

Technische Universität München

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Univ.-Prof. Dr. Jürgen Ruland

Untersuchungen zur Funktion von IKK β in der durch konstitutiv aktives CARMA1 vermittelten Lymphoproliferation

Louisa Nitsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Jürgen Ruland
2. Univ.-Prof. Dr. Angela Krackhardt

Die Dissertation wurde am 08.04.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.12.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1 T Zellrezeptor-Signalling.....	5
1.2 CARMA1.....	6
1.3 Der IKK-Komplex.....	9
1.4 NF- κ B.....	10
1.5 MAPK-Aktivierung durch den CARMA1/ BCL10/ MALT1-Komplex.....	10
1.6 Klinische Bedeutung des CARMA1/ BCL10/ MALT1-Komplexes.....	12
1.7 Mausmodell.....	14
2. Fragestellung.....	16
3. Material.....	17
3.1 Chemikalien und Antikörper	17
3.2 Puffer, Medien, Seren und Zusätze.....	18
3.3 Primer.....	19
3.4 Laborausstattung.....	20
3.5 Geräte.....	20
3.6 Software.....	21
4. Methoden.....	22
4.1 Mauslinien.....	22
4.2 Genotypisierung.....	23
4.3 Injektion von Tamoxifen und OH- Tamoxifen.....	24
4.4 Organentnahme.....	25
4.5 Percoll-Gradient.....	25
4.6 Trypanblaufärbung.....	25
4.7 Blutanalyse.....	25
4.8 Antikörperfärbung für die Durchflusszytometrie.....	25
4.9 Western Blot Lysate.....	26
4.10 Bradford-Methode.....	26
4.11 Western Blot.....	26

4.12 Statistik.....	27
5. Ergebnisse.....	28
5.1 Mausmodell A (IKK β^{ff} C Δ L+ ^{CD4CreERT2+}).....	28
5.1.1 (OH-) Tamoxifen-Dosisfindung	30
5.1.2 Kein Überlebensvorteil durch IKK β^{ff} im IKK β^{ff} C Δ L+ ^{CD4CreERT2+} Modell	31
5.1.3 Erfolgreiche Rekombination von C Δ L und T Zellaktivierung.....	33
5.1.4 Insuffiziente IKK β -Deletion im IKK β^{ff} C Δ L+ ^{CD4CreERT2+} Modell.....	36
5.2 Mausmodell B (IKK β^{ff} C Δ L+ ^{CD4Cre+}).....	37
5.2.1 Tod durch C Δ L-Expression im IKK β^{ff} C Δ L+ ^{CD4Cre+} Modell.....	37
5.2.2 Erfolgreiche Rekombination und Expression von C Δ L.....	38
5.2.3 Analyse im Alter von 24-54 Tagen: T Zellaktivierung.....	38
5.2.4 Analyse im Alter von 125-128 Tagen: Expansion von T, B und myeloiden Zellen, T Zellaktivierung.....	43
5.2.5 Ausblick: Analyse erkrankter Tiere.....	47
6. Diskussion.....	52
6.1 C Δ L+ ^{CD4CreERT2+} Modell: Möglichkeit einer selektiven Induktion einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 in T Zellen.....	52
6.2 IKK β bedeutend für Erkrankung und Tod eines konstitutiv aktiven CARMA1- Modells.....	55
6.3 Veränderter Phänotyp und Tod trotz IKK β^{ff} im murinen C Δ L+ Modell	56
6.4 Perspektiven: Therapeutische Ansätze.....	59
7. Zusammenfassung.....	62
8. Abkürzungsverzeichnis.....	64
9. Literaturverzeichnis.....	68
10. Danksagung.....	81

1. Einleitung

Als praktische angewandte Wissenschaft kann die Immunologie zum Verständnis von Krankheiten und zur Entwicklung neuer Therapien beitragen. Das Immunsystem hat die Funktion Krankheitserreger abzuwehren und körpereigene entartete Zellen zu erkennen und anzugreifen. Fehlregulationen können zu autoimmunen Erkrankungen oder malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems führen.

Das Immunsystem umfasst eine angeborene und eine adaptive (erworbene) Immunität. Die zellulären Bestandteile des Immunsystems entstammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark. Aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich lymphatische Progenitorzellen, die sich weiter in B und T Zellen differenzieren, und myeloische Progenitorzellen, die sich zu dendritischen Zellen, Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen entwickeln (Murphy et al., 2008).

Die adaptive Immunität wird durch B und T Zellen vermittelt. Die Zellen tragen spezifische Antigenrezeptoren. Durch Rekombination von mehreren Genabschnitten findet im Thymus das sogenannte Rearrangement der T Zell Rezeptoren (TCR) statt, welche die unterschiedlichen Antigene erkennen. T Zellen werden im Thymus nach dem Rearrangement zu funktionellen, Antigen erkennenden Zellen, jedoch nicht autoreaktive Zellen selektiert. Stimulierung des TCR resultiert in einer Genexpression, die eine spezifische Immunantwort ermöglicht.

Durch die Oberflächenantigene CD4 und CD8 unterscheiden sich zwei wesentliche Untertypen der T Zellen. Reife Zellen exprimieren eines, jedoch nicht beide Antigene. CD4+ Zellen erkennen an MHC II Komplexe gebundene Antigene auf Antigen präsentierenden Zellen (APCs) (Bonilla, 2011). CD4+ Zellen können in mehrere Subtypen unterteilt werden, die sich in ihrer Zytokinproduktion unterscheiden. Zytotoxische CD8+ Zellen erkennen an MHC I Komplexe gebundene zytosolische Antigene (Bonilla, 2011). MHC I Komplexe werden nicht nur auf APCs, sondern auch auf allen anderen Zellen des Körpers exprimiert (Bonilla, 2011). CD8 positive Zellen eliminieren ihre Targetzellen durch zytotoxische Granula und Aktivierung des FAS Signalweges (Bonilla, 2011).

Ein Signalweg, der NF- κ B-Signalweg, spielt dabei die zentrale Rolle in der adaptiven Immunität und ist von großer Bedeutung für Erkrankungen des hämatopoetischen Systems (Lenz und Davis et al., 2008; Oshiro et al., 2006). In dieser Arbeit wird der Fokus vorrangig auf den NF- κ B-Signalweg in T Zellen gelegt.

1.1 T Zellrezeptor-Signalling

Der klassische/ kanonische NF- κ B-Signalweg wird u.a. durch den T und B Zellrezeptor aktiviert. Die Bindung von Antigen-Major Histocompatibility Komplexen (MHC) an den T Zellrezeptor (TCR) löst eine Kaskade von intrazellulären biochemischen Reaktionen aus, die zur T Zellantwort, d.h. zur Genexpression, Proliferation und Differenzierung der T Zellen führt. Die Stimulierung des TCR resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT (nuclear factor of activated T cells), AP-1 (Aktivator Protein) und NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Murphy et al., 2008). Für eine stärkere T Zellaktivierung ist neben der Aktivierung des TCR die zusätzliche Stimulierung des Co-Rezeptors CD28 durch B7-1 und B7-2 auf APC notwendig (Harris und Ronchese, 1999; Kane et al., 2002).

Der TCR ist mit der ζ -Untereinheit und dem CD3-Komplex, welcher aus den γ -, δ -, ϵ -Untereinheiten zusammengesetzt ist, assoziiert (Murphy et al., 2008). Zwei Protein-Tyrosinkinase aus der Familie der Src Kinasen, Lck und Fyn, phosphorylieren nach Antigenrezeptor-Aktivierung die ITAMs des TCR/ CD3-Komplexes (Schulze-Luehrmann und Ghosh, 2006). Lck ist mit der zytoplasmatischen Domäne von CD4 bzw. CD8 verbunden (Murphy et al., 2008). Fyn ist mit der zytoplasmatischen Domäne des CD3-Komplexes und der ζ -Untereinheit verbunden (Murphy et al., 2008). ITAMs sind bestimmte Bereiche der zytoplasmatischen Domäne des TCR/ CD3-Komplexes, die die Aminosäure Tyrosin enthalten. Die Phosphorylierung nach TCR-Aktivierung ermöglicht die Rekrutierung anderer Signalproteine zu den ITAMs, wie die Kinase ZAP-70 aus der Familie der Syk Tyrosinkinase (Schulze-Luehrmann und Ghosh, 2006). Nach Rekrutierung wird ZAP-70 durch Lck phosphoryliert und aktiviert (Schulze-Luehrmann und Ghosh, 2006).

Zap70 phosphoryliert daraufhin LAT und SLP-76, was zur Rekrutierung und Aktivierung von PLC γ 1 führt (Murphy et al., 2008). PLC γ 1 katalysiert die Entstehung der Second

Messenger IP3 und DAG aus PIP2. IP3 sorgt für die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und für den Ca^{2+} -Einstrom von extra- nach intrazellulär. Dies führt zur Aktivierung von NF-AT (Cheng et al., 2011). DAG aktiviert RasGRP, was wiederum zur Aktivierung eines MAP-Kinase-Signalweges führt und in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 resultiert. Sowohl DAG als auch Ca^{2+} aktivieren weiterhin die PKC θ (Cheng et al., 2011).

PKC β , δ , ϵ , η , ζ und θ werden in T Zellen exprimiert, aber nur PKC θ wird nach TCR-Aktivierung rekrutiert und ist damit wichtig in der Signaltransduktion (Monks et al., 1998; Schulze-Luehrmann und Ghosh, 2006). Nach Aktivierung phosphoryliert PKC θ das Adapterprotein CARMA1 (Matsumoto et al., 2005; Rueda und Thome, 2005; Wang et al., 2004). Die Aktivierung von CARMA1 resultiert über Aktivierung von BCL10, MALT1 und des IKK-Komplexes schließlich in der Aktivierung von NF- κ B (s.u.).

1.2 CARMA1

CARMA1, welches auch CARD11 oder BIMP3 genannt wird, gehört zu der MAGUK-Proteinfamilie, die als Adaptermoleküle in der Plasmamembran eine wichtige Rolle spielen (Dimitratos et al., 1999). Adaptermoleküle bringen Kinasen und ihre Substrate durch Protein-Interaktionen zusammen und ermöglichen so die Weiterleitung verschiedener Signale. CARMA1 besitzt neben der N-terminalen CARD-Domäne, die homotype Protein-Interaktionen vermittelt, eine Coiled-Coil-Domäne, eine Linker-Region und eine MAGUK-Domäne, die aus einem PDZ-SH3-GUK Motiv besteht, welches charakteristisch für die Familie der MAGUK-Proteine ist (s. Abb. 1) (Bertin et al., 2001; Dimitratos et al., 1999; Gaide und Martinon et al., 2001). Es gibt zwei strukturell und funktionell sehr ähnliche Moleküle zu CARMA1: CARMA2, auch CARD14 oder BIMP2 genannt und CARMA3, auch CARD10 oder BIMP1 genannt (Bertin et al., 2001; McAllister-Lucas, Inohara, Lucas et al., 2001; Wang et al., 2001). Die drei Proteine werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert: CARMA1 hauptsächlich in Leukozyten im Blut, Thymus und in der Milz, CARMA2 in der Plazenta und CARMA3 in verschiedenen Organen, nicht jedoch in Leukozyten (Bertin et al., 2001; McAllister-Lucas, Inohara, Lucas et al., 2001; Wang et al., 2001).

CARMA1 ist konstitutiv mit der Plasmamembran assoziiert (Blonska und Lin, 2009; Blonska und Lin, 2011; Wang et al., 2004). Nach TCR-Stimulierung wird CARMA1 in

die immunologische Synapse rekrutiert (Hara et al., 2004; Wang et al., 2004). CARMA1 ist essentiell für die Aktivierung von NF- κ B. Ein Mausmodell mit einem in der Coiled-Coil-Domäne punktmutiertem und damit inaktivem CARMA1 zeigte defekte NF- κ B-Aktivierung (Jun et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden in einem Carma1 Knock Out-Mausmodell beobachtet (Hara et al., 2003).

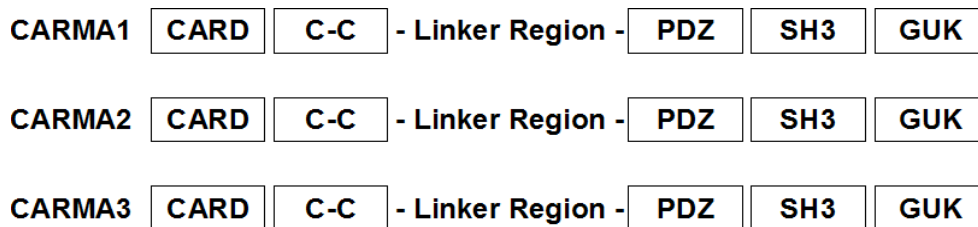


Abb. 1: Struktureller Aufbau von CARMA1, CARMA2, CARMA3 (nach Matsumoto et al., 2005). CARMA1 besitzt neben der N-terminalen CARD-Domäne, die homotype Protein-Interaktionen vermittelt, eine Coiled-Coil-Domäne, eine Linker-Region und eine MAGUK-Domäne, die aus einem PDZ-SH3-GUK Motiv besteht, welches charakteristisch für die Familie der MAGUK-Proteine ist.

PKC θ phosphoryliert CARMA1 in T Zellen nach Aktivierung des Antigen-Rezeptors (Matsumoto et al., 2005; Rueda und Thome, 2005; Sommer und Guo et al., 2005). Die Kinase phosphoryliert die Linker-Region an den Stellen S552 und S645 in humanen Leukozyten, bzw. S564 und S657 in murinen Zellen (Matsumoto et al., 2004; Sommer und Guo et al., 2005; Wang et al., 2004). CARMA1 geht durch diese Phosphorylierung von der inaktiven Form, die durch intramolekulare Bindung der CARD-Domäne und Coiled-Coil-Domäne mit der Linker-Region entsteht, in eine aktive, offene Konformation über (Sommer et al., 2005). Mutationen von S564 und S657 im Bereich der Linker-Region, d.h. Mutationen der Aminosäuren, welche von der PKC θ phosphoryliert werden, verhindern die Änderung der Konformation und damit die Aktivierung nach Stimulierung des Antigenrezeptors (Sommer et al., 2005). Deletion der Linker-Region in B und T Zellen wiederum führt zu einer konstitutiven Aktivierung von CARMA1 und die PKC θ ist für diese Aktivierung nicht mehr erforderlich (Abb. 2) (Sommer et al., 2005). Klinisch relevante, onkogene Mutationen, die zur konstitutiven NF- κ B-Aktivierung führen, werden in Kapitel 1.6 besprochen.

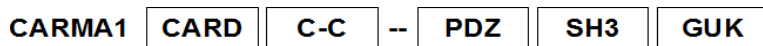


Abb. 2: CARMA1-Konstrukt mit deletierter Linker-Region von CARMA1 (CΔL). Deletion der Linker-Region führt zu einer konstitutiven Aktivierung von CARMA1 und PKCθ ist für diese Aktivierung nicht mehr erforderlich (Sommer et al., 2005).

Durch die Änderung der Konformation nach Phosphorylierung ist eine Oligomerisierung von CARMA1 möglich, welche durch die Coiled-Coil-Domäne vermittelt wird. Zudem interagiert das CARD-Motiv mit dem CARD-Motiv von BCL10 und die Coiled-Coil-Domäne mit MALT1 (Abb. 3) (Che et al., 2004; Matsumoto et al., 2005; McCully und Pomerantz, 2008; Rossmann et al., 2006; Schaefer et al., 2004; Sommer und Guo et al., 2005; Wang et al., 2004). BCL10 bindet konstitutiv an die Ig-Domäne von MALT1 (Abb. 3) (Che et al., 2004). Nach Aktivierung von CARMA1 kommt es zudem zur Oligomerisierung von BCL10 (Rossmann et al., 2006; Schaefer et al., 2004; Wang et al., 2004). Der Komplex aus CARMA1, BCL10 und MALT1 wird als CBM-Komplex bezeichnet.

