomischen Stadien eine höhere und 9 der Gene eine niedrigere Expression gegenüber unveränderten *Atm*<sup>-/-</sup> Thymi aufweisen. Für 7 Gene ist bereits ein Zusammenhang mit humanpathologischen Neoplasien beschrieben worden, bei 5 dieser Gene korreliert die beschriebene Änderung der Expression mit der hier nachgewiesenen. Bei den in neoplastischen Veränderungen überexprimierten Genen handelt es sich um direkt in die Mitose involvierte Faktoren wie die *Aurora A Kinase* und *Tubulin A*. Insgesamt erscheint die hier getroffene Untergliederung der Stadien anhand des Ausmaßes genomischer Aberrationen geeignet, auch den zeitlichen Verlauf der Entwicklung des thymischen Lymphoms abzubilden.

#### 4.5. Funktioneller genomischer *Notch1*-Zugewinn

Die Auswertung der in dieser Arbeit durchgeführten aCGH-Analyse führte zur Identifikation eines Zugewinns der Bande qA3 auf Chromosom 2 in 4 von 7 thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphomen und 2 der *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom. In dieser chromosomalen Region liegt unter anderem das *Notch1*-Gen (siehe Kapitel 3.2.8). Das *Notch1*-Gen kodiert für einen Transmembranrezeptor mit der intrazellulären Domäne ICN (*intracellular Notch*). ICN wird nach Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung von diesem abgespalten und induziert als Transkriptionsfaktor im Kern direkt die Transkription von *Notch1*-abhängig regulierten Genen wie z. B. *Hes1* oder *Myc* (Mumm *et al.*, 2000). Vor allem in der T-Zell-Entwicklung ist an mehreren Differenzierungsstadien eine korrekte *Notch1*-Signaltransduktion von grundlegender Bedeutung (Radtke *et al.*, 1999)

Im Menschen wurden *NOTCH1*-Aberrationen erstmals im Zusammenhang mit einer chromosomalen Translokation t(7;9) in humaner akuter T-Zell-lymphoblastischer Leukämie (T-ALL) entdeckt (Ellisen *et al.*, 1991). Diese Translokation führt zu einem trunkierten konstitutiv aktiven NOTCH1-Protein, was in Folge im transgenen Mausmodell eine T-Zell-Leukämie induzierte (Pear *et al.*, 1996). Allerdings kommt diese Form der Translokation nur in weniger als 1 % aller humanen T-ALLs vor. In neueren Studien wurden allerdings in mehr als 50 % der humanen T-ALLs aktivierende Mutationen entdeckt, die belegen, dass die Rolle von NOTCH1 in der Tumorgenese humaner T-ALLs lange Zeit unterschätzt wurde (Weng *et al.*, 2004).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse kann spekuliert werden, dass der Ursprung der Tumorgenese der thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome direkt auf den detektierten *Notch1*-Zugewinn zurückzuführen ist. Sollte diese Theorie zutreffen, so müssten die Lymphome ohne einen solchen Zugewinn (die verbleibenden 3 Fälle von 7) eine aktivierende Mutation im *Notch1*-Gen besitzen. Zur Prüfung dieser Vermutung wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst das *Notch1*-Transkript sämtlicher thymischer Lymphome sequenziert. Es konnte jedoch in keinem Fall eine Mutation nachgewiesen werden. Es galt daraufhin zu überprüfen, ob die detektierten *Notch1*-Zugewinne eine funktionale Konsequenz besitzen. Zu diesem Zweck wurde die Expression *Notch1*-regulierter Gene auf eine Korrelation mit dem genomischen Zugewinn des *Notch1*-Lokus überprüft (siehe Kapitel 3.2.8). Tatsächlich weisen die in **Abbildung 34** und **Abbildung 35** dargestellten Ergebnisse deutlich darauf hin,

dass in *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi mit genomischem Zugewinn des *Notch1*-Lokus eine Deregulation der von *Notch1* regulierten Gene stattgefunden hat. Der *Notch1*-Zugewinn auf chromosomaler Ebene scheint also in den untersuchten Thymi, mit Ausnahme des thymischen Lymphoms Nr. 11052, von funktioneller Relevanz zu sein. Darüber hinaus zeigen auch *Atm*<sup>-/-</sup>-Thymi ohne Lymphom, die einen genomischen *Notch1*-Zugewinn aufweisen, eine ähnliche Deregulation der betrachteten Gene.

Unter den in diesem Zusammenhang untersuchten Genen befand sich auch das schon in Kapitel 4.3 diskutierte *c-Myc*-Gen. Betrachtet man den Einfluss der *c-Myc*-Expression auf die Teststatistik des *geneplots* in **Abbildung 34** sowie die Expressionswerte in **Abbildung 35**, so kann davon ausgegangen werden, dass in den thymischen Lymphomen *Atm*-defizienter Mäuse die *c-Myc*-Expression einer strengen Regulation durch *Notch1* unterworfen ist. Demnach wäre die beobachtete *c-Myc*-Expression die Folge einer Deregulation der *Notch1*-Signaltransduktion aufgrund des genomischen *Notch1*-Zugewinns und nicht, wie in anderen Studien vermutet wurde (Winrow *et al.*, 2005), eine Folge des chromosomalen Zugewinns des *c-Myc*-Lokus auf Chromosom 15.

Zusammenfassend soll hervorgehoben werden, dass sich der in einer Subgruppe thymischer *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphome nachgewiesene chromosomale *Notch1*-Zugewinn auch in der Deregulation *Notch1*-regulierter Gene äußerte. Da der Zugewinn des *Notch1*-Lokus jedoch nur selten in *Atm*<sup>-/-</sup> Thymi ohne Lymphom gefunden werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier nicht um ein initiales Ereignis der Tumorgenese handelte. Vielmehr scheint der *Notch1*-Zugewinn den akkumulierenden neoplastischen T-Lymphozyten in der Thymusumgebung einen Überlebensvorteil zu bieten.