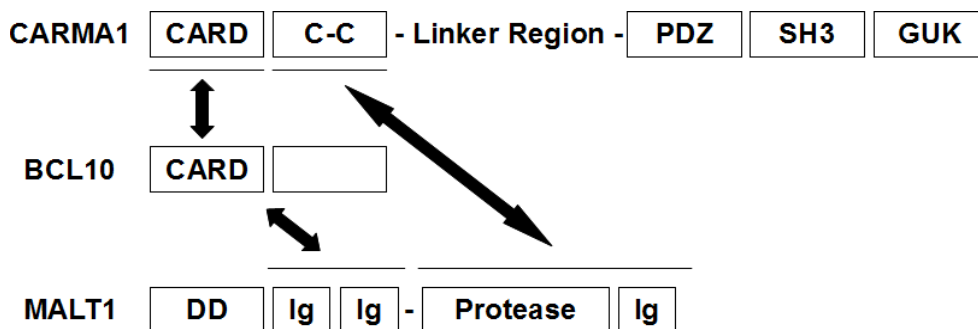


Abb. 3: Der CBM-Komplex: Interaktion von CARMA1, BCL10 und MALT1 (nach Thome et al., 2010) Das CARD-Motiv von CARMA1 interagiert mit dem CARD-Motiv von BCL10 und die Coiled-Coil-Domäne mit MALT1. BCL10 bindet zudem konstitutiv an die Ig-Domäne von MALT1.

Kinasen wie CamKII und HPK1 tragen zur Aktivierung von CARMA1 bei (Brenner et al., 2009; Ishiguro et al., 2009). Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass CK1a, PDK1, AKT, TAK1 und IKKβ nach TCR-Stimulierung mit CARMA1 assoziieren und mit zur Regulierung der NF-κB-Aktivierung beitragen (Bidère et al., 2009; Lee et al., 2005;

Shinohara et al., 2005). Die Aktivierung des CBM-Komplexes führt zur Aktivierung des IKK-Komplexes.

1.3 Der IKK-Komplex

Der IKK-Komplex besteht neben dem regulatorischen Element IKK γ (NEMO) aus den zwei Kinase-Untereinheiten IKK α und IKK β (Hayden und Ghosh, 2004). Es kommt durch Serin-Phosphorylierungen von IKK α/β in der Activation Loop, vermittelt durch TAK1 und TAB2, und K63-Polyubiquitinierung von IKK γ , vermittelt durch TRAF6, zur Aktivierung des IKK-Komplexes (Delhase et al., 1999; Ling et al., 1998; Sun et al., 2004; Zhou et al., 2004). CARMA1 ist entscheidend für die K63-Polyubiquitinierung von IKK γ und damit für die Aktivierung des IKK-Komplexes (Shambharkar et al., 2007; Stilo et al., 2004; Zhou et al., 2004). Nach Aktivierung phosphoryliert der IKK-Komplex I κ B, was zur K48-Ubiquitinierung und anschließenden Degradierung von I κ B durch das 26S Proteasom führt (Abb. 4) (Blonska und Lin, 2009). Der Abbau von I κ B führt zur Translokation von NF- κ B in den Nukleus (Abb. 4).

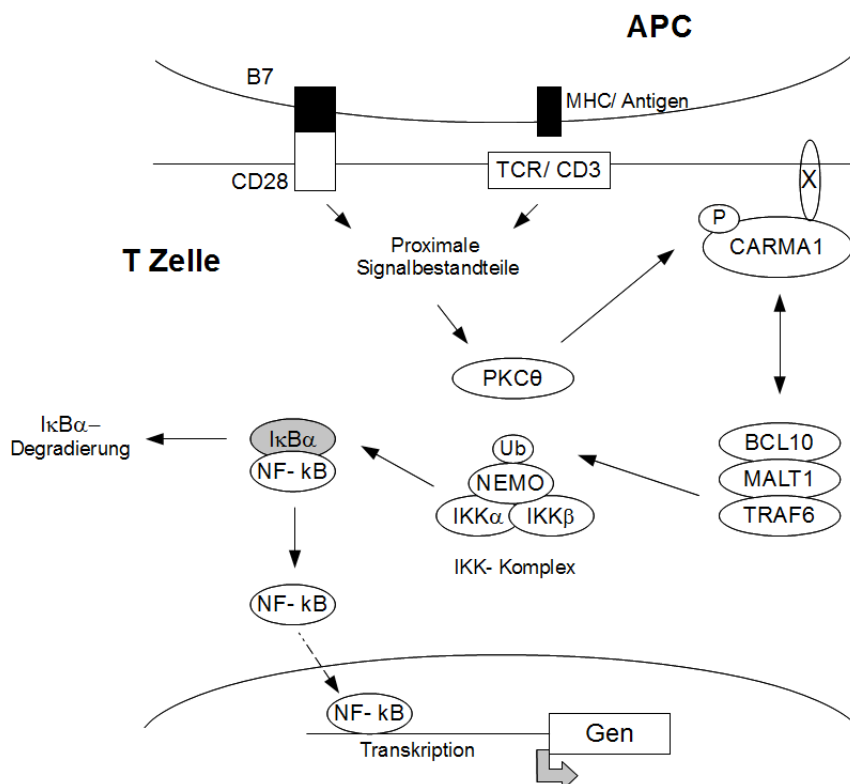


Abb. 4: Die TCR-vermittelte Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges (nach

Matsumoto et al., 2005). Die Aktivierung des TCR führt zur Aktivierung der PKC θ , die daraufhin CARMA1 phosphoryliert. Über Aktivierung von CARMA1, BCL10 und MALT1 kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes, der daraufhin I κ B phosphoryliert. Dies führt zur K48-Ubiquitinierung und Degradierung von I κ B, was die Translokation in den Nukleus und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ermöglicht.

1.4 NF- κ B

Die NF- κ B-Familie besteht bei Säugetieren aus fünf Transkriptionsfaktoren und zwar aus RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF- κ B 1) und p52 (NF- κ B 2) (Jost und Ruland, 2007). p50 entsteht durch Proteolyse aus p105, p52 aus p100 (Jost und Ruland, 2007). NF- κ B ist entscheidend für Entwicklung, Aktivierung, Proliferation und Überleben von Lymphozyten (Hayden und Ghosh, 2006; Jost und Ruland, 2007; Shih et al., 2011).

Die fünf NF- κ B-Transkriptionsfaktoren formen Homo- und Heterodimere (Shih et al., 2011). Die Transkriptionsfaktoren besitzen eine Rel Homology Domain (RHD), die für DNA-Bindung und Dimerisierung zuständig ist (Thome et al., 2010). Die Dimere bleiben zunächst inaktiv im Cytoplasma, indem I κ B die nukleäre Lokalisationssequenz von RelA, RelB und c-Rel maskiert, bzw. p100 und p105 erst durch Proteolyse in die aktive Form überführt werden müssen (Jost und Ruland, 2007; Shih et al., 2011). Die inaktiven Dimere bleiben im Zytoplasma und können nicht als Transkriptionsfaktoren wirken (Shih et al., 2011). Nach Aktivierung durch den klassischen oder alternativen Signalweg werden die NF- κ B-Dimere in den Zellkern transloziert und ermöglichen durch Bindung an κ B-Elemente-enthaltende Enhancer- und Promoter-Regionen die Transkription zahlreicher Gene, die für den Zell-Zyklus, Antiapoptose, die negative Rückkopplung des NF- κ B Signals und die Immunantwort, vermittelt z.B. durch IL2, IL6, CD40L, entscheidend sind (Hayden und Ghosh, 2004; Jost und Ruland, 2007; Shih et al., 2011).

1.5 MAPK-Aktivierung durch den CARMA1/ BCL10/ MALT1-Komplex

MAPK spielen in der Immunantwort, sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunität, eine bedeutende Rolle (Dong et al., 2002). In CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sind MAPK wichtig für Aktivierung, Differenzierung und Funktion (Zhang und Dong, 2005). Es gibt drei große Klassen unter den MAPK: ERK, p38 und JNK (Chang

und Karin, 2001). Charakteristisch für MAPK ist das Threonin-X-Tyrosin (TXY) Motiv in der Activation Loop (Zhang und Dong, 2005). Um die MAPK zu aktivieren, werden die Aminosäuren Threonin und Tyrosin des TXY-Motiv phosphoryliert (Zhang und Dong, 2005). MAPK können durch zahlreiche Stimuli wie LPS, TNF α , IL-1, oxidativen Stress oder TCR-Stimulierung aktiviert werden (Dong et al., 2002).

Die Gruppe der ERKs werden in die klassischen MAPK ERK1 und 2 und in die großen MAPK ERK3, ERK5, ERK7 und ERK8 unterteilt (Zhang und Dong, 2005). Die MAPK der Gruppe p38 werden in p38 α , β , γ , δ und ERK6 unterteilt und die MAPK JNK in JNK 1-3 (Gupta et al., 1996; Kuo et al., 2004; Lechner et al., 1996). Während JNK1 und 2 ubiquitär exprimiert werden, wird JNK3 kardial, testinal und im ZNS exprimiert (Gupta et al., 1996).

Im folgendem soll die Rolle des CBM-Komplexes in der Aktivierung der MAPK JNK und p38 verdeutlicht werden. JNK1 und JNK2 sind für Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von T Zellen wichtig (Dong et al., 2000; Dong et al., 2002; Weiss et al., 2000). TCR/CD28-Costimulierung führt zur verstärkten Expression und Aktivierung von JNK (Su et al., 1994; Weiss et al., 2000). Nach Aktivierung phosphoryliert eine MAP3K eine MAP2K, die schließlich JNK phosphoryliert (Davis, 2000). JNK1 und 2 kommen durch alternatives Splicing in einer 46kDa und in einer 54kDa Isoform vor (Gupta et al., 1996; Kallunki et al., 1994).

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein Dimer und besteht aus c-Jun, JunB oder JunD zusammen mit Fos oder einem ATF Family Protein (Eferl und Wagner, 2003). Der Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert Proliferation und Überleben von Lymphozyten (Shaulian und Karin, 2002). JNK1 ist für die Phosphorylierung von c-Jun des Dimer AP-1 verantwortlich und verstärkt damit die Funktion von c-Jun als Transkriptionsfaktor, während JNK2 vor allem c-Jun bindet, was zu Ubiquitinierung und Degradierung von c-Jun führt (Derijard et al., 1994; Fuchs et al., 1996; Fuchs et al., 1997; Gupta et al., 1996; Kallunki et al., 1994). Nach Aktivierung dissoziiert JNK2 von c-Jun, welches nun von JNK1 phosphoryliert und damit aktiviert werden kann (Sabapathy et al., 2004; Sabapathy und Wagner, 2004).

In Jurkat T Zellen mit einer dominant-negativen Form von CARMA1 ist die Aktivierung von JNK nach CD3/CD28-Costimulierung eingeschränkt (Gaide und Favier et al., 2002). Ähnliches gilt auch für CARMA1^{-/-} T Zellen: Nach Stimulierung der Zellen wird

JNK deutlich schwächer phosphoryliert (Hara et al., 2003). In MALT1^{-/-} T Zellen wird nach PMA-/ Ionomycin- und TCR-Stimulierung deutlich, dass JNK und auch p38 schwächer phosphoryliert werden (Ruland et al., 2003). Eine Veröffentlichung von Blonska et al., 2007 deutet darauf hin, dass besonders JNK2 von CARMA1 nach TCR-Stimulierung reguliert wird und dass CARMA1 induzierte Oligomerisierung von BCL10 dabei bedeutsam zu sein scheint, in dem BCL10 als Adaptermolekül für JNK2 und seine Kinasen dienen könnte (Blonska et al., 2007). Die MAP3K TAK1 und die MAP2K MKK7 kommen als Kinasen in der CBM abhängigen JNK Aktivierung in Frage (Dong et al., 2000; Liu et al., 2006; Wan und Chi et al., 2006).

1.6 Klinische Bedeutung des CARMA1/ BCL10/ MALT1-Komplexes

Der CBM-Komplex hat große Bedeutung in der Entstehung von malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Drei der häufig gefundenen chromosomalen Translokationen in MALT-Lymphomen, die t(11;18), t(14;18) und t(1;14) Translokation, haben als Pathomechanismus die erhöhte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch aberrantes Signalling von BCL10 und MALT1 und verstärken damit das Überleben entarteter B Lymphozyten (Sagaert et al., 2007). CARMA1 trägt durch Überexpression und konstitutive Aktivierung von NF- κ B mit zur Pathogenese der (des) adulten T Zell Leukämie (Lymphoms) bei (Oshiro et al., 2006). Zudem ist Überexpression von CARMA1 an der Entstehung oder Progression im primär gastrointestinalen B Zell Lymphom beteiligt, insbesondere bei Patienten ohne Nachweis einer Infektion von Helicobacter pylori (Nakamura et al., 2005). Im primären ZNS-Lymphom, einer Untergruppe des diffus großzelligen B Zell Lymphoms, wurden in 16% Mutationen in der Coiled-Coil-Domäne von CARMA1, die zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führen können, gefunden (Montesinos-Rongen et al., 2010). Zudem spielt CARMA1 eine wichtige Rolle im nicht primär cerebralen diffus großzelligen B Zell Lymphom (DLBCL) (Dong et al., 2011; Lenz und Davis et al., 2008).

Das aggressive DLBCL ist mit ca. 25% der Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) das häufigste NHL (Morton et al, 2006). Die Inzidenz in Europa beträgt 3,13/ 100.000 Einwohner und steigt mit zunehmendem Alter an (Sant et al., 2010). Das DLBCL kann mit Genexpressionsanalysen in zwei wichtige Subtypen unterteilt werden: in das Germinal center like (GCB) und das Activated B cell-like (ABC) DLBCL (Alizadeh et al., 2000; Nogai et al., 2011). Tumorzellen des GCB DLBCL ähneln B Zellen des

Keimzentrums, wohingegen das ABC DLBCL aus B Zellen zu entstehen scheint, die zu Plasmazellen differenzieren (Alizadeh et al., 2000). Patienten mit einem ABC DLBCL haben eine deutlich schlechtere Prognose im Vergleich zu Patienten mit GCB DLBCL (Abb. 5) (Alizadeh et al., 2000; Nogai et al., 2011).

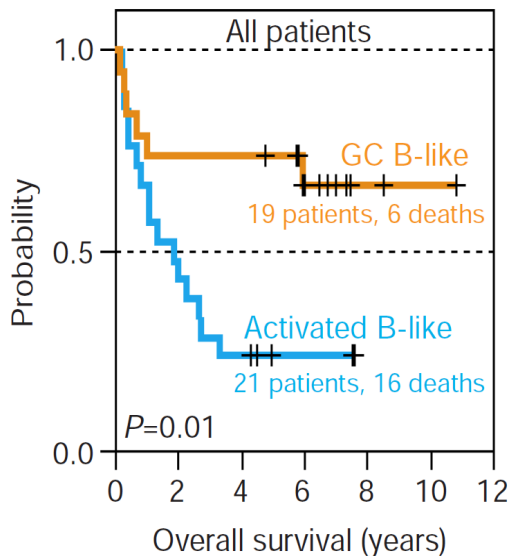


Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurve: GCB DLBCL vs. ABC DLBCL (Alizadeh et al., 2000). Patienten mit dem ABC DLBCL haben eine deutlich schlechtere Prognose im Vergleich zu Patienten mit der GCB Untergruppe des DLBCL

In dem aggressiven ABC Subtyp ist im Gegensatz zum GCB Subtyp NF- κ B konstitutiv aktiviert (Davis et al., 2001; Lenz und Davis et al., 2008). NF- κ B ist hierbei wichtig für das Überleben der entarteten Lymphozyten und CARMA1 shRNA ist toxisch für diese Zellen (Davis et al., 2001; Lam et al., 2005; Ngo und Davis et al., 2006). In Biopsien von Patienten des ABC Typs konnten in 9,6% (7/73) Fällen Missense-Mutationen von CARMA1 nachgewiesen werden und zwar in oder unmittelbar nahe der Coiled-coil-Domäne (Lenz und Davis et al., 2008). Lenz und Davis veröffentlichten ein Zellmodell, bei dem Jurkat T Zellen CARMA1 mit Mutationen in Bereich der Coiled-Coil-Domäne exprimierten (Lenz und Davis et al., 2008). Dadurch kam es entweder zu einer starken oder mäßig erhöhten NF- κ B-Aktivierung ohne äußere Stimuli. Nach Aktivierung des TCRs kam es zudem zusätzlich zu einer verstärkten NF- κ B-Aktivierung. Lameson et al., veröffentlichten ähnliche Ergebnisse (Lameson et al., 2010). Die onkogenen Mutationen F123I, welche in der Region zwischen der CARD und der Coiled-Coil-Domäne liegt, und L225LI, welche in der Coiled-Coil-Domäne liegt, erhöhten die Aktivität von CARMA1 vergleichbar mit einer CARMA1-Mutante mit Deletion der Linker-Region. Zudem umgehen die Mutationen die im Wildtyp zur Aktivierung

notwendige Phosphorylierung durch die Proteinkinase und führen zur spontanen Rezeptor unabhängigen Aktivierung von NF- κ B. Es kommt durch diese Mutationen von CARMA1 zu einem Gain-of-Function, der in einer konstitutiven IKK-Aktivierung und zu einer verstärkten NF- κ B-Aktivierung nach TCR-Stimulierung resultiert (Lenz und Davis et al., 2008). Die Coiled-Coil-Region hält CARMA1 in einem inaktiven Zustand, die durch intramolekulare Bindung der Coiled-Coil-Domäne und auch der CARD-Domäne mit der Linker-Region entsteht. CARMA1 kann entweder physiologisch durch Aktivierung des TCRs oder durch die oben beschriebenen Mutationen im Bereich der Coiled-Coil-Region in eine offene und aktive Konformation übergehen (Lenz und Davis et al., 2008; Lameson et al., 2010).

Die derzeitige Standardtherapie des DLBCL besteht aus der sogenannten R-CHOP-Therapie. Diese besteht aus Rituximab, einem Anti-CD20-Antikörper, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Oncovin (Vincristin) und Prednison. Bei einem Teil der Patienten wird die Chemotherapie mit einer Radiotherapie kombiniert. Genaue Kenntnisse über die Rolle von CARMA1 in dem klassischen NF- κ B-Signalweg und über die Rolle der Aktivierung von MAPK durch den CBM-Komplex sind überaus wichtig, um weitere, effektivere Behandlungsstrategien entwickeln zu können, z.B. durch spezifische Chemotherapeutika, die im Bereich des NF- κ B-Signalweges ansetzen, mit dem Ziel die Letalität besonders der Patienten mit dem ABC DLBCL zu senken.

1.7 Mausmodell

Als Modell wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell verwendet, das eine konstitutiv aktive Form von CARMA1 exprimiert in Anlehnung an den Pathomechanismus des ABC DLBCL. IKK β^{ff} C Δ L^{CD4CreERT2+} und IKK β^{ff} C Δ L^{CD4Cre+} Mäuse wurden für die Experimente verwendet. In dem Mausmodell kam es durch das Cre/ loxP-System T zellspezifisch zur C Δ L-Expression, einer CARMA1 Mutante mit Deletion der Linker Region. Durch Deletion der Linker Region (C Δ L) nimmt CARMA1 eine offene Konfiguration an und es kommt zur konstitutiven Aktivierung von CARMA1 und des NF- κ B-Signalweges (Blonska et al., 2012; Sommer und Guo et al., 2005). Die C Δ L-Mutante umgeht die zur Aktivierung physiologisch notwendige Phosphorylierung durch die PKC. Die Generierung der C Δ L^{CD4Cre+} Mäuse erfolgte durch Pechloff K, Forschungslabor Molekulare Immunologie, Institut für klinische Chemie und

Pathobiochemie (Pechloff 2010, unveröffentlichte Daten). $C\Delta L^{+CD4^{Cre+}}$ Mäuse haben ein mittleres Überleben von 49 Tagen. Es kommt zu einer Splenomegalie und vergrößerten Lymphknoten. Zudem ist der Anteil der T Zellen in der Milz und Knochenmark erhöht, T Zellen sind aktiviert und die Organe zeigten mit T Zellinfiltrate (Pechloff 2010, unveröffentlichte Daten).

Neben der T zellspezifischen Expression der konstitutv aktiven Mutante von CARMA1 kam es in dem $IKK\beta^{flf} C\Delta L^{+CD4^{CreERT2+}}$ Modell durch das Cre/ loxP-System zudem zu einer T zellspezifischen Deletion des 3. Exon von $IKK\beta$ und damit zur Deletion/ Inaktivierung von $IKK\beta$.

2. Fragestellung

Der klassische NF- κ B-Signalweg ist wichtig für die Antigenrezeptor vermittelte Immunität des adaptiven Immunsystems. Ein Komplex aus CARMA1, BCL10 und MALT1, der sogenannte CBM-Komplex, ist zentraler Bestandteil des klassischen NF- κ B-Signalwegs. Bei lymphoproliferativen Erkrankungen des adaptiven Immunsystems wie im primär gastrointestinalen B Zell Lymphom, im primären ZNS-Lymphom oder im diffus großzelligen B Zell Lymphom, spielt der CBM-Komplex durch gesteigerte Expression oder konstitutive Aktivierung von CARMA1 eine wichtige Rolle (Dong et al., 2011; Lenz und Davis et al., 2008; Montesinos-Rongen et al., 2010; Nakamura et al., 2005; Oshiro et al., 2006). So konnten in Biopsien vom aggressiven ABC Subtyp des diffus großzelligen B Zell Lymphoms in knapp 10% der Fälle Missense Mutationen von CARMA1 nachgewiesen werden, die zur konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führen (Lenz und Davis et al., 2008). Die Aktivierung des CBM-Komplex führt jedoch neben der Aktivierung von NF- κ B auch zur Aktivierung anderer Signalwege wie zur MAPK-Aktivierung. Um neue spezifische Therapieansätze bei Erkrankungen des adaptiven Immunsystems entwickeln zu können, ist eine genaue Kenntnis darüber, ob der entscheidende Pathomechanismus einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 im DLBCL allein in der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges liegt, überaus wichtig.

Zentraler Punkt dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, inwieweit CARMA1 allein über Aktivierung von IKK β zu T Zellaktivierung, Zellexpansion und Lebensdauer der Mäuse mit einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 beiträgt. Für die Fragestellung wurde ein Mausmodell mit T zellspezifischer Expression einer konstitutiv aktiven Form von CARMA1, eines CARMA1-Konstrukt mit Deletion der Linker Region, verwendet. Zudem wurde IKK β in diesem Modell T zellspezifisch deletiert.

3. Material

3.1 Chemikalien und Antikörper

Acrylamid, Rotiphorese 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Wien
Albumin Fraction V	Roth, Karlsruhe
Anti- β Actin Antikörper (rabbit)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Anti-IKK β Antikörper (mouse)	Upstate, Waltham, USA
Anti-mouse IgG HRP linked	Cell Signaling Technologies, Danvers MA, USA
Anti-rabbit IgG, HRP linked	Cell Signaling Technologies, Danvers MA, USA
Anti-mouse CD3e	eBioscience, San Diego, USA
Anti-mouse CD28	eBioscience, San Diego, USA
Aqua ad iniectabilia Diaco	Diaco, Triest, Italien
Aqua B. Braun	Braun, Melsungen
α -FC CD16-32	eBioscience, San Diego, USA
Detection Reagent 1, Peroxide Solution	Thermo Scientific, Cramlington UK
Detection Reagent 2, Luminol Enhancer Solution	
dNTP-Mix 25mM	Bioline, Luckenwalde
10x (1x) DPBS	Invitrogen, Karlsruhe
Dyna beads	Invitrogen, Karlsruhe
Pan B (B220)/CD8/ Sheep anti rat	
Easycoll separating solution	Biochrom, Berlin
Ethidiumbromid 0,07%	Applichem, Darmstadt
FACS Antikörper	eBioscience, San Diego, USA
FACS Clean/Save	BD, Heidelberg
FACS Flow	BD, Heidelberg
FACS Rinse	BD, Heidelberg
FACS shut down solution	BD, Heidelberg
GeneRuler 100bp Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	J.T. Baker, Deventer, NDL
Milchpulver	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Peanut oil	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Protease Inhibitor, Cocktail Set I	Calbiochem, Darmstadt
Purified BSA 100x, 10mg/ml	Biolabs, Ipswich MA, USA
Taq DNA Polymerase 5u/µl + 10x reaction Buffer	Peqlab, Erlangen
Taq DNA Polymerase 10x Reaction Buffer	GE Healthcare, Berlin
Rabbit anti-Syrian hamster IgG	Jackson Immuno Research, Soham, UK
Salzsäure, 37%	Merck, Darmstadt
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega, Mannheim

3.2 Puffer, Medien, Seren und Zusätze

Foetal Bovine Serum (FCS)	Thermo Scientific, Cramlington UK
L-Glutamin, 200mM	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mecaptoethanol, 50mM	Invitrogen, Karlsruhe
Pen Strep (100u/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Red Cell Lysis Buffer	eBioscience, San Diego, USA
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe

FACS Puffer

3,19 Vol-% FCS in 1xPBS

RPMI 1640 Medium

1/5/10 Vol.-% FCS, 1 Vol-% Glutamin (200mM), 1 Vol-% Pen Strep (100u/ml), 0,1 Vol-% β -Mercaptoethanol (50mM) in RPMI 1640 Medium

Laufpuffer

3,02g Tris, 14,4g Glycin, 1 Vol-% SDS in 1000ml Aqua dest

TAE Puffer

0,4M Tris Acetat, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5M EDTA (ph8) in Aqua dest.

1x TBST

2,4g Tris, 8g NaCl in 1000ml aqua dest. (PH 7.4)

Transfer Puffer (semidry)

5,83g Tris, 2,94 g Glycin, 17,75 μ l 20x SDS, 200ml MetOH in 800ml H₂O

3.3 Primer

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

CARMA1

Fwd: 5`-GTCGTCACACTTGAGGGA

Rev: 5`-GCGCCTGTCCAAGCAG

CD4Cre/ CD4CreERT2

Fwd: 5`-ACCAGCCAGCTATCAACTCG3`

Rev: 5`-TTACATTGGTCCAGCCACC3

IKKβ

Fwd: 5`-CACAGTGCCACATTATTTAGATA3

Rev: 5`-GTCTTCAACCTCCCAAGCCTT3`

3.4 Laborausstattung

CL-X Posure Film	Thermo Scientific
Einmalspritzen 2ml, 20ml	Braun, Melsungen
Einmalinjektionskanülen Gr.12	Braun, Melsungen
Falcon 50ml Röhrchen	BD, Heidelberg
Falcon Zellsieb (70µm, 100µm)	BD, Heidelberg
Kryoröhrchen 2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PCR 8-er Röhrchen	Peske GmbH, Aindling-Arnhofen
Pipetten serologische 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen gestopft (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	ART, San Diego
Pipettenspitzen ungestopft (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Fastrack, Warschau
Spritze mit Kanüle, 1ml	BD, Heidelberg
Zellkulturplatten (96U/F-well, 24-well, 6- well)	TPP, Trasadingen
Zentrifugenröhrchen 15ml	TPP, Trasadingen

3.5 Geräte

Analysenwaage	Denver Instruments, Göttingen
Blotkammer (semidry)	Bio Rad, München
Cell Sorter MoFlo II	Beckman Coulter, Brea, USA
Durchflusszytometer FACS CANTO II	BD, Heidelberg
Elisa Reader	Tecan, Crailsheim

Entwickler	Protec, Oberstenfeld
Gelelektrophoresekammer	Bio Rad, München
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschrank	Binder, Tuttlingen
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Laufkammer	Bio Rad, München
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Magnetrührgerät	Ika, Staufen
Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	HBG, Deutschland
PCR Agarosekammer	Bio Rad, München
PCR Thermocycler	Bio Rad, München
Rollmischer	CAT Staufen
Sterile Werkbank Holten	Gydewang, Dänemark
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Vortex Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

3.6 Software

FlowJo Software	Tree Star Inc.
Graph Prism 5	GraphPad Software Inc.
Microsoft Excel	Microsoft
Scion Imaging Software	Scion Corporation

4. Methoden

4.1 Mauslinien

Die Mauslinien besaßen einen C57Bl/6 Hintergrund. CD4Cre⁺ (Lee et al., 2001) und CD4CreERT2⁺ (Aghajani et al., 2012) Mäuse wurden mit C Δ L⁺ und IKK β ^{ff} Tieren verpaart. IKK β ^{ff} C Δ L⁺CD4CreERT2⁺ und IKK β ^{ff} C Δ L⁺CD4Cre⁺ Mäuse wurden für die Untersuchungen verwendet. Die Mäuse wurden in einem keimfreien Raum gehalten.

CD4Cre⁺ Mäuse exprimieren eine Cre-Rekombinase T zellspezifisch (Lee et al., 2001). Die Cre-Rekombinase erkennt loxP-flankierte DNA-Sequenzen und deletiert diese. Die CD4CreERT2-Rekombinase ist eine an einen modifizierten Estrogenrezeptor gekoppelte Cre-Rekombinase. Der modifizierte Estrogenrezeptor wird durch Tamoxifen oder OH-Tamoxifen aktiviert und die CD4CreERT2-Rekombinase daraufhin aus dem Zytoplasma in den Kern transloziert (Aghajani et al., 2012). Dort erkennt die CD4CreERT2-Rekombinase die loxP-flankierte DNA. Durch endogenes Estrogen wird die CD4CreERT2-Rekombinase nicht aktiviert (Schwenk et al., 1998).

Die Generierung der C Δ L⁺ Mäusen erfolgte durch Pechloff K, Forschungslabor Molekulare Immunologie, Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie (Pechloff 2010, unveröffentlichte Daten). In der Maus verhindert zunächst eine loxP-flankierte STOP-Kassette vor der C Δ L-DNA die Expression der konstitutiv aktiven Carma1 Mutante und der unter dem gleichen endogenen, murinen, ROSA26-Promoter stehenden eGFP-DNA. Nach Verpaarung mit der CD4Cre-transgenen Mauslinie wurde die gewünschte Expression von C Δ L und eGFP durch Deletion der STOP-Kassette T zellspezifisch erreicht. eGFP diente zur fluoreszenzbasierten Detektion von Zellen mit Cre-vermittelter Deletion der STOP-Kassette.

Bei den IKK β ^{ff} C Δ L⁺CD4Cre(ERT2⁺) Mäusen flankierten loxP-Sequenzen das 3. Exon von IKK β , welches für die ATP bindende Stelle kodiert (Li et al., 2003). Das Einfügen der loxP-Sequenzen verändert die Funktion von IKK β nicht (Li et al., 2003). Homozygote IKK β ^{ff} Mäuse sind lebensfähig und unterscheiden sich im Phänotyp nicht vom Wildtyp (Li et al., 2003). Durch die CD4Cre-Rekombinase wurde das Exon T zellspezifisch deletiert und IKK β inaktiviert.

4.2 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde eine Polymerasekettenreaktion von $C\Delta L$, $IKK\beta^f$ und $CD4Cre$ bzw. $CD4CreERT2$ und eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA wurde aus der Schwanzspitze mit dem Wizard SV Genomic DNA Purification System gemäß Protokoll extrahiert. Zur Amplifizierung der DNA mittels PCR wurden folgende Ansätze verwendet:

Zu amplifizierendes Gen	$C\Delta L/ IKK\beta^f$	$CD4Cre/ CD4CreERT2$
DNA-Probe	1 μ l	1 μ l
Aqua ad injectabilia	18,6 μ l	19,1 μ l
dNTPs (25mM) (BIOLINE)	2,5 μ l	2 μ l
Primer 1 (s.o.) (10 μ M)	0,1 μ l	0,1 μ l
Primer 2 (s.o.) (10 μ M)	0,1 μ l	0,1 μ l
Taq-Polymerase (5u/ μ l) (Peqlab)		0,2 μ l
Taq-Polymerase (5u/ μ l) (GE Healthcare)	0,2 μ l	
10x Reaktionspuffer Y (Peqlab)		2,5 μ l
10x Reaktionspuffer (GE Healthcare)	2,5 μ l	

Die Proben wurden daraufhin in einen Thermocycler mit den folgenden Sequenzen überführt:

Zu amplifizierendes Gen	$C\Delta L/ IKK\beta^f$
Initiale Denaturierung	5' 95°C
<u>35 Zyklen:</u>	
Denaturationsphase	0,30' 95°C
Anlagerungsphase	0,30' 59°C
Extensionsphase	1,00' 72°C

Zu amplifizierendes Gen	CD4Cre/ CD4CreERT2
Initiale Denaturierung	2' 95°C
<u>15 Zyklen:</u>	
Denaturationsphase	0,30' 95°C
Anlagerungsphase	0,30' 64°C
Extensionsphase	0,30' 72°C
<u>20 Zyklen:</u>	
Denaturationsphase	0,30' 95°C
Anlagerungsphase	0,30' 58°C
Extensionsphase	0,30' 72°C

17µl der Proben und 6µl eines Markers (GeneRuler 100bp Plus) wurden auf ein 1% Agarosegel in 1x TAE und 1 Tropfen Ethidiumbromid/ 100ml pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 120V für 20-30min unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer. Die DNA wird bei dieser Methode größenabhängig aufgetrennt. Es kommt nach Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA zur Erhöhung der Fluoreszenz von Ethidiumbromid nach Anregung mit UV-Licht, was eine Detektion ermöglicht.