#### 4.6. Deregulation von Apoptose-assoziierten Faktoren

Die T-Zell-Lymphopoese ist ein streng regulierter Prozess, in dem Ereignisse der genomischen Rekombination und der starken Proliferation einander abwechseln (siehe Kapitel 1.1.3). Hierdurch besteht ein erhöhtes Risiko, dass Zellen, die während der somatischen Rekombination genetische Aberrationen erfahren, durch nachfolgende Proliferation die Grundlage einer neoplastischen Erkrankung bilden.

Die einzelnen Entwicklungsschritte werden aus diesem Grunde besonders straff durch fortwährende Überprüfung der Oberflächenantigene, wie z. B. T-Zell-Rezeptoren, kontrolliert. Im Falle eines Defekts wird die Eliminierung der betroffenen Zellen umgehend durch Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose) ausgelöst (Minter *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass dennoch T-Zell-Neoplasien existieren, legt nahe, dass es in den aberranten T-Lymphozyten zur Inaktivierung oder Umgehung des Apoptoseprogrammes gekommen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die in *Atm*-defizienten Mäusen entstehenden T-Zell-Lymphome sowohl die Oberflächenantigene CD4 als auch CD8 exprimieren und damit den doppelt positiven T-Zellen in der normalen T-Zell-Entwicklung entsprechen. Desweiteren wurde eine hohe CD25-Expression in diesen Zellen nachgewiesen (Kapitel 3.2.2.3), was normalerweise ein Charakteristikum der früheren doppelt negativen DN2 und DN3 T-Zell-Entwicklungsstadien darstellt (3.2.2.3; Übersicht siehe Kapitel 1.1.3). Berücksichtigt man auch den erbrachten Nachweis inkorrekt rearrangierter T-Zell  $\beta$ -Rezeptoren, so liefert dies Hinweise auf Defekte in der Rekombination und der fortschreitenden Entwicklung des Entwicklungsstadiums DN2 oder DN3 bis zum doppelt positiven T-Zell-Stadium. In jeder einzelnen dazwischen liegenden Entwicklungsstufe hätten die aberranten, durch irreguläre Expression von Oberflächenantigenen auffallenden T-Zellen durch Apoptose eliminiert werden müssen. Nach Hinweisen, dass dieses Phänomen als Folge eines Defekts in der Apoptose selbst oder eines Defekts in einem für die Apoptoseinduktion essentiellen Rezeptor auftrat, wurde in dieser Arbeit durch Netzwerk-Analysen der differentiell exprimierten Gene in den *Atm*<sup>-/-</sup>-Lymphomen gesucht (siehe 3.2.9). Basierend auf kuriierten Datenbankeinträgen, konnte ein Netzwerk generiert werden, welches die zumeist verminderte Expression Apoptose assoziierter Gene sichtbar machte. Der Rezeptor CD95 (Apo1, Fas) stellt dabei einen Schlüsselfaktor in der Apoptoseregulation dar (Trauth *et al.*, 1989) und zeigt in den thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphomen eine deutlich verminderte Expression. FACS-Messungen der Oberflächenexpression von CD95 konnten in der Folge eine Reduzierung auf 10 % der Expression in Wildtyp-T-Zellen bestätigen. Neben CD95 sind aber auch weitere proapoptotische Gene sowohl in der Expression vermindert als auch erhöht. Klarheit bezüglich der Ursache der verminderten Apoptose kann nur durch zukünftige, eingehende funktionelle Analysen geschaffen werden. Dabei gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass Zellen hämatologischer Neoplasien häufig eine

hohe Mortalität unter Zellkulturbedingungen aufweisen. Da diese Mortalität vermutlich durch eine spontane Aktivierung des Apoptoseprogramms bewirkt wird, ist eine Untersuchung der *Atm*<sup>-/-</sup> bedingten Apoptosemechanismen erschwert (Collins *et al.*, 1989). Dieses Phänomen sowie eine extrem geringe *ex-vivo*-Proliferation konnte tatsächlich auch in dieser Arbeit für Zellen des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms beobachtet werden (nicht gezeigt). Alternativ zu *in-vivo*-Studien des Apoptoseverhaltens neoplastischer Zellpopulationen in *Atm*<sup>-/-</sup>-Mäusen könnten funktionelle Test in einem System der Stromazell-Kokultur durchgeführt werden (Seiffert *et al.*, 2007). Durch die hierbei eingesetzten Stromazellen wird eine den *in-vivo*-Bedingungen möglichst nahe Wachstumssituation geschaffen, so dass die kulturbedingte spontane Apoptose reduziert wird. Auf diese Weise würden funktionale zellkulturbasierte Studien der Apoptoseregulation in Zellen des thymischen *Atm*<sup>-/-</sup> Lymphoms in Zellkultursystemen ermöglicht.





## 5. Referenzen

Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. **318**(6046): 533-8.

Alberola-Ila, J., Hogquist, K. A., Swan, K. A., Bevan, M. J. and Perlmutter, R. M. (1996). Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med*. **184**(1): 9-18.

Allman, D., Li, J. and Hardy, R. R. (1999). Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med*. **189**(4): 735-40.

Andegeko, Y., Moyal, L., Mittelman, L., Tsarfaty, I., Shiloh, Y. and Rotman, G. (2001). Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*. **276**(41): 38224-30.

Armitage, J. O., Greer, J. P., Levine, A. M., Weisenburger, D. D., Formenti, S. C., Bast, M., Conley, S., Pierson, J., Linder, J. and Cousar, J. B. (1989). Peripheral T-cell lymphoma. *Cancer*. **63**(1): 158-63.