4.3 Injektion von Tamoxifen und OH- Tamoxifen

Die CD4CreERT2-Rekombinase wird durch den selektiven Estrogenrezeptormodulator (OH-) Tamoxifen aktiviert. OH-Tamoxifen, ein Tamoxifenmetabolit, besitzt eine höhere Affinität zum Estrogenrezeptor (Feil et al., 2009). 6-8 Wochen alten Mäusen wurde unter einer sterilen Werkbank einmal bzw. zweimal pro Tag je 0,1ml einer (OH-) Tamoxifen-Lösung intraperitoneal injiziert. Dafür wurden 40mg Tamoxifen unter sterilen Bedingungen zu 0,2ml Ethanol und 1,8ml Erdnussöl für die finale Konzentration von 20mg/ml gegeben. Um das Tamoxifen in Lösung zu bringen, wurde das Tamoxifen-Ethanol-Öl-Gemisch 20min sonifiziert. Für die OH-Tamoxifen-Lösung mit der finalen Konzentration von 10mg/ml wurden 25mg OH-Tamoxifen in 0,25ml Ethanol und 2,25ml Erdnussöl für 20min sonifiziert.

4.4 Organentnahme

Den Mäusen wurden Leber, Lunge, Niere, Thymus, Knochenmark, Milz und Lymphknoten entnommen. Zudem erfolgte eine Peritoneallavage mit 5% FCS in RPMI. Anschließend erfolgte eine Einzelzellsuspension mit 5% FCS in RPMI. Ein Percoll-Gradient von Lunge, Niere und Leber und eine Erythrozytenlyse von Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Lunge, Leber und Niere wurde angeschlossen. Je $0,7 \cdot 10^6$ der Zellen wurden für eine durchflusszytometrische Färbung verwendet.

4.5 Percoll-Gradient

Leber, Lunge und Niere wurden in 5 ml 40% Easycoll Separating Solution in 1xPBS suspendiert, mit 5ml 80% Easycoll Separating Solution in 1x PBS unterschichtet, anschließend für 20min bei 2600rpm RT zentrifugiert und die Interphase mit einer 1ml Pipette abgenommen.

4.6 Trypanblaufärbung

Trypanblau färbt tote Zellen an, lebende Zellen werden nicht gefärbt. Um die Anzahl lebender Zellen zu ermitteln, wurden die Zellsuspensionen in einer 1:4 Verdünnung mit Trypanblau in eine Neubauer Zählkammer überführt und die lebenden Zellen mit einem Lichtmikroskop gezählt.

4.7 Blutanalyse

Es erfolgte submandibulär die Punktion venöser Gefäße mit einer Blutzuckerlanzette. Das Blut wurde mit einer EDTA-Monovette aufgefangen. Das Blut wurde anschließend in ein FACS-Röhrchen überführt und die Erythrozyten mit 4ml Red Cell Lysis Puffer für 5min bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen.

4.8 Antikörperfärbung für die Durchflusszytometrie

Die Zellen aus dem Blut und Organen wurden für eine Erythrozytenlyse mit FACS-

Puffer gewaschen. Dann erfolgte zunächst eine Inkubation mit einem α -FC CD16-32-Antikörper für 5min, danach mit dem jeweiligen FACS Antikörpern für 15min.

4.9 Western Blot Lysate

Mit dem Cell Sorter MoFlo II wurden eGFP+ Zellen aus Lymphknoten und Milz extrahiert, d.h. eGFP+ Zellen wurden aus der Einzelzellsuspension aufgereinigt. Die eGFP+ Zellen wurden kryokonserviert und bei -80°C aufbewahrt. Für Western Blot Lysate wurden die Zellen mit $20\mu\text{l}$ 1% TritonX-100 mit 150mM NaCl, 50mM TRIS pH 8.0, 1mM Natriumvanadat und Protease-Inhibitor bei 4°C für 10min inkubiert, danach für 5min bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Cup überführt.

4.10 Bradford-Methode

Mit der Bradford-Methode wurden die Proteinkonzentration in den Zelllysaten gemessen. Es wurden $100\mu\text{l}$ 1:5 verdünntes Bradford Reagenz mit $1\mu\text{l}$ der Probe auf eine 96F Well Platte pipettiert und die Änderung der Extinktion des Reagenzes mit einem ELISA-Reader gemessen. Als Standardreihe diente je $1\mu\text{l}$ BSA in den Konzentrationen 5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,0625mg/ml und 0,03125mg/ml. Mit Hilfe der Standardreihe wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet, um gleiche Proteinmengen für den Western Blot zu erhalten.

4.11 Western Blot

Die Deletion von IKK β in eGFP+ gesorteten Zellen bzw. in aufgereinigten T Zellen aus IKK β^{fl} C Δ L $^{+\text{CD4Cre+}}$ (CD4CreERT2+) Mäusen wurde mit einem Western Blot überprüft. Die Auftrennung der Proteine wurde nach Laemmli mit der denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gel Electrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1979). Dabei wurde für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein 7,5% Trenngel verwendet (aus 4,9ml Aqua Bidestillata, 2,5ml 1,5M Tris/HCl ph 8,8, 2,5ml 30% Acrylamid-Bisacrylamid, $100\mu\text{l}$ 10%SDS, $50\mu\text{l}$ 10% APS und $5\mu\text{l}$ TEMED) und mit 20-25 μl Probe bzw. $5\mu\text{l}$ eines Protein-Markers beladen. Eine Kammer mit dem Gel und Laufpuffer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen zunächst für 10-15min bei 100V, dann

für weitere 70min bei 120V. Danach wurde das Gel im Semidry-Verfahren mit Transferpuffer auf eine Polyvinylidendifluoridmembran bei 25V für 1h geblottet. Um sicherzustellen, dass der Transfer gleichmäßig erfolgte, wurde die Membran 2min mit Ponceau-Lösung inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen und fotokopiert. Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, kam die Membran zunächst in eine Lösung von 5% Milch in TBST bevor der Erstantikörper IKK β (1:1000 in 5% Milch) bzw β -Actin (1:5000 in 5% Milch) bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Danach wurde die Membran 4 mal mit TBST gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Der Zweitantikörper wurde daraufhin für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Detektion von IKK β wurde HRP-konjugierter α -mouse Antikörper (1:1000 in 5% Milch) verwendet und für β -Actin HRP- α -rabbit (1:2000 in 5% Milch). Anschließend wurde die Membran 4 mal mit TBST gewaschen. Indem die Substrate für die HRP, Detection Reagent 1 und 2, auf die Membran gebracht wurden, konnten Proteinbanden durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden. Mit der Densitometrie wurde die Stärke der Banden quantifiziert.

4.12 Statistik

Mit dem Student's Two-Tailed T-Test wurde die statistische Signifikanz in dem Programm GraphPad Prism berechnet.

5. Ergebnisse

5.1 Mausmodell A ($IKK\beta^{ff} C\Delta L^{CD4CreERT2+}$)

Zentraler Punkt dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, inwieweit CARMA1 alleine über Aktivierung von $IKK\beta$ zu T Zellaktivierung, Zellexpansion und Lebensdauer der Mäuse mit einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 beiträgt. Denn auch andere Signalwege wie z.B. der MAPK-Signalwege werden durch den CBM-Komplex aktiviert. Diese Fragestellung wurde anhand eines Mausmodells mit T zellspezifische Expression einer konstitutiv aktiven CARMA1-Mutante bei gleichzeitiger T zellspezifischer Deletion von $IKK\beta$ behandelt (Abb. 6).

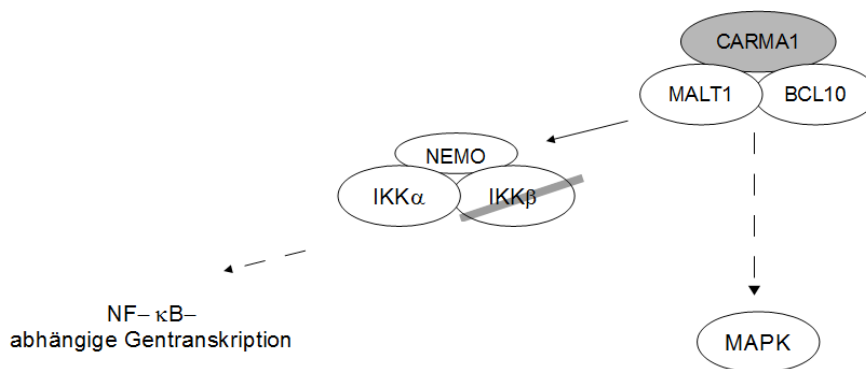


Abb. 6: Das $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{CD4CreERT2+}$ und $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{CD4Cre+}$ Mausmodell. T zellspezifisch kommt es mit Hilfe des $CD4Cre(ERT2)/loxP$ -Systems zur Expression einer konstitutiv aktiven CARMA1-Mutante bei gleichzeitiger Deletion von $IKK\beta$.

$IKK\beta^{ff} C\Delta L^{CD4CreERT2+}$ und $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{CD4Cre+}$ Mäuse wurden für die Experimente verwendet (Abb. 7). $CD4Cre+$ Mäuse (Mausmodell B) exprimieren eine Cre-Rekombinase T zellspezifisch (Lee et al., 2001). Die Cre-Rekombinase erkennt loxP-flankierte DNA-Sequenzen und deletiert diese. Die $CD4CreERT2$ -Rekombinase (Mausmodell A) ist eine an einen modifizierten Estrogenrezeptor gekoppelte $CD4Cre$ -Rekombinase, die durch Tamoxifen oder OH-Tamoxifen aktiviert und daraufhin aus dem Zytoplasma in den Kern transloziert wird (Aghajani et al., 2012). Dort erkennt die Cre-Rekombinase die loxP-flankierte DNA. Durch endogenes Estrogen wird die $CD4CreERT2$ -Rekombinase nicht aktiviert (Schwenk et al., 1998).

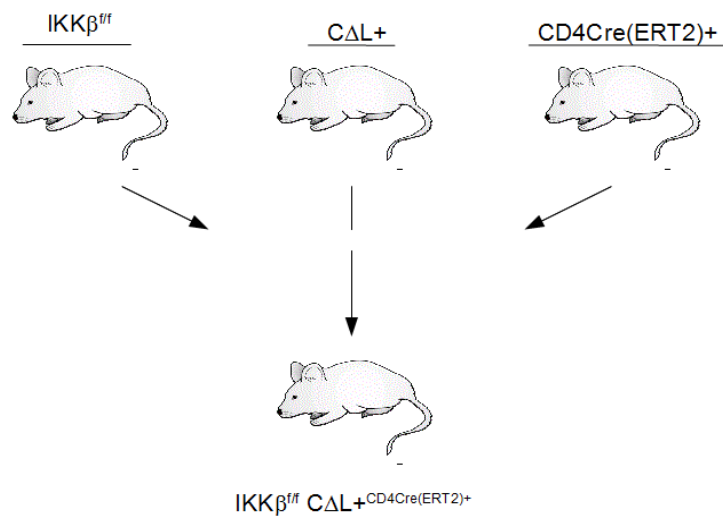


Abb. 7: Mausmodelle/ Zuchtstrategien. $IKK\beta^{fl/fl} C\Delta L^{+} CD4Cre(ERT2)^{+}$ Mäuse wurden für die Experimente verwendet.

Durch Deletion der Linker Region ($C\Delta L$) nimmt CARMA1 eine offene Konfiguration an und es kommt zu einer konstitutiven Aktivierung von CARMA1 und des NF- κ B-Signalweges (Blonska et al., 2012; Sommer und Guo et al., 2005). Die $C\Delta L$ -Mutante umgeht die zur Aktivierung physiologisch notwendige Phosphorylierung durch die PKC. In dem Mausmodell verhindert zunächst eine loxP-flankierte STOP-Kassette vor der $C\Delta L$ -DNA die Expression der konstitutiv aktiven CARMA1 Mutante und der unter dem gleichen endogenen murinen ROSA26-Promoter stehenden eGFP DNA. Nach Verpaarung mit der CD4Cre-transgenen Mauslinie wurde die gewünschte Expression von $C\Delta L$ und eGFP durch Deletion der STOP-Kassette T zellspezifisch erreicht. eGFP diente zur fluoreszenzbasierten Detektion von Zellen mit Cre-vermittelter Deletion der STOP-Kassette. Die Analyse des $C\Delta L^{+} CD4Cre^{+}$ Mausmodells erfolgte durch K. Pechloff und wurde in der Einleitung beschrieben.

Im $IKK\beta^{fl/fl} C\Delta L^{+} CD4Cre(ERT2)^{+}$ Modell flankierten zusätzlich loxP-Sequenzen das 3. Exon von $IKK\beta$, welches für die ATP bindende Stelle kodiert (Li et al., 2003). Durch die CD4Cre-Rekombinase wurde das Exon T zellspezifisch deletiert und $IKK\beta$ inaktiviert.

Durch das induzierbare CD4CreERT2⁺ Modell wurde ein Modell untersucht, das nur in einigen Zellen bei der erwachsenen, zu dem Zeitpunkt gesunden Maus nach Injektion von (OH-) Tamoxifen in T Zellen zu einer Aktivierung der CD4CreERT2-Rekombinase

und zur Expression von $C\Delta L$ bei Deletion von $IKK\beta$ führt.

5.1.1 (OH-) Tamoxifen-Dosisfindung

Zunächst wurde die Fragestellung dieser Arbeit anhand des $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Modells untersucht. Da zu Beginn der Experimente keine Versuche mit dem $CD4CreERT2/ loxP$ -System bekannt waren, wurden umfangreiche (OH-) Tamoxifen-Dosisfindungsstudien vorangestellt. Bevor Experimente mit der $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Maus erfolgten, wurde die zur Aktivierung der $CD4CreERT2$ -Rekombinase erforderliche (OH-) Tamoxifendosis zunächst anhand der $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Maus bestimmt.

Drei unterschiedliche Dosen (2mg/4mg Tamoxifen, 2mg OH-Tamoxifen) wurden gewählt. OH-Tamoxifen, ein Tamoxifenmetabolit, besitzt eine höhere Affinität zum Estrogenrezeptor als Tamoxifen (Feil et al., 2009). $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäusen wurde Tamoxifen/ bzw. OH-Tamoxifen intraperitoneal injiziert. Als Kontrollen dienten $CD4CreERT2+$ Mäuse, denen (OH-) Tamoxifen injiziert wurde, sowie $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse, welche die Lösungsmittelkontrolle erhielten. Abb. 8 zeigt den Anteil der eGFP+ Zellen an den Leukozyten im Blut der $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse nach Injektion von (OH-) Tamoxifen. In der Maus verhindert zunächst eine loxP- flankierte STOP-Kassette vor der $C\Delta L$ -DNA die Expression der konstitutiv aktiven CARMA1-Mutante und der unter dem gleichen Promoter stehenden eGFP-DNA. EGFP diente damit zur fluoreszenzbasierten Detektion von Zellen mit $CD4CreERT2$ -vermittelter Deletion der STOP-Kassette. Nach zwei Wochen waren eGFP+ Zellen im Blut sichtbar. An Tag 76 exprimierten in der 2mg OHT-Gruppe 8-16% der Leukozyten eGFP+, in der 2mg Tamoxifen-Gruppe 1%, 11% und 20% und in der 4mg Tamoxifen-Gruppe 3-7%. Der Anteil der eGFP+ Zellen an den T Zellen war an Tag 76 in der 2mg OHT-Gruppe 24%, 35% und 36%, in der 2mg Tamoxifen-Gruppe 2%, 41% und 51% und in der 4mg Tamoxifen-Gruppe 8%, 11% und 26% (keine Abbildung). Abgesehen von einer Ausnahme in der 2mg Tamoxifen-Gruppe, zeigte sich in allen Ansätzen somit eine effektive Rekombination. Aus Kostengründen wurde beschlossen, die Experimente der $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäusen mit 2mg Tamoxifen durchzuführen. In den Kontrollen zeigte bis auf eine Maus in der Lösungsmittelkontrolle keine Maus eine effektive Rekombination.

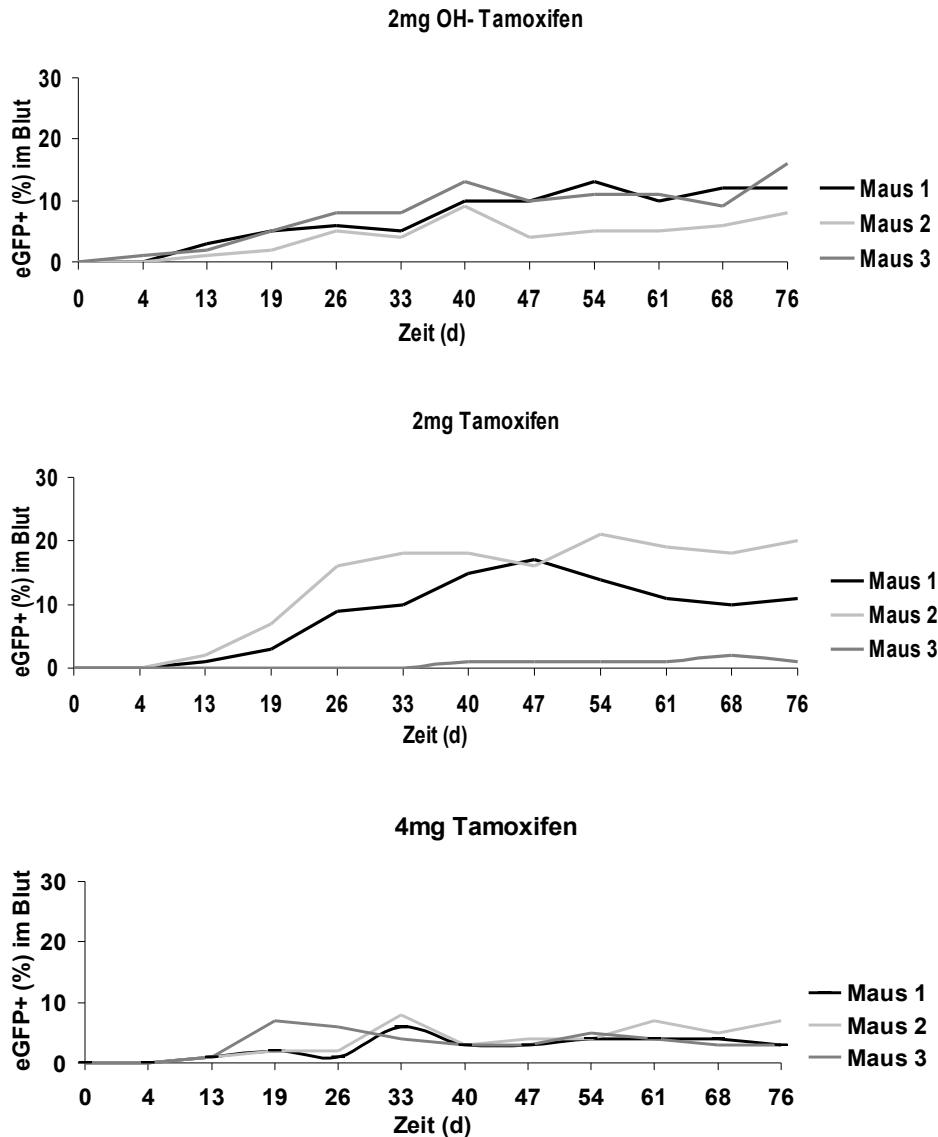


Abb. 8: Anteil der eGFP+ Zellen an den Leukozyten im Blut nach Injektion von (OH-) Tamoxifens. $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäusen wurde 2x 1mg OHT, 1x 2mg oder 2x 2mg Tamoxifen intraperitoneal injiziert und der zunehmende Anteil der eGFP+ Zellen an den Leukozyten im Blut im wöchentlichen Abstand durchflusszytometrisch bestimmt.

5.1.2 Kein Überlebensvorteil durch $IKK\beta^{ff}$ im $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Modell

$IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäusen wurde daraufhin 2mg Tamoxifen intraperitoneal injiziert. Abb. 9 stellt den Verlauf der eGFP+ Zellen im Blut über 44 Tage nach Injektion dar und zeigt die stattgefundenene Rekombination an.

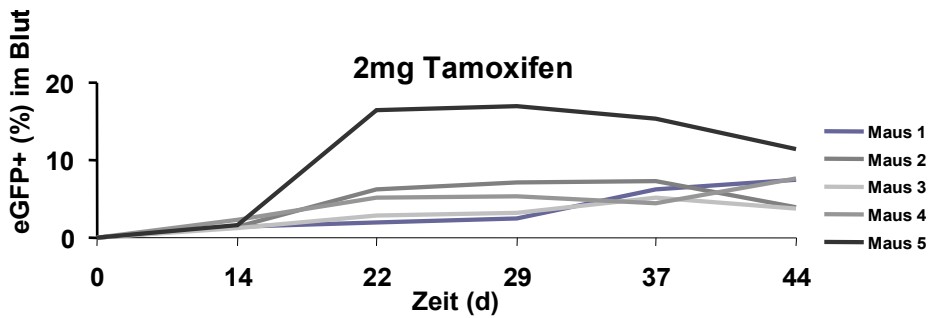


Abb. 9: Anteil der eGFP+ Zellen an den Leukozyten im Blut nach Injektion von 2mg Tamoxifen. $IKK\beta^{ff} C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Mäusen wurde 2mg Tamoxifen injiziert und die Anzahl der eGFP+ Zellen an den Leukozyten im Blut im wöchentlichen Abstand mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Versuchstiere wurden 440 Tage beobachtet. 440 Tage nach Tamoxifen-Injektion war keine der $IKK\beta^{ff} CD4CreERT2+$ Mäuse tot, 3 von 4 $IKK\beta^{ff} C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Mäuse und 3 von 5 $C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ waren tot (Abb. 10). Durch die, durch das CreERT2/ loxP-System ermöglichte, Deletion von $IKK\beta$ kam es somit zu keinem Überlebensvorteil im $IKK\beta^{ff} C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Modell gegenüber dem $C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Modell.

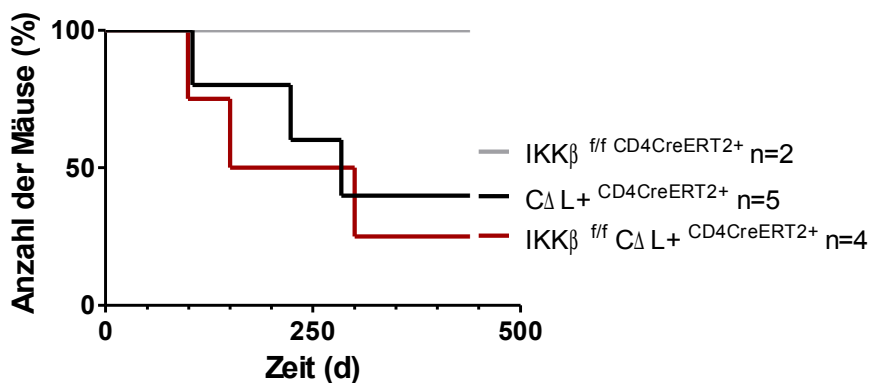


Abb. 10: Kein Überlebensvorteil der $IKK\beta^{ff} C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Mäuse gegenüber den $C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Mäusen. Kaplan-Meier-Kurve der Genotypen $IKK\beta^{ff} C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$, $C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ und $IKK\beta^{ff} CD4CreERT2+$. Bis Tag 440 nach Injektion von Tamoxifen starben 3 von 5 $C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ und 3 von 4 $IKK\beta^{ff} C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Mäuse. Bei den $IKK\beta^{ff} CD4CreERT2+$ Mäusen (n=2) starb bis Tag 440 kein Tier.

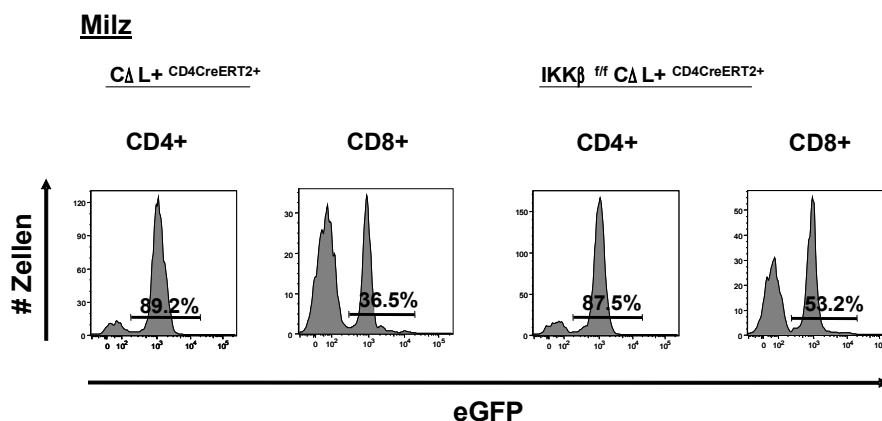
5.1.3 Erfolgreiche Rekombination von CΔL und T Zellaktivierung

Die Analyse der $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse erfolgte, wenn die Mäuse schwere Krankheitsanzeichen, wie große, nicht abheilende Wunden oder eine deutliche Reduktion des Allgemeinzustand zeigten und präfinal moribund erschienen. Die Versuche erfolgten damit im Alter von 100 bis 300 Tagen. Zum Vergleich wurden $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ und als Kontrollen bezeichnete Mäuse, die entweder $IKK\beta^{wt/wt} CD4CreERT2+$ oder $IKK\beta^{wt/wt} CD4CreERT2+$ waren, im gleichen Alter analysiert.

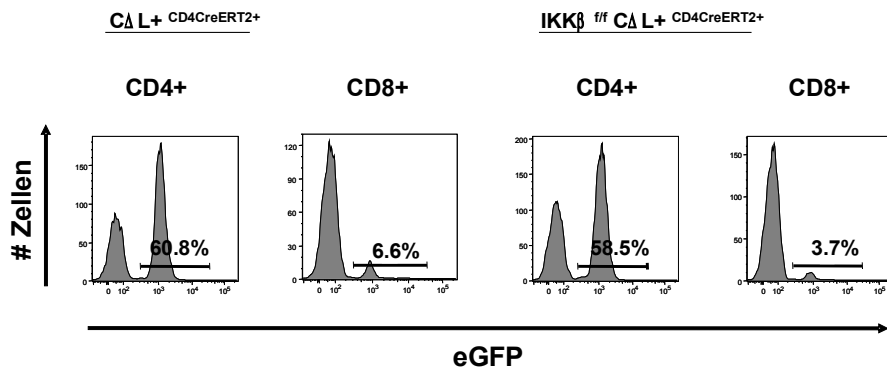
90% (60%) der $CD4^{+}$ Zellen in der Milz (Lymphknoten) der $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ und $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse zeigten eine Expression von eGFP und damit eine Expression von CΔL an. Unter den $CD8^{+}$ exprimierten in der Milz 37% (53%) und in den Lymphknoten 7% (4%) der $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ ($IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$) Mäuse eGFP (Abb. 11a). Andere Zelllinien zeigten keine Expression von eGFP. Die Zellzahl in Lymphknoten und Milz der $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse war gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse unterschieden sich jedoch nicht signifikant von $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäusen (Abb. 11b).

$CD4^{+}$ Zellen und $CD8^{+}$ Zellen aus der Milz der $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ und der $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse waren zudem aktiviert, sichtbar durch Aktivierung der Oberflächenmarker CD44 und CD62L (Abb. 12).

a)



Lymphknoten



b)

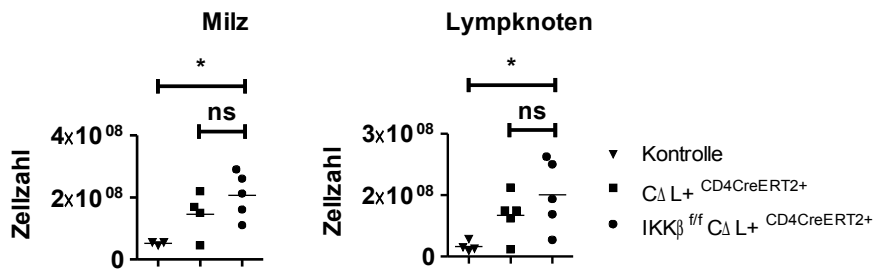
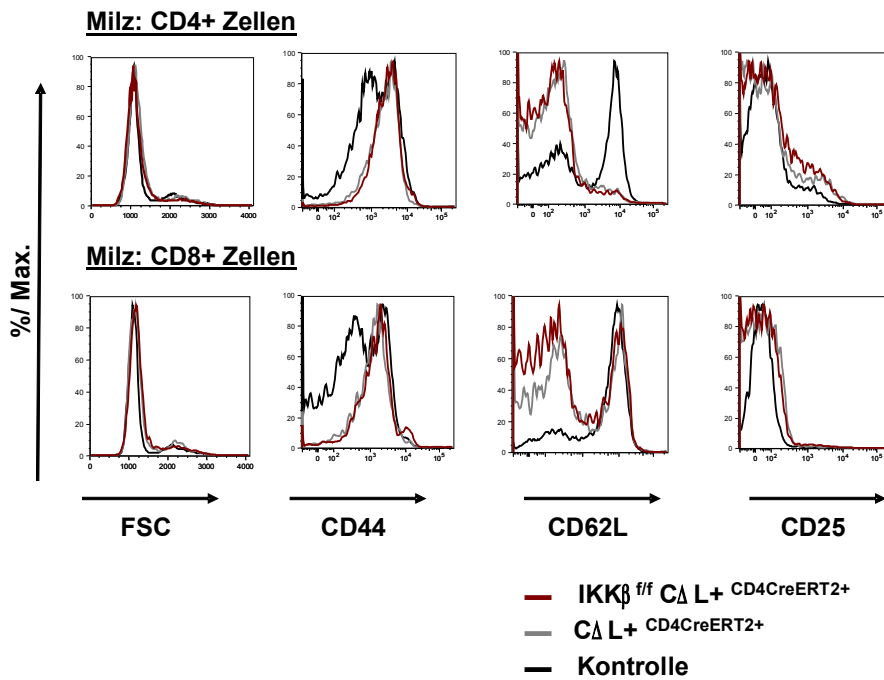


Abb. 11: Erfolgreiche Rekombination und Zellzahlerhöhung in $IKK\beta^{ff} C\Delta L^+ CD4CreERT2^+$ und $C\Delta L^+ CD4CreERT2^+$ Mäusen. a) Anteil der eGFP⁺ Zellen an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen aus Lymphknoten und Milz. b) Zellzahl in der Milz und in den Lymphknoten. Signifikante Erhöhung bei $(IKK\beta^{ff}) C\Delta L^+ CD4CreERT2^+$ Mäusen gegenüber den Kontrollen. Die Kontrollen bestanden aus $IKK\beta^{wt/wt} CD4CreERT2^+$ und $IKK\beta^{wt/ff} CD4CreERT2^+$ Mäusen. Jedes Symbol entspricht einer Maus. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's Two-Tailed T-Test berechnet. *, statistisch signifikant ($P < 0,05$), ns, statistisch nicht signifikant ($P \geq 0,05$). Horizontale Linien entsprechen dem Mittelwert.

a)



b)