Arnold, A., Kim, H. G., Gaz, R. D., Eddy, R. L., Fukushima, Y., Byers, M. G., Shows, T. B. and Kronenberg, H. M. (1989). Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *J Clin Invest*. **83**(6): 2034-40.

Auer, I. A., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Cotter, F. E., Greiner, T. C., Sanger, W. G. and Horsman, D. E. (1997). t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol*. **8**(10): 979-85.

Ausubel, M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.H., Smith, J.A., Struhl, K., Current Protocols in Molecular Biology. **1987-2005**, New York: John Wiley & sons, Inc.

Bakkenist, C. J. and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. **421**(6922): 499-506.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. **281**(5383): 1674-7.

Barlow, C., Eckhaus, M. A., Schaffer, A. A. and Wynshaw-Boris, A. (1999). Atm haploinsufficiency results in increased sensitivity to sublethal doses of ionizing radiation in mice. *Nat Genet*. **21**(4): 359-60.

- Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D. and Wynshaw-Boris, A. (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*. **86**(1): 159-71.
- Barrett, A. J., Horowitz, M. M., Ash, R. C., Atkinson, K., Gale, R. P., Goldman, J. M., Henslee-Downey, P. J., Herzig, R. H., Speck, B. and Zwaan, F. E. (1992). Bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **79**(11): 3067-70.
- Bartek, J., Falck, J. and Lukas, J. (2001). CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**(12): 877-86.
- Baugh, L. R., Hill, A. A., Brown, E. L. and Hunter, C. P. (2001). Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res*. **29**(5): E29.
- Bea, S., Tort, F., Pinyol, M., Puig, X., Hernandez, L., Hernandez, S., Fernandez, P. L., van Lohuizen, M., Colomer, D. and Campo, E. (2001). BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res*. **61**(6): 2409-12.
- Becker-Catania, S. G. and Gatti, R. A. (2001). Ataxia-telangiectasia. *Adv Exp Med Biol*. **495**: 191-8.
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A. and van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. **9**(10): 1783-6.
- Berkovich, E., Monnat, R. J., Jr. and Kastan, M. B. (2007). Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol*. **9**(6): 683-90.
- Bodrug, S. E., Warner, B. J., Bath, M. L., Lindeman, G. J., Harris, A. W. and Adams, J. M. (1994). Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *Embo J*. **13**(9): 2124-30.
- Borgulya, P., Kishi, H., Muller, U., Kirberg, J. and von Boehmer, H. (1991). Development of the CD4 and CD8 lineage of T cells: instruction versus selection. *Embo J*. **10**(4): 913-8.
- Bosch, F., Jares, P., Campo, E., Lopez-Guillermo, A., Piris, M. A., Villamor, N., Tassies, D., Jaffe, E. S., Montserrat, E., Rozman, C. and et al. (1994). PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. **84**(8): 2726-32.
- Bowtell, D., Sambrook, Joseph, DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual. **2003**, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bredemeyer, A. L., Sharma, G. G., Huang, C. Y., Helmink, B. A., Walker, L. M., Khor, K. C., Nuskey, B., Sullivan, K. E., Pandita, T. K., Bassing, C. H. and Sleckman, B. P.

- (2006). ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination. *Nature*. **442**(7101): 466-70.
- Brittinger, G., Bartels, H., Common, H., Duhmke, E., Engelhard, M., Fulle, H. H., Gunzer, U., Gyenes, T., Heinz, R. and Konig, E. (1986). Clinical and prognostic relevance of the Kiel classification of non-Hodgkin lymphomas. *Onkologie*. **9**(2): 118-25.
- Burkitt, D. P. (1983). The discovery of Burkitt's lymphoma. *Cancer*. **51**(10): 1777-86.
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B. and Siliciano, J. D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. **281**(5383): 1677-9.
- Carlyle, J. R. and Zuniga-Pflucker, J. C. (1998). Requirement for the thymus in alphabeta T lymphocyte lineage commitment. *Immunity*. **9**(2): 187-97.
- Cepko, C. L., Roberts, B. E. and Mulligan, R. C. (1984). Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell*. **37**(3): 1053-62.
- Chan, S. H., Cosgrove, D., Waltzinger, C., Benoist, C. and Mathis, D. (1993). Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell*. **73**(2): 225-36.
- Chao, C., Yang, E. M. and Xu, Y. (2000). Rescue of defective T cell development and function in *Atm*<sup>-/-</sup> mice by a functional TCR alpha beta transgene. *J Immunol*. **164**(1): 345-9.
- Collins, R. J., Verschuer, L. A., Harmon, B. V., Prentice, R. L., Pope, J. H. and Kerr, J. F. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol*. **71**(3): 343-50.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S. J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of *brca1* in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*. **286**(5442): 1162-6.
- Crawford, T. O. (1998). Ataxia telangiectasia. *Semin Pediatr Neurol*. **5**(4): 287-94.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M. and Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **94**(6): 1840-7.
- de Boer, C. J., van Krieken, J. H., Kluin-Nelemans, H. C., Kluin, P. M. and Schuurin, E. (1995). Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene*. **10**(9): 1833-40.
- de Jong, D., Boot, H. and Taal, B. (2000). Histological grading with clinical relevance in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Recent Results Cancer Res*. **156**: 27-32.

- Dighiero, G., Travade, P., Chevret, S., Fenaux, P., Chastang, C. and Binet, J. L. (1991). B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood*. **78**(8): 1901-14.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M. and Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. **343**(26): 1910-6.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Döhner, K., Bentz, M. and Lichter, P. (1999). Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*. **77**(2): 266-81.
- Dreyling, M. H., Bullinger, L., Ott, G., Stilgenbauer, S., Müller-Hermelink, H. K., Bentz, M., Hiddemann, W. and Döhner, H. (1997). Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. **57**(20): 4608-14.
- Du, J. and Hannon, G. J. (2004). Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**(24): 8975-80.
- du Manoir, S., Speicher, M. R., Joos, S., Schrock, E., Popp, S., Döhner, H., Kovacs, G., Robert-Nicoud, M., Lichter, P. and Cremer, T. (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet*. **90**(6): 590-610.
- Dudley, E. C., Petrie, H. T., Shah, L. M., Owen, M. J. and Hayday, A. C. (1994). T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity*. **1**(2): 83-93.
- Dudoit, S., van der Laan, M. J. and Pollard, K. S. (2004). Multiple testing. Part I. Single-step procedures for control of general type I error rates. *Stat Appl Genet Mol Biol*. **3**: Article13.
- Duyster, J., Bai, R. Y. and Morris, S. W. (2001). Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene*. **20**(40): 5623-37.
- Ehlich, A. and Kuppers, R. (1995). Analysis of immunoglobulin gene rearrangements in single B cells. *Curr Opin Immunol*. **7**(2): 281-4.
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. **66**(4): 649-61.
- Elson, A., Wang, Y., Daugherty, C. J., Morton, C. C., Zhou, F., Campos-Torres, J. and Leder, P. (1996). Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(23): 13084-9.
- Espinete, B., Sole, F., Pedro, C., Garcia, M., Bellosillo, B., Salido, M., Florensa, L., Camacho, F. I., Baro, T., Lloreta, J. and Serrano, S. (2005). Clonal proliferation of cyclin D1-positive mantle lymphocytes in an asymptomatic patient: an early-stage event in the development or an indolent form of a mantle cell lymphoma? *Hum Pathol*. **36**(11): 1232-7.

- Falck, J., Coates, J. and Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. **434**(7033): 605-11.
- Falck, J., Petrini, J. H., Williams, B. R., Lukas, J. and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet*. **30**(3): 290-4.
- Fernandez, V., Hartmann, E., Ott, G., Campo, E. and Rosenwald, A. (2005). Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*. **23**(26): 6364-9.
- Fisher, R. I., Dahlborg, S., Nathwani, B. N., Banks, P. M., Miller, T. P. and Grogan, T. M. (1995). A clinical analysis of two indolent lymphoma entities: mantle cell lymphoma and marginal zone lymphoma (including the mucosa-associated lymphoid tissue and monocytoid B-cell subcategories): a Southwest Oncology Group study. *Blood*. **85**(4): 1075-82.
- Foran, J. M., Rohatiner, A. Z., Coiffier, B., Barbui, T., Johnson, S. A., Hiddemann, W., Radford, J. A., Norton, A. J., Tollerfield, S. M., Wilson, M. P. and Lister, T. A. (1999). Multicenter phase II study of fludarabine phosphate for patients with newly diagnosed lymphoplasmacytoid lymphoma, Waldenstrom's macroglobulinemia, and mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. **17**(2): 546-53.
- Gatei, M., Young, D., Cerosaletti, K. M., Desai-Mehta, A., Spring, K., Kozlov, S., Lavin, M. F., Gatti, R. A., Concannon, P. and Khanna, K. (2000). ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet*. **25**(1): 115-9.
- Gatti, R. A., Tward, A. and Concannon, P. (1999). Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab*. **68**(4): 419-23.
- Gebhardt, C., Nemeth, J., Angel, P. and Hess, J. (2006). S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*. **72**(11): 1622-31.
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. **2**(5): 309-22.
- Gesk, S., Klapper, W., Martin-Subero, J. I., Nagel, I., Harder, L., Fu, K., Bernd, H. W., Weisenburger, D. D., Parwaresch, R. and Siebert, R. (2006). A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood*. **108**(3): 1109-10.
- Gisselbrecht, C., Gaulard, P., Lepage, E., Coiffier, B., Briere, J., Haioun, C., Cazals-Hatem, D., Bosly, A., Xerri, L., Tilly, H., Berger, F., Bouhabdallah, R. and Diebold, J. (1998). Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. **92**(1): 76-82.

- Gladden, A. B., Woolery, R., Aggarwal, P., Wasik, M. A. and Diehl, J. A. (2006). Expression of constitutively nuclear cyclin D1 in murine lymphocytes induces B-cell lymphoma. *Oncogene*. **25**(7): 998-1007.
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T. and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol*. **150**(10): 4244-52.
- Goeman, J. J., van de Geer, S. A., de Kort, F. and van Houwelingen, H. C. (2004). A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics*. **20**(1): 93-9.
- Greiner, T. C., Moynihan, M. J., Chan, W. C., Lytle, D. M., Pedersen, A., Anderson, J. R. and Weisenburger, D. D. (1996). p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*. **87**(10): 4302-10.
- Haines, J. L., Korf, Bruce R., Morton, Cynthia C., Seidman, Christine E., Seidman, J. G., Smith, Douglas R., Current Protocols in Human Genetics. **1994-2006**, New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Haluska, F. G., Finver, S., Tsujimoto, Y. and Croce, C. M. (1986). The t(8; 14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining. *Nature*. **324**(6093): 158-61.
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. and Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **94**(6): 1848-54.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. A. and Oegema, K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*. **155**(7): 1109-16.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D. and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*. **173**(5): 1213-25.
- Harrington, E. A., Bebbington, D., Moore, J., Rasmussen, R. K., Ajose-Adeogun, A. O., Nakayama, T., Graham, J. A., Demur, C., Hercend, T., Diu-Hercend, A., Su, M., Golec, J. M. and Miller, K. M. (2004). VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med*. **10**(3): 262-7.
- Harris, A. W., Pinkert, C. A., Crawford, M., Langdon, W. Y., Brinster, R. L. and Adams, J. M. (1988). The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J Exp Med*. **167**(2): 353-71.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Müller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A. and Bloomfield, C. D. (2000). The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues:

report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J.* **1**(1): 53-66.