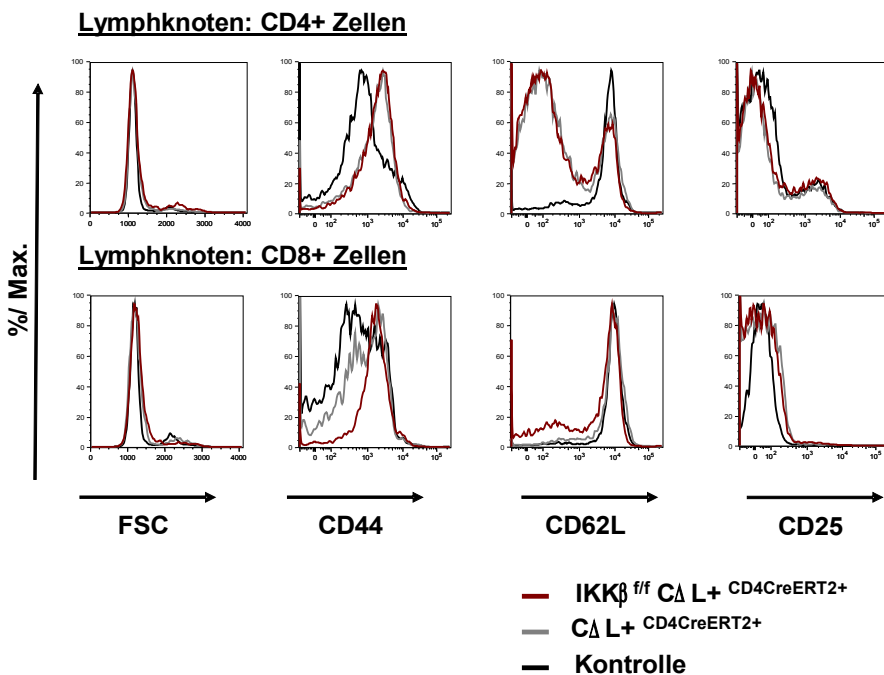


Abb. 12: T Zellaktivierung in Milz und Lymphknoten aus $IKK\beta^{f/f} C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ und $C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Mäusen. Forward Scattering (FSC) als Maß für die Zellgröße und Expression von CD44, CD62L und CD25 wurde mittels FACS-Analyse in den CD4+ und CD8+ Zellen der Milz (a) und Lymphknoten (b) untersucht. a) Es zeigt sich eine Aktivierung der Oberflächenmarker CD44 und CD62L bei T Zellen aus der Milz der ($IKK\beta^{f/f}$) $C\Delta L+^{CD4CreERT2+}$ Mäuse. b) Es zeigt sich eine Aktivierung der Oberflächenmarker CD44 und CD62L bei CD4+

Zellen und CD44 bei CD8+ Zellen aus Lymphknoten bei (IKK β^{ff}) C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäusen. Die als Kontrolle bezeichneten Mäuse bestanden aus IKK $\beta^{wt/wt}$ ^{CD4CreERT2+} und IKK $\beta^{wt/ff}$ ^{CD4CreERT2+} Mäusen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit insgesamt drei Mäusen je Genotyp.

5.1.4 Insuffiziente IKK β -Deletion im IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Modell

Zwar zeigten T Zellen aus den IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäusen eine eGFP-Expression und damit eine Expression von C Δ L an durch Aktivierung der CD4CreERT2-Rekombinase. Jedoch ist bei einer Aktivierung der CD4CreERT2-Rekombinase in eGFP+ Zellen nicht auch gleichzeitig von einer suffizienten Deletion/ Inaktivierung von IKK β^{ff} auszugehen. Um die IKK β -Deletion in den eGFP+ Zellen zu überprüfen, wurden eGFP+ Zellen aus Lymphknoten und Milz mit dem Cell Sorter MoFlo II isoliert. Abb. 13 zeigt die Ergebnisse des Western Blots. In eGFP+ Zellen der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäuse ist IKK β nicht deletiert. Die Bedeutung der insuffizienten IKK β Deletion wird im Kapitel Diskussion ausgeführt.

eGFP+ Zellen

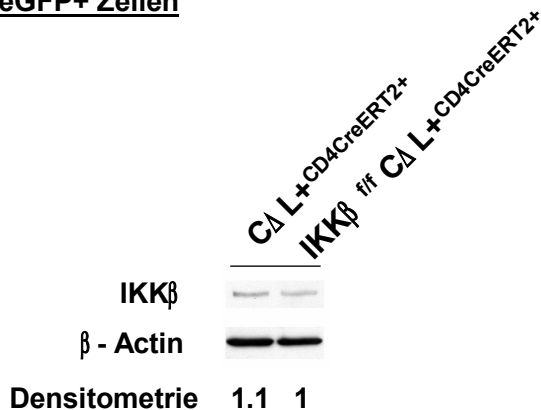


Abb. 13: Ineffiziente IKK β Deletion in eGFP+ Zellen aus Lymphknoten und Milz von IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäusen. eGFP+ Zellen aus Lymphknoten und Milz wurden mit dem Cell Sorter MoFlo II aufgereinigt. Die IKK β -Expression von eGFP+ Zellen aus C Δ L+^{CD4CreERT2+} und IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäusen wurde mittels Western Blot verglichen. Der Western Blot für β -Aktin zeigt die vergleichbare Proteinmenge an. Mittels Densitometrie wurden die Banden quantifiziert. Der Western Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit insgesamt drei Mäusen je Genotyp.

5.2 Mausmodell B (IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+})

Da die Analyse des IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Modells eine nicht effiziente Deletion von IKK β bei erfolgreicher Expression von C Δ L zeigte, erfolgten daraufhin Experimente mit IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen mit dem Hintergrund eine effektivere IKK β -Deletion zu erreichen. Die Aktivität der Cre-Rekombinase ist dabei von externen Stimuli, wie der Injektion von Tamoxifen, unabhängig. Als direkte Vergleichsgruppe der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse dienten hierbei IKK β^{ff} ^{CD4Cre+} Mäuse. Hiermit war eine konstante Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum von 465 Tagen sichergestellt. C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse mit einem medianen Überleben von 49 Tagen wurden aus diesem Grund nicht verwendet. Bezüglich des Phänotyps der C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse wird auf die Einleitung verwiesen. Ein Vergleich zu C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen erfolgt in der Diskussion.

5.2.1 Tod durch C Δ L-Expression im IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Modell

Durch die C Δ L-Expression im IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Modell starben die Mäuse früher (Abb. 14). Zwischen Tag 80-110 starben 23,5% (4 von 17) der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse. Zwei weitere Mäuse starben an Tag 400-500. Nach 465 Tagen waren insgesamt 35,3% (6 von 17) der Versuchstiere tot. In der Vergleichsgruppe starb bis Tag 465 keine Maus.

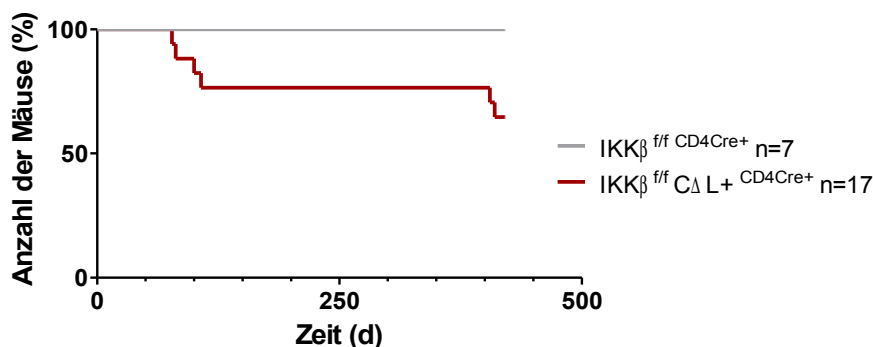


Abb. 14: Kaplan-Meier-Kurve der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse und IKK β^{ff} ^{CD4Cre+} Mäuse. Zwischen Tag 80-100 starben 23,5% (4 von 17) der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse, nach 465 Tagen waren insgesamt 35,3% (6 von 17) Tiere tot. Bei den IKK β^{ff} ^{CD4Cre+} Mäusen starb bis Tag 465 kein Tier.

5.2.2 Erfolgreiche Rekombination und Expression von C Δ L

Die Deletion der STOP-Kassette durch Aktivierung der CD4Cre-Rekombinase und die daraus folgende C Δ L-Expression konnte mittels eGFP-Expression durchflusszytometrisch überprüft werden (Abb. 15). In allen analysierten Mäusen waren eGFP+ Zellen in Milz und Lymphknoten vorhanden und die Rekombination war somit erfolgreich.

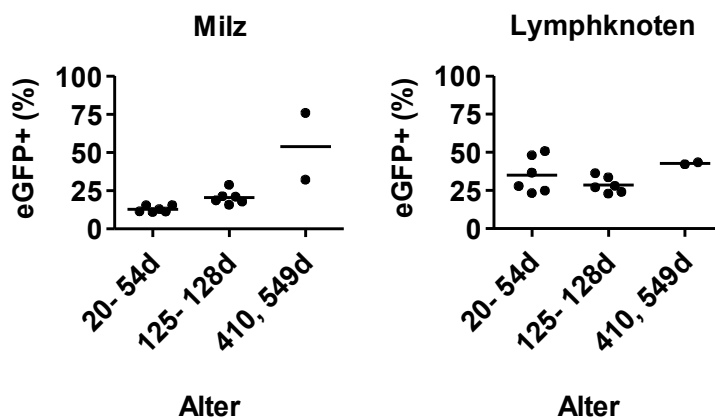


Abb. 15: Erfolgreiche Deletion der STOP-Kassette durch die CD4Cre-Rekombinase in IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen. eGFP+ Zellen in allen Versuchstieren in Milz und Lymphknoten. Der Anteil der eGFP+ Zellen an den lebenden Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bei 20-54 Tagen, 125-128 Tagen und 410/ 549 Tagen alten Mäusen bestimmt.

5.2.3 Analyse im Alter von 24-54 Tagen: T Zellaktivierung

Die Organe wurden daraufhin analysiert, insbesondere wurde das Milzgewicht verglichen, die einzelnen Zellpopulationen und die T Zellaktivierung durchflusszytometrisch untersucht. IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse wurden zunächst ohne äußere Anzeichen einer Erkrankung, im guten Allgemeinzustand, im Alter von 24-54 Tagen analysiert. Der Zeitraum wurde gewählt, da C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse mit einem medianen Überleben von 49 Tagen in diesem Zeitraum erkranken und sterben. Ein Vergleich zu C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen erfolgt in der Diskussion.

Abb. 16 zeigt die IKK β -Deletion in eGFP+ Zellen von IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen an mit

einer schmalen IKK β -Bande bei 33% der Versuchstiere im Western Blot und einer nicht nachweisbaren IKK β -Bande bei 66%.

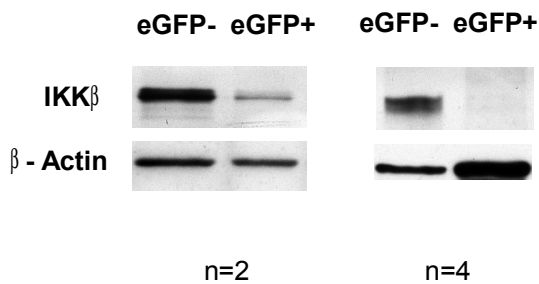
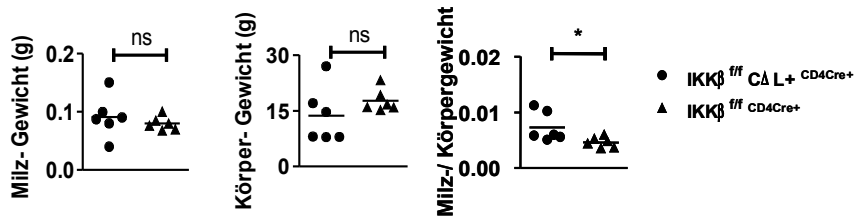


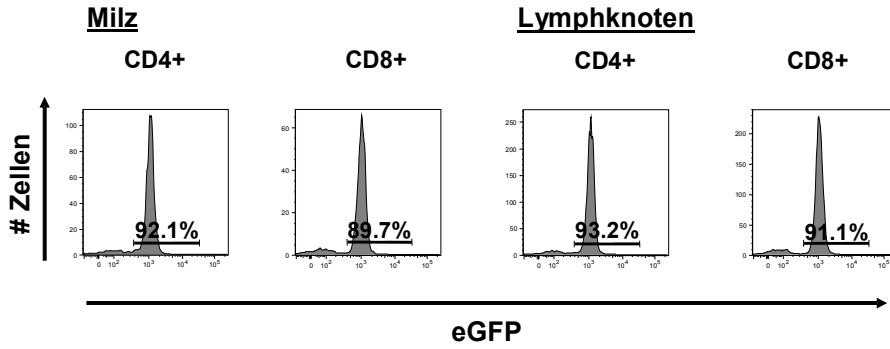
Abb. 16: Erfolgreiche IKK β -Deletion bei 24-54 Tage alten IKK β^{ff} C Δ L $^{CD4Cre+}$ Mäusen. eGFP+ Zellen aus dem Lymphknoten und der Milz wurden mittels Cell Sorter MoFlo II isoliert. Die IKK β - Expression von eGFP+ und eGFP-Zellen wurde verglichen. Der Western Blot für β -Aktin zeigt die vergleichbare Proteinmenge an. Die IKK β - Deletion in den eGFP+ Zellen wird sichtbar. Bei n=2 Mäusen ist eine schmale IKK β -Bande sichtbar, bei n=4 ist keine IKK β -Bande sichtbar.

Das Milz- und Körpergewicht der IKK β^{ff} C Δ L $^{CD4Cre+}$ Mäuse und der IKK β^{ff} CD4Cre+ Mäuse unterschied sich nicht signifikant. Das Milzgewicht in Bezug auf das Körpergewicht war jedoch bei den IKK β^{ff} C Δ L $^{CD4Cre+}$ Mäusen signifikant erhöht (Abb. 17a). In Milz und Lymphknoten der IKK β^{ff} C Δ L $^{CD4Cre+}$ Mäuse waren 90-93% der CD4+ und CD8+ Zellen eGFP+ und zeigten damit eine stattgefundene Rekombination an (Abb. 17b). Die absolute Zellzahl in Milz und Lymphknoten unterschied sich nicht signifikant und die Anzahl der Subpopulationen, d.h. der T, B und myeloiden Zellen, in der Milz und in den Lymphknoten war vergleichbar (Abb. 17c, d). Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen war zwar signifikant in der Niere und Leber erniedrigt, jedoch nicht in den übrigen Organen wie Milz, Lymphknoten, Knochenmark oder Lunge (Abb. 17e). Die T Zellen waren zudem aktiviert. CD4+ und CD8+ Zellen aus der Milz zeigten eine Aktivierung der Oberflächenmarker CD44 und CD62L an (Abb. 18).