Hernandez, L., Fest, T., Cazorla, M., Teruya-Feldstein, J., Bosch, F., Peinado, M. A., Piris, M. A., Montserrat, E., Cardesa, A., Jaffe, E. S., Campo, E. and Raffeld, M. (1996). p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood.* **87**(8): 3351-9.

Hinds, P. W., Dowdy, S. F., Eaton, E. N., Arnold, A. and Weinberg, R. A. (1994). Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(2): 709-13.

Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K. and Saya, H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell.* **114**(5): 585-98.

Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J. and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell.* **76**(1): 17-27.

Hothorn, T., Lausen, B. (2003). On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computational Statistics & Data Analysis.* **43**(2): 121-137.

Howard, O. M., Gribben, J. G., Neuberg, D. S., Grossbard, M., Poor, C., Janicek, M. J. and Shipp, M. A. (2002). Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol.* **20**(5): 1288-94.

Huber, W., von Heydebreck, A., Sültmann, H., Poustka, A. and Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics.* **18 Suppl 1**: S96-104.

Imoto, M., Doki, Y., Jiang, W., Han, E. K. and Weinstein, I. B. (1997). Effects of cyclin D1 overexpression on G1 progression-related events. *Exp Cell Res.* **236**(1): 173-80.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., Ikeda, Y., Mak, T. W. and Suda, T. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* **431**(7011): 997-1002.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y. and Suda, T. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* **12**(4): 446-51.

Ito, K., Takubo, K., Arai, F., Satoh, H., Matsuoka, S., Ohmura, M., Naka, K., Azuma, M., Miyamoto, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., Mak, T. W., Suda, T. and Hirao, A. (2007). Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes. *J Immunol.* **178**(1): 103-10.

Jacobs, M. and Cavalier-Smith, T. (1977). Mitosis and microtubule assembly. *Biochem Soc Symp*, (42): 193-219.

Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science*. **240**(4858): 1468-74.

Jiang, W., Kahn, S. M., Zhou, P., Zhang, Y. J., Cacace, A. M., Infante, A. S., Doi, S., Santella, R. M. and Weinstein, I. B. (1993). Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene*. **8**(12): 3447-57.

Keating, M. J., O'Brien, S., Kantarjian, H., Plunkett, W., Estey, E., Koller, C., Beran, M. and Freireich, E. J. (1993). Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine as a single agent. *Blood*. **81**(11): 2878-84.

Khanna, K. K. (2000). Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst*. **92**(10): 795-802.

Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y. and Shkedy, D. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(26): 14973-7.

Kim, S. T., Xu, B. and Kastan, M. B. (2002). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev*. **16**(5): 560-70.

Koller, B. H. and Smithies, O. (1989). Inactivating the beta 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**(22): 8932-5.

Komatsu, H., Iida, S., Yamamoto, K., Mikuni, C., Nitta, M., Takahashi, T., Ueda, R. and Seto, M. (1994). A variant chromosome translocation at 11q13 identifying PRAD1/cyclin D1 as the BCL-1 gene. *Blood*. **84**(4): 1226-31.

Komatsu, H., Yoshida, K., Seto, M., Iida, S., Aikawa, T., Ueda, R. and Mikuni, C. (1993). Overexpression of PRAD1 in a mantle zone lymphoma patient with a t(11;22)(q13;q11) translocation. *Br J Haematol*. **85**(2): 427-9.

Korsmeyer, S. J. (1992). Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv*. **15**: 105-18.

Kroon, E., Kros, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A. M. and Sauvageau, G. (1998). Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *Embo J*. **17**(13): 3714-25.

Lee, J. S., Collins, K. M., Brown, A. L., Lee, C. H. and Chung, J. H. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*. **404**(6774): 201-4.

Lengauer, C., Speicher, M. R., Popp, S., Jauch, A., Taniwaki, M., Nagaraja, R., Riethman, H. C., Donis-Keller, H., D'Urso, M., Schlessinger, D. and et al. (1993).



Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet.* **2**(5): 505-12.

Li, S., Ting, N. S., Zheng, L., Chen, P. L., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lee, E. Y. and Lee, W. H. (2000). Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature.* **406**(6792): 210-5.

Li, Y., Williams, M. E., Cousar, J. B., Pawluczkwycz, A. W., Lindorfer, M. A. and Taylor, R. P. (2007). Rituximab-CD20 complexes are shaved from Z138 mantle cell lymphoma cells in intravenous and subcutaneous SCID mouse models. *J Immunol.* **179**(6): 4263-71.

Liao, M. J. and Van Dyke, T. (1999). Critical role for Atm in suppressing V(D)J recombination-driven thymic lymphoma. *Genes Dev.* **13**(10): 1246-50.

Liliemark, J., Martinsson, U., Cavallin-Stahl, E., Svedmyr, E., Porwit, A., Stromberg, M. and Juliusson, G. (1998). Cladribine for untreated or early low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* **30**(5-6): 573-81.

Lim, D. S., Kim, S. T., Xu, B., Maser, R. S., Lin, J., Petrini, J. H. and Kastan, M. B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature.* **404**(6778): 613-7.