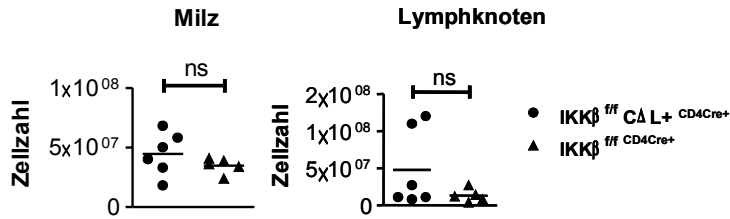
a)



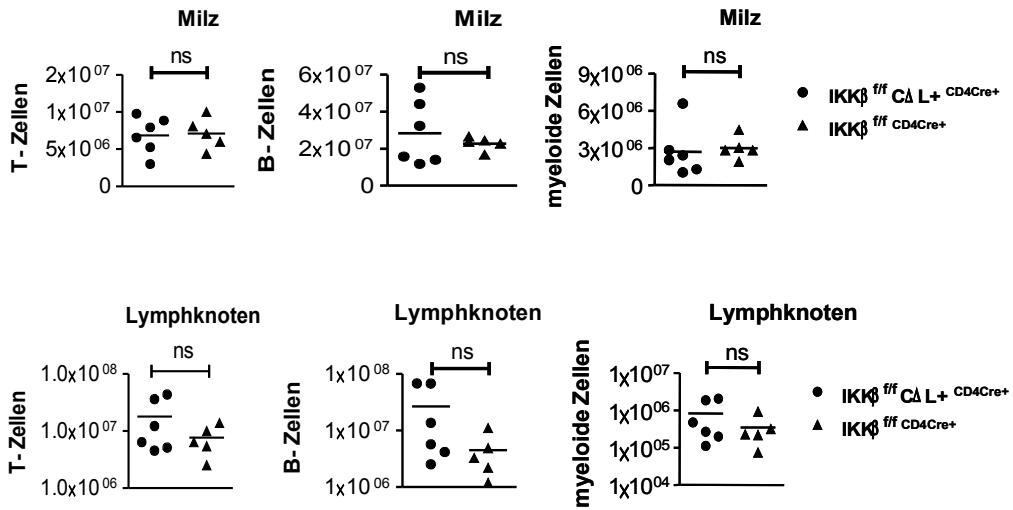
b)



c)



d)



e)

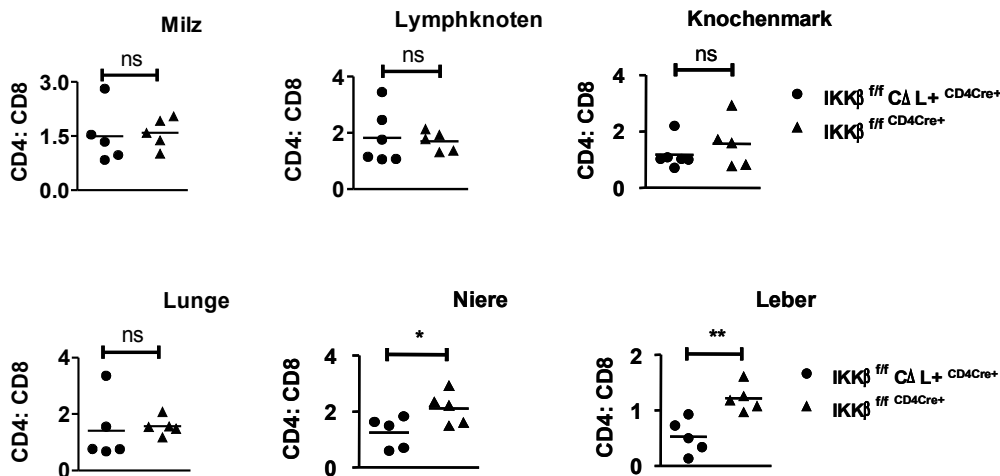
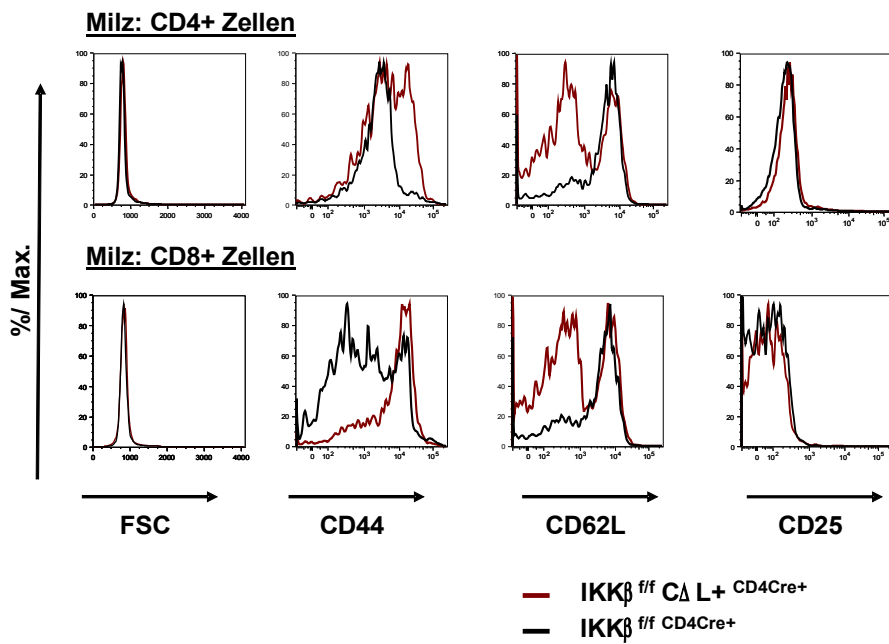


Abb. 17: Unterschiede bei der Analyse des Milzgewichts und der einzelnen Zellpopulationen bei 24-54 Tage alten $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4Cre+}$ im Vergleich zu $IKK\beta^{ff} CD4Cre+$ Mäusen. a) Milz- und Körpergewicht unterschieden sich bei $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4Cre+}$ und $IKK\beta^{ff} CD4Cre+$ Mäusen nicht signifikant. Das Verhältnis Milz-/ Körpergewicht war jedoch bei den $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4Cre+}$ signifikant größer. b) Anteil der eGFP+ Zellen in CD4+ und CD8+ Zellen aus Milz und Lymphknoten. c) Darstellung der Zellzahl in Milz und Lymphknoten. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. d) Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl der T Zellen, B Zellen und myeloiden Zellen in Milz und Lymphknoten bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. e) Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen in den Organen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. In der Niere und Leber war das Verhältnis bei den $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4Cre+}$ Mäusen signifikant erniedrigt gegenüber den $IKK\beta^{ff} CD4Cre+$ Mäusen. Jedes Symbol entspricht einem Versuchstier. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's Two-Tailed T-Test berechnet. *, statistisch signifikant ($P < 0,05$), **, statistisch signifikant ($P < 0,005$), ***, statistisch signifikant ($P < 0,0001$), ns, statistisch nicht signifikant ($P \geq 0,05$). Horizontale Linien entsprechen dem Mittelwert.

a)



b)

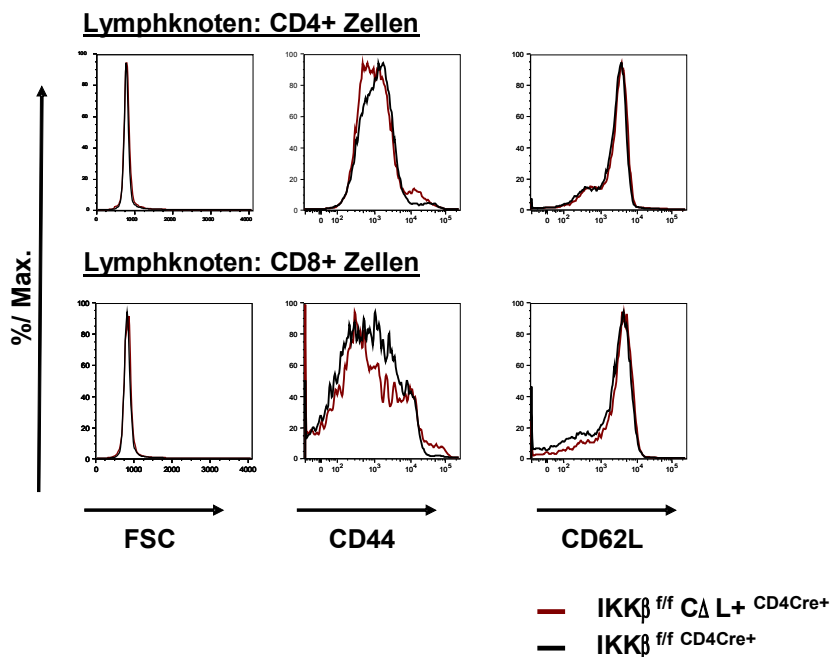


Abb. 18. T Zellaktivierung in der Milz bei 24-54 Tage alten $IKK\beta^{ff} C\Delta L+ CD4Cre+$ Mäusen. Forward Scattering (FSC) als Maß für die Zellgröße und Expression von CD44, CD62L und CD25 wurden mittels FACS-Analyse in den CD4+ und CD8+ Zellen der Milz (a) und Lymphknoten (b) untersucht. a) Es zeigt sich eine Aktivierung der Oberflächenmarker CD44 und CD62L an. b) T Zellen aus dem Lymphknoten sind nicht aktiviert. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

5.2.4 Analyse im Alter von 125-128 Tagen: Expansion von T, B und myeloiden Zellen, T Zellaktivierung

Im nächsten Schritt wurden etwas ältere, d.h. 125-128 Tage alte, gesunde Mäuse analysiert, um zu untersuchen, ob es zu Veränderungen des Phänotyps kommt. Zunächst wurde die IKK β -Deletion in eGFP+ Zellen aus IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen untersucht. Abb. 19 zeigt, dass in 33% eine deutliche IKK β - Bande vorhanden war und IKK β damit nicht in allen eGFP+ Zellen deletiert worden ist. Bei 66% war IKK β in den eGFP+ Zellen nicht mehr nachweisbar.

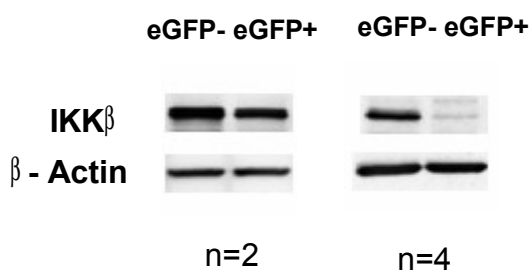
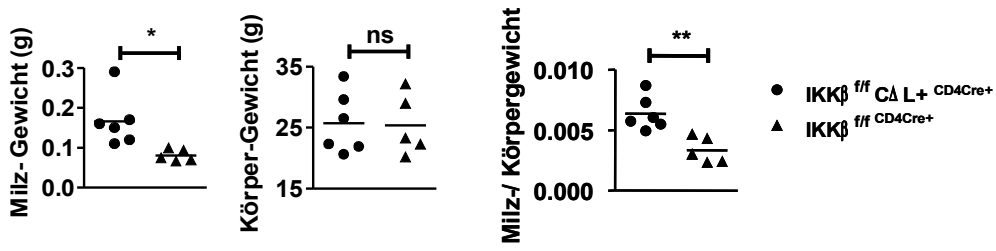


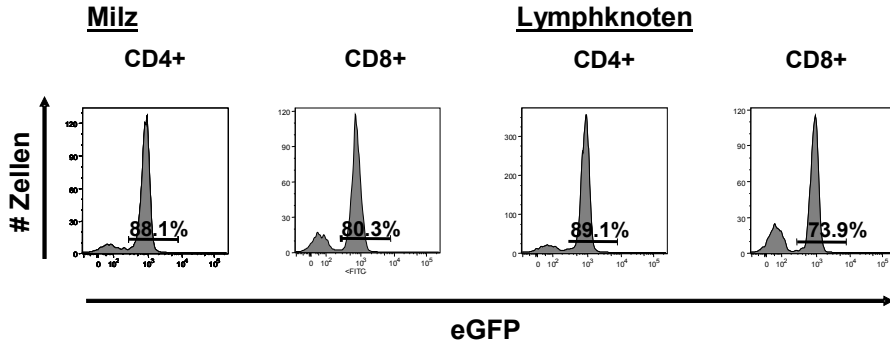
Abb. 19: Inkomplette IKK β - Deletion bei 125-128 Tage alten IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen. eGFP+ Zellen aus Lymphknoten und Milz wurden mit dem Cell Sorter MoFlo II aufgereinigt. Die IKK β - Expression von eGFP+ und eGFP-Zellen wurde verglichen. Der Western Blot für β -Aktin zeigt die vergleichbare Proteinmenge an. Bei n=2 Mäusen ist eine deutliche IKK β -Bande sichtbar, bei n=4 ist keine IKK β -Bande sichtbar.

Auch bei dieser Altersgruppe erfolgte nun eine Analyse der einzelnen Organe. Das Milzgewicht der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse war signifikant erhöht bei vergleichbarem Körpergewicht (Abb. 20a). In Milz und Lymphknoten zeigten 74-89% der CD4+ und CD8+ Zellen eine eGFP-Expression (Abb. 20b). Die Zellzahl in der Milz unterschied sich nicht. Die Zellzahl im Lymphknoten war jedoch signifikant erhöht (Abb. 20c). Es ließ sich zudem ein signifikanter Anstieg der T, B und myeloiden Zellen in den Lymphknoten feststellen (Abb. 20d). Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen war signifikant erniedrigt in der Milz, Knochenmark, Lunge, Niere und Leber, jedoch nicht in den Lymphknoten (Abb. 20e). Durchflusszytometrisch wurde eine Aktivierung der CD4+ und CD8+ Zellen in der Milz und in den Lymphknoten deutlich an den Oberflächenmarkern CD44 und CD62L (Abb. 21).

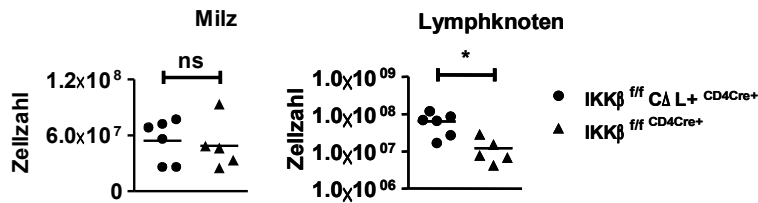
a)



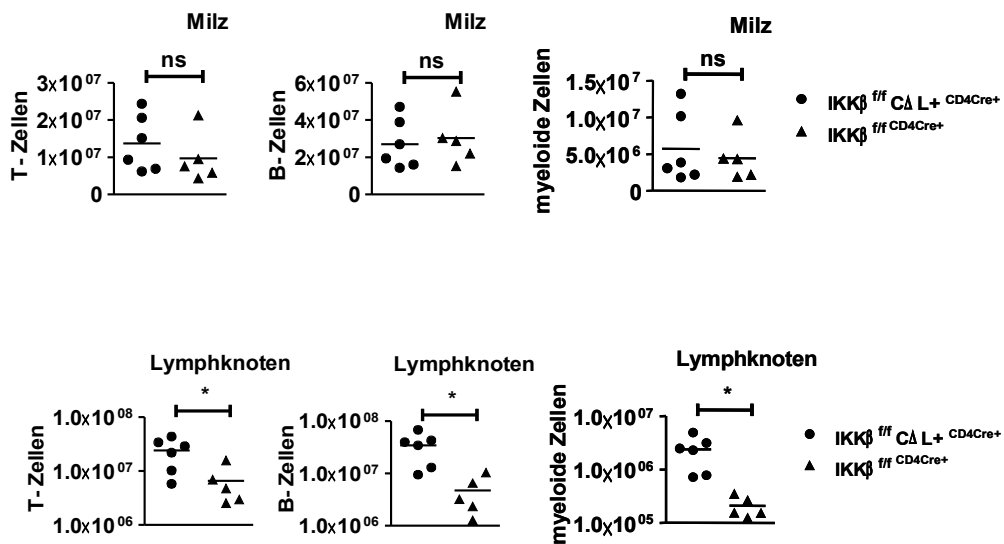
b)



c)



d)



e)