Liu, H., Ye, H., Ruskone-Fourmestreaux, A., De Jong, D., Pileri, S., Thiede, C., Lavergne, A., Boot, H., Caletti, G., Wundisch, T., Molina, T., Taal, B. G., Elena, S., Thomas, T., Zinzani, P. L., Neubauer, A., Stolte, M., Hamoudi, R. A., Dogan, A., Isaacson, P. G. and Du, M. Q. (2002). T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to H. pylori eradication. *Gastroenterology.* **122**(5): 1286-94.

Liyanage, M., Weaver, Z., Barlow, C., Coleman, A., Pankratz, D. G., Anderson, S., Wynshaw-Boris, A. and Ried, T. (2000). Abnormal rearrangement within the alpha/delta T-cell receptor locus in lymphomas from Atm-deficient mice. *Blood.* **96**(5): 1940-6.

Loffert, D., Ehlich, A., Muller, W. and Rajewsky, K. (1996). Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity.* **4**(2): 133-44.

Lumsden, J. M., McCarty, T., Petiniot, L. K., Shen, R., Barlow, C., Wynn, T. A., Morse, H. C., 3rd, Gearhart, P. J., Wynshaw-Boris, A., Max, E. E. and Hodes, R. J. (2004). Immunoglobulin class switch recombination is impaired in Atm-deficient mice. *J Exp Med.* **200**(9): 1111-21.

M'Kacher, R., Farace, F., Bennaceur-Griscelli, A., Viotot, D., Clause, B., Dossou, J., Valent, A., Parmentier, C., Ribrag, V., Bosq, J., Carde, P., Turhan, A. G. and Bernheim, A. (2003). Blastoid mantle cell lymphoma: evidence for nonrandom cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) and generation of a mouse model. *Cancer Genet Cytogenet.* **143**(1): 32-8.

- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*. **288**(5470): 1425-9.
- Matei, I. R., Gladdy, R. A., Nutter, L. M., Canty, A., Guidos, C. J. and Danska, J. S. (2007). ATM deficiency disrupts Tcra locus integrity and the maturation of CD4+CD8+ thymocytes. *Blood*. **109**(5): 1887-96.
- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. **65**(4): 701-13.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., Shkedy, D., Leal, J. F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M. B., Katzir, E. and Oren, M. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev*. **15**(9): 1067-77.
- McAvoy, S., Zhu, Y., Perez, D. S., James, C. D. and Smith, D. I. (2007). Disabled-1 is a large common fragile site gene, inactivated in multiple cancers. *Genes Chromosomes Cancer*.
- McGowan, C. H. (2002). Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. *Bioessays*. **24**(6): 502-11.
- Minter, L. M. and Osborne, B. A. (2003). Cell death in the thymus--it's all a matter of contacts. *Semin Immunol*. **15**(3): 135-44.
- Mumm, J. S. and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*. **228**(2): 151-65.
- Neben, K., Korshunov, A., Benner, A., Wrobel, G., Hahn, M., Kokocinski, F., Golanov, A., Joos, S. and Lichter, P. (2004). Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival. *Cancer Res*. **64**(9): 3103-11.
- Nodit, L., Bahler, D. W., Jacobs, S. A., Locker, J. and Swerdlow, S. H. (2003). Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. *Hum Pathol*. **34**(10): 1030-4.
- Offit, K., Jhanwar, S., Ebrahim, S. A., Filippa, D., Clarkson, B. D. and Chaganti, R. S. (1989). t(3;22)(q27;q11): a novel translocation associated with diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. **74**(6): 1876-9.
- Offit, K., Lo Coco, F., Louie, D. C., Parsa, N. Z., Leung, D., Portlock, C., Ye, B. H., Lista, F., Filippa, D. A., Rosenbaum, A. and et al. (1994). Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. **331**(2): 74-80.
- Orchard, J., Garand, R., Davis, Z., Babbage, G., Sahota, S., Matutes, E., Catovsky, D., Thomas, P. W., Avet-Loiseau, H. and Oscier, D. (2003). A subset of t(11;14)

lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. **101**(12): 4975-81.

Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M. and Kourilsky, P. (1993). The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**(9): 4319-23.

Passegue, E., Jamieson, C. H., Ailles, L. E. and Weissman, I. L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100 Suppl 1**: 11842-9.

Pear, W. S., Aster, J. C., Scott, M. L., Hasserjian, R. P., Soffer, B., Sklar, J. and Baltimore, D. (1996). Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med*. **183**(5): 2283-91.

Petiniot, L. K., Weaver, Z., Barlow, C., Shen, R., Eckhaus, M., Steinberg, S. M., Ried, T., Wynshaw-Boris, A. and Hodes, R. J. (2000). Recombinase-activating gene (RAG) 2-mediated V(D)J recombination is not essential for tumorigenesis in *Atm*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**(12): 6664-9.

Petiniot, L. K., Weaver, Z., Vacchio, M., Shen, R., Wangsa, D., Barlow, C., Eckhaus, M., Steinberg, S. M., Wynshaw-Boris, A., Ried, T. and Hodes, R. J. (2002). RAG-mediated V(D)J recombination is not essential for tumorigenesis in *Atm*-deficient mice. *Mol Cell Biol*. **22**(9): 3174-7.

Pinyol, M., Hernandez, L., Cazorla, M., Balbin, M., Jares, P., Fernandez, P. L., Montserrat, E., Cardesa, A., Lopez-Otin, C. and Campo, E. (1997). Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*. **89**(1): 272-80.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R. and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. **10**(5): 547-58.

Raffeld, M. and Jaffe, E. S. (1991). *bcl-1*, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood*. **78**(2): 259-63.

Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. and Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. **33**(1): 49-54.

Randall, T. D. and Weissman, I. L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood*. **89**(10): 3596-606.

Ratcliff, R., Evans, M. J., Doran, J., Wainwright, B. J., Williamson, R. and Colledge, W. H. (1992). Disruption of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in embryonic stem cells by gene targeting. *Transgenic Res*. **1**(4): 177-81.

- Reina-San-Martin, B., Chen, H. T., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M. C. (2004). ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J Exp Med.* **200**(9): 1103-10.
- Reiter, A., Schrappe, M., Tiemann, M., Ludwig, W. D., Yakisan, E., Zimmermann, M., Mann, G., Chott, A., Ebell, W., Klingebiel, T., Graf, N., Kremens, B., Muller-Wehrich, S., Pluss, H. J., Zintl, F., Henze, G. and Riehm, H. (1999). Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood.* **94**(10): 3294-306.
- Richard, C. W., 3rd, Withers, D. A., Meeker, T. C., Maurer, S., Evans, G. A., Myers, R. M. and Cox, D. R. (1991). A radiation hybrid map of the proximal long arm of human chromosome 11 containing the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1) and bcl-1 disease loci. *Am J Hum Genet.* **49**(6): 1189-96.
- Ringel, I. and Horwitz, S. B. (1991). Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst.* **83**(4): 288-91.
- Robey, E. and Fowlkes, B. J. (1994). Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol.* **12**: 675-705.
- Robey, E. A., Fowlkes, B. J., Gordon, J. W., Kioussis, D., von Boehmer, H., Ramsdell, F. and Axel, R. (1991). Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell.* **64**(1): 99-107.
- Robey, E. A., Fowlkes, B. J. and Pardoll, D. M. (1990). Molecular mechanisms for lineage commitment in T cell development. *Semin Immunol.* **2**(1): 25-34.
- Roerig, P., Nessling, M., Radlwimmer, B., Joos, S., Wrobel, G., Schwaenen, C., Reifenberger, G. and Lichter, P. (2005). Molecular classification of human gliomas using matrix-based comparative genomic hybridization. *Int J Cancer.* **117**(1): 95-103.
- Rosenberg, C. L., Wong, E., Petty, E. M., Bale, A. E., Tsujimoto, Y., Harris, N. L. and Arnold, A. (1991). PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(21): 9638-42.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Müller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltnane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J., Duffey, P. L., Longo, D. L., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Sanger, W. G., Dave, B. J., Lynch, J. C., Vose, J., Armitage, J. O., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Grogan, T. M., Miller, T. P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T. and Staudt, L. M. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* **346**(25): 1937-47.
- Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Gascoyne, R. D., Grogan, T. M., Müller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Chiorazzi, M., Giltnane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Henrickson, S., Yang, L., Powell, J., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Montserrat, E., Bosch, F., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Sanger, W. G., Dave, B. J., Lynch, J.

C., Vose, J., Armitage, J. O., Fisher, R. I., Miller, T. P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J. and Staudt, L. M. (2003). The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. **3**(2): 185-97.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. **1989-2005**, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **74**(12): 5463-7.

Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S. R., Simmons, A., Clines, G. A., Sartiel, A., Gatti, R. A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M. F., Jaspers, N. G., Taylor, A. M., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S. M., Lovett, M., Collins, F. S. and Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. **268**(5218): 1749-53.

Schaffner, C., Idler, I., Stilgenbauer, S., Döhner, H. and Lichter, P. (2000). Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**(6): 2773-8.

Schessl, C., Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., Kohl, T. M., Rosten, P. M., Spiekermann, K., Humphries, R. K., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S. K., Feuring-Buske, M. and Buske, C. (2005). The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest*. **115**(8): 2159-68.

Schlegelberger, B., Zwingers, T., Harder, L., Nowotny, H., Siebert, R., Vesely, M., Bartels, H., Sonnen, R., Hopfinger, G., Nader, A., Ott, G., Müller-Hermelink, K., Feller, A. and Heinz, R. (1999). Clinicopathogenetic significance of chromosomal abnormalities in patients with blastic peripheral B-cell lymphoma. Kiel-Wien-Lymphoma Study Group. *Blood*. **94**(9): 3114-20.

Schlingemann, J., Thuerigen, O., Ittrich, C., Toedt, G., Kramer, H., Hahn, M. and Lichter, P. (2005). Effective transcriptome amplification for expression profiling on sense-oriented oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res*. **33**(3): e29.

Schuuring, E., Verhoeven, E., Mooi, W. J. and Michalides, R. J. (1992). Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene*. **7**(2): 355-61.

Seiffert, M., Stilgenbauer, S., Döhner, H. and Lichter, P. (2007). Efficient nucleofection of primary human B cells and B-CLL cells induces apoptosis, which depends on the microenvironment and on the structure of transfected nucleic acids. *Leukemia*. **21**(9): 1977-83.

Shimazui, T., Binguier, P. P., van Berkel, H., Ruijter, E., Akaza, H., Debruyne, F. M., Oosterwijk, E. and Schalken, J. A. (1997). Decreased expression of alpha-catenin is

associated with poor prognosis of patients with localized renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. **74**(5): 523-8.

Shivdasani, R. A., Hess, J. L., Skarin, A. T. and Pinkus, G. S. (1993). Intermediate lymphocytic lymphoma: clinical and pathologic features of a recently characterized subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. **11**(4): 802-111.

Singh, M., Cowell, L., Seo, S., O'Neill, G. and Golemis, E. (2007). Molecular basis for HEF1/NEDD9/Cas-L action as a multifunctional co-ordinator of invasion, apoptosis and cell cycle. *Cell Biochem Biophys*. **48**(1): 54-72.

Smith, M. R., Joshi, I., Jin, F. and Al-Saleem, T. (2006). Murine model for mantle cell lymphoma. *Leukemia*. **20**(5): 891-3.

Smyth, G. K., *Limma: linear models for microarray data.*, in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, Gentleman, R., Carey, V., Dudoit, S., Irizarry, R., Huber, W., Editor. 2005, Springer: New York.

Smyth, G. K., Yang, Y. H. and Speed, T. (2003). Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol*. **224**: 111-36.

Stilgenbauer, S., Schaffner, C., Litterst, A., Liebisch, P., Gilad, S., Bar-Shira, A., James, M. R., Lichter, P. and Döhner, H. (1997). Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. *Nat Med*. **3**(10): 1155-9.

Stilgenbauer, S., Winkler, D., Ott, G., Schaffner, C., Leupolt, E., Bentz, M., Moller, P., Müller-Hermelink, H. K., James, M. R., Lichter, P. and Döhner, H. (1999). Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood*. **94**(9): 3262-4.

Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. **183**(124): 534-6.

Surh, C. D. and Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. **372**(6501): 100-3.

Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P. R., Gregory, R. C., Kim, S. T., Lane, W. S., Kastan, M. B. and D'Andrea, A. D. (2002). Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*. **109**(4): 459-72.

ten Boekel, E., Melchers, F. and Rolink, A. (1995). The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int Immunol*. **7**(6): 1013-9.

Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. **51**(3): 503-12.

Toyoyama, H., Nuruki, K., Ogawa, H., Yanagi, M., Matsumoto, H., Nishijima, H., Shimotakahara, T., Aikou, T. and Ozawa, M. (1999). The reduced expression of e-cadherin, alpha-catenin and gamma-catenin but not beta-catenin in human lung cancer. *Oncol Rep*. **6**(1): 81-5.

Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M. and Krammer, P. H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. **245**(4915): 301-5.

Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P. C. and Croce, C. M. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science*. **224**(4656): 1403-6.

Vacchio, M. S., Oлару, A., Livak, F. and Hodes, R. J. (2007). ATM deficiency impairs thymocyte maturation because of defective resolution of T cell receptor alpha locus coding end breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**(15): 6323-8.

van der Laan, M. J., Dudoit, S. and Pollard, K. S. (2004). Multiple testing. Part II. Step-down procedures for control of the family-wise error rate. *Stat Appl Genet Mol Biol*. **3**: Article14.

van Meerwijk, J. P. and Germain, R. N. (1993). Development of mature CD8+ thymocytes: selection rather than instruction? *Science*. **261**(5123): 911-5.

Wang, T. C., Cardiff, R. D., Zukerberg, L., Lees, E., Arnold, A. and Schmidt, E. V. (1994). Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*. **369**(6482): 669-71.

Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W. J., Kirby, A., Kolbe, D. L., Korf, I., Kucherlapati, R. S., Kulbokas, E. J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J. P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D. R., Mardis, E. R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., McCombie, W. R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J. D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J. P., Miller, W., Miner, T. L., Mongin, E., Montgomery, K. T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J. C., Muzny, D. M., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M. J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K. H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C. S., Poliakov, A., Ponce, T. C., Ponting, C. P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B. A., Roskin, K. M., Rubin, E. M.,

Rust, A. G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M. S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J. B., Slater, G., Smit, A., Smith, D. R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J. P., Von Niederhausern, A. C., Wade, C. M., Wall, M., Weber, R. J., Weiss, R. B., Wendl, M. C., West, A. P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R. K., Winter, E., Worley, K. C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S. P., Zdobnov, E. M., Zody, M. C. and Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. **420**(6915): 520-62.

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. **81**(3): 323-30.

Weissman, I. L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. **100**(1): 157-68.

Welzel, N., Le, T., Marculescu, R., Mitterbauer, G., Chott, A., Pott, C., Kneba, M., Du, M. Q., Kusec, R., Drach, J., Raderer, M., Mannhalter, C., Lechner, K., Nadel, B. and Jaeger, U. (2001). Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. **61**(4): 1629-36.

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T. and Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. **306**(5694): 269-71.

Winrow, C. J., Pankratz, D. G., Vibat, C. R., Bowen, T. J., Callahan, M. A., Warren, A. J., Hilbush, B. S., Wynshaw-Boris, A., Hasel, K. W., Weaver, Z., Lockhart, D. J. and Barlow, C. (2005). Aberrant recombination involving the granzyme locus occurs in Atm<sup>-/-</sup> T-cell lymphomas. *Hum Mol Genet*. **14**(18): 2671-84.

Wu, X., Ranganathan, V., Weisman, D. S., Heine, W. F., Ciccone, D. N., O'Neill, T. B., Crick, K. E., Pierce, K. A., Lane, W. S., Rathbun, G., Livingston, D. M. and Weaver, D. T. (2000). ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature*. **405**(6785): 477-82.

Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S. and Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev*. **10**(19): 2411-22.

Zech, L., Haglund, U., Nilsson, K. and Klein, G. (1976). Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer*. **17**(1): 47-56.

Zhang, D., Hirota, T., Marumoto, T., Shimizu, M., Kunitoku, N., Sasayama, T., Arima, Y., Feng, L., Suzuki, M., Takeya, M. and Saya, H. (2004). Cre-loxP-controlled periodic



Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene*. **23**(54): 8720-30.

Zhao, S., Weng, Y. C., Yuan, S. S., Lin, Y. T., Hsu, H. C., Lin, S. C., Gerbino, E., Song, M. H., Zdzienicka, M. Z., Gatti, R. A., Shay, J. W., Ziv, Y., Shiloh, Y. and Lee, E. Y. (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*. **405**(6785): 473-7.

Zucca, E., Stein, H. and Coiffier, B. (1994). European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Ann Oncol*. **5**(6): 507-11.

Zwijssen, R. M., Wientjens, E., Klompmaker, R., van der Sman, J., Bernards, R. and Michalides, R. J. (1997). CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*. **88**(3): 405-15.