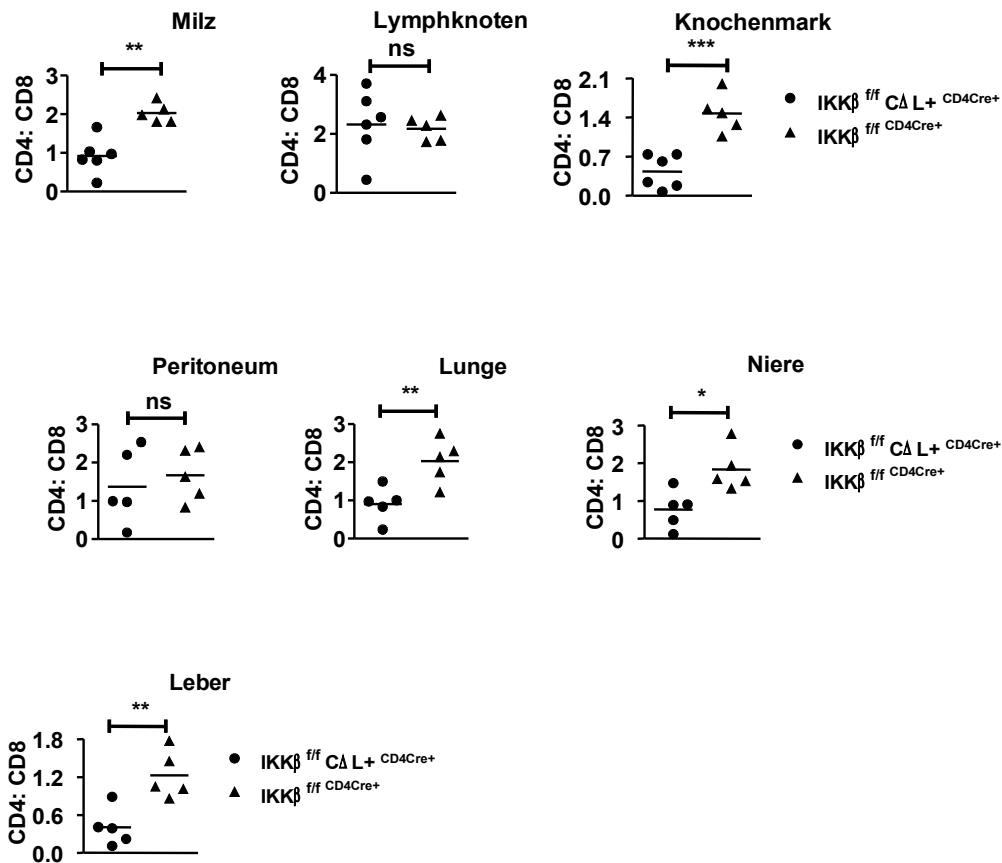


Abb. 20: Unterschiede bei der Analyse des Milzgewichts und der einzelnen Zellpopulationen bei 125-128 Tage alten $IKK\beta^{ff} C\Delta L+ CD4Cre+$ im Vergleich zu $IKK\beta^{ff} CD4Cre+$ Mäusen. a) Das Körpergewicht unterschied sich bei $IKK\beta^{ff} C\Delta L+ CD4Cre+$ und $IKK\beta^{ff} CD4Cre+$ Mäusen nicht signifikant. Das Milzgewicht und das Verhältnis Milz-/ Körpergewicht waren bei den $IKK\beta^{ff} C\Delta L+ CD4Cre+$ Mäusen signifikant größer. b) Anteil der eGFP+ Zellen in CD4+ und CD8+ Zellen aus Milz und Lymphknoten. c) Die Zellzahl in der Milz und dem Lymphknoten ist dargestellt. Ein signifikanter Anstieg der Zellzahl in den Lymphknoten wird deutlich. d) Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl der T Zellen, B Zellen und myeloiden Zellen in Milz und Lymphknoten bestimmt. Ein signifikanter Anstieg der Zellzahlen in den Lymphknoten wird deutlich. e) Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen in unterschiedlichen Organen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. In der Milz, Knochenmark, Lunge, Niere und Leber war das CD4: CD8-Verhältnis bei den $IKK\beta^{ff} C\Delta L+ CD4Cre+$ Mäusen signifikant erniedrigt. Jedes Symbol entspricht einer Maus. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's Two-Tailed T-Test berechnet. *, statistisch signifikant (P < 0,05), **, statistisch signifikant (P < 0,005), ***, statistisch signifikant (P < 0,0001), ns, statistisch nicht signifikant (P ≥ 0,05). Horizontale Linien entsprechen dem Mittelwert.

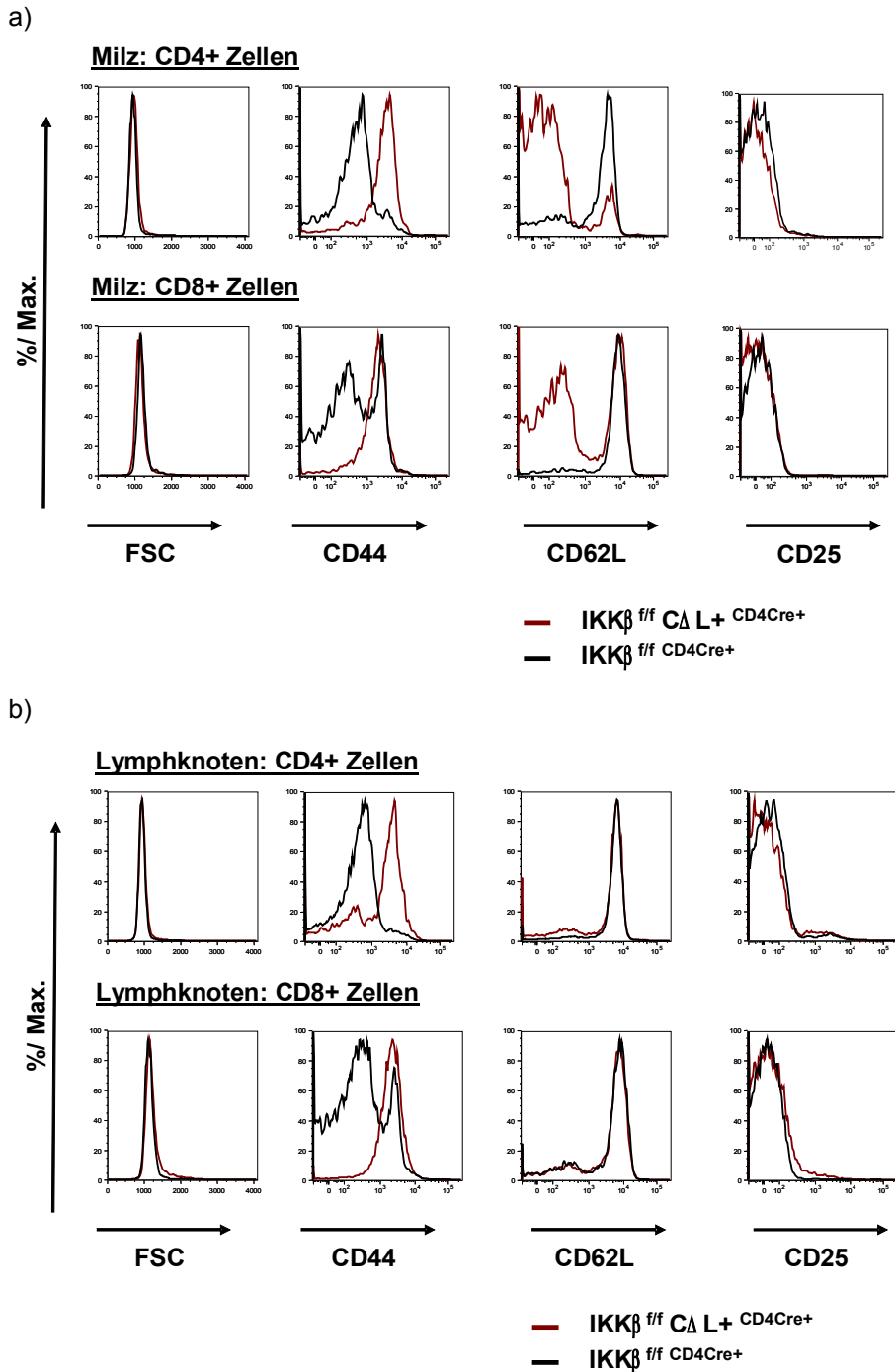
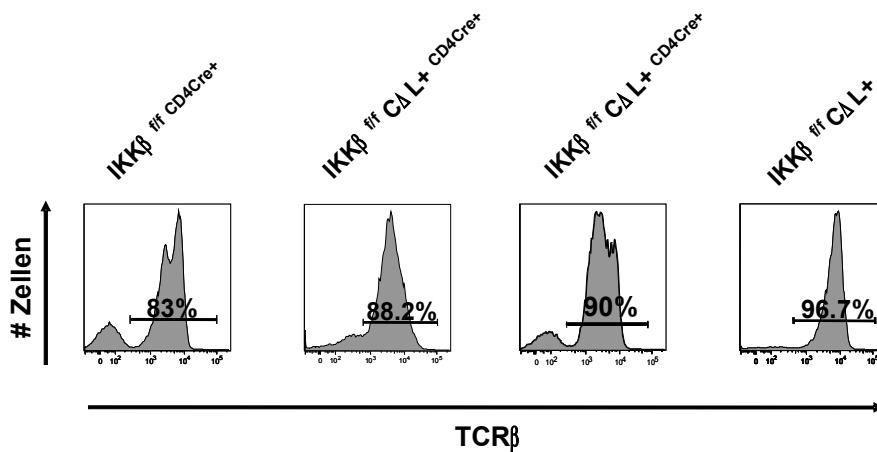


Abb. 21: Aktivierung der T Zellen in Milz und in Lymphknoten bei 125-128 Tage alten $IKK\beta^{fl/fl} C\Delta L+^{CD4Cre+}$ Mäusen. Forward Scattering (FSC) als Maß für die Zellgröße und Expression der Oberflächenmarker CD44, CD62L und CD25 wurde mittels FACS-Analyse in CD4+ und CD8+ Zellen der Milz (a) und Lymphknoten (b) untersucht. a) Es zeigt sich eine Aktivierung der Oberflächenmarker CD44 und CD62L. b) Es zeigt sich eine Aktivierung der Oberflächenmarker CD44. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit insgesamt sechs Mäusen je Genotyp.

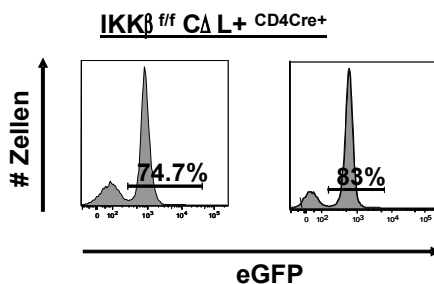
5.2.5 Ausblick: Analyse erkrankter Tiere

Die bisher dargestellten Ergebnisse stammen, dem äußeren Erscheinungsbild nach zu urteilen, von gesunden Tieren. Es stellt sich die Frage, wie sich der Phänotyp in erkrankten Tieren verändert. Die Versuchstiere wurden zweimal täglich auf Krankheitsanzeichen untersucht. Die gestorbenen Mäuse zwischen Tag 80-100 präfinal zu analysieren, war jedoch nicht möglich, da sie plötzlich starben ohne präfinal moribund zu erscheinen. Zwei ältere, präfinal moribunde Mäuse im Alter von 410 und 549 Tagen konnten jedoch analysiert werden. Zunächst wurde überprüft, ob die T Zellen IKK β exprimieren. Dafür wurden T Zellen mit Dynabeads aufgereinigt. Aus organisatorischen Gründen war eine kurzfristige Nutzung des Cell Sorter MoFlo II nicht möglich. Nach der Aufreinigung betrug der Anteil der T Zellen in den Proben der IKK β^{ff} CD4Cre+ Mäuse 83%, in den Proben der IKK β^{ff} C Δ L+ CD4Cre+ Mäuse 88,2% und 90% und in den Proben der IKK β^{ff} C Δ L+ Mäusen 96,7% (Abb. 22a). In den IKK β^{ff} C Δ L+ CD4Cre+ Proben waren damit 76% bzw. 83% der Zellen eGFP+ (Abb. 22b). In Abb. 22c wird deutlich, dass IKK β in den T Zellen der beiden IKK β^{ff} C Δ L+ CD4Cre+ Mäuse zu einem großen Teil nicht deletiert worden ist.

a)



b)



c)

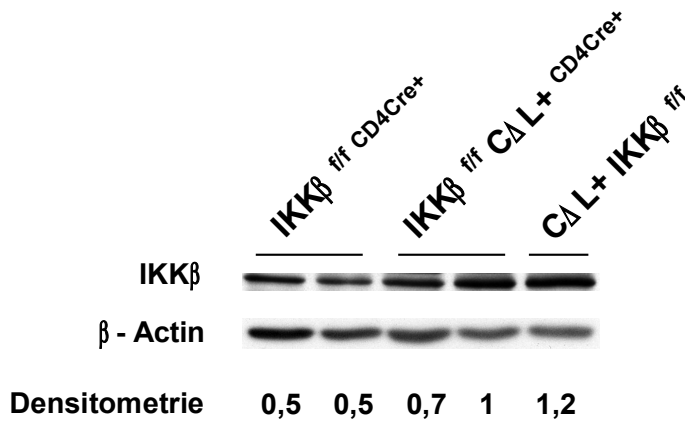
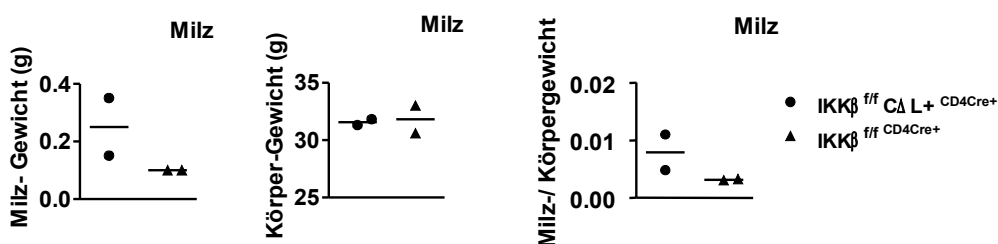


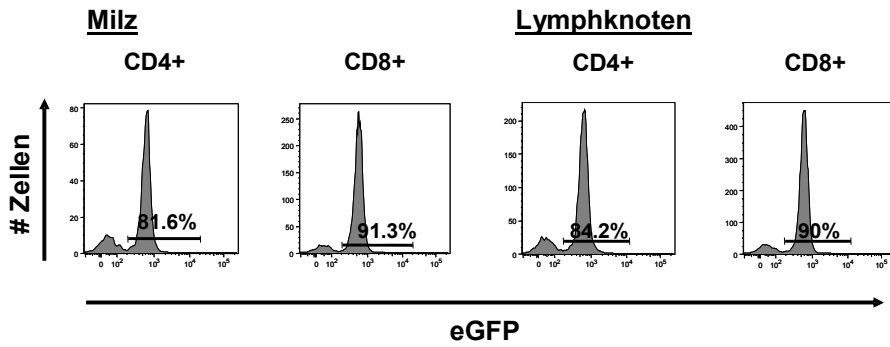
Abb. 22: Inkomplette IKKβ- Deletion in den erkrankten IKKβ^{f/f} CΔL⁺CD4Cre⁺ Mäusen (n=2). T Zellen aus Lymphknoten und Milz von IKKβ^{f/f} CD4Cre⁺, IKKβ^{f/f} CΔL⁺CD4Cre⁺ und IKKβ^{f/f} CΔL⁺ Mäusen wurden mittels Dynabeads aufgereinigt. a) Anteil der T Zellen in den Proben nach der Aufreinigung. b) Anteil der eGFP⁺ Zellen in den IKKβ^{f/f} CΔL⁺CD4Cre⁺ Proben nach Aufreinigung. c) Anschließend wurde IKKβ mit einem Western Blot nachgewiesen. Der Western Blot für β-Aktin zeigt die vergleichbare Proteinmenge an.

Im Phänotyp der analysierten Mäuse zeigten sich kongruente Ergebnisse zu der Analyse der zuvor analysierten Tiere. Die Milz war vergrößert bei gleichem Körpergewicht (Abb. 23a). In Milz und Lymphknoten zeigten 82-91% der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen eine erfolgreiche Rekombination und Expression von CΔL an (Abb. 23b). Bei dem Vergleich der absoluten Zellzahl in Milz und Lymphknoten konnte keine Tendenz festgestellt werden (Abb. 23c). Die Anzahl der T Zellen und myeloiden Zellen war in der Milz erhöht und das Verhältnis CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen war in Milz und Lymphknoten erniedrigt (Abb. 23 d,e). Die T Zellen waren zudem aktiviert. Durchflusszytometrisch wurde eine Aktivierung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in der Milz und in den Lymphknoten deutlich an den Oberflächenmarkern CD44 und CD62L (Abb. 24).

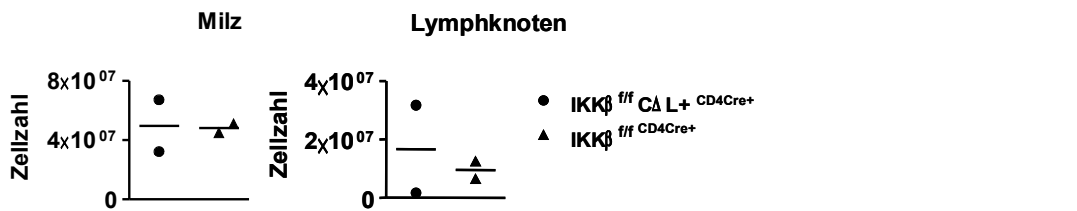
a)



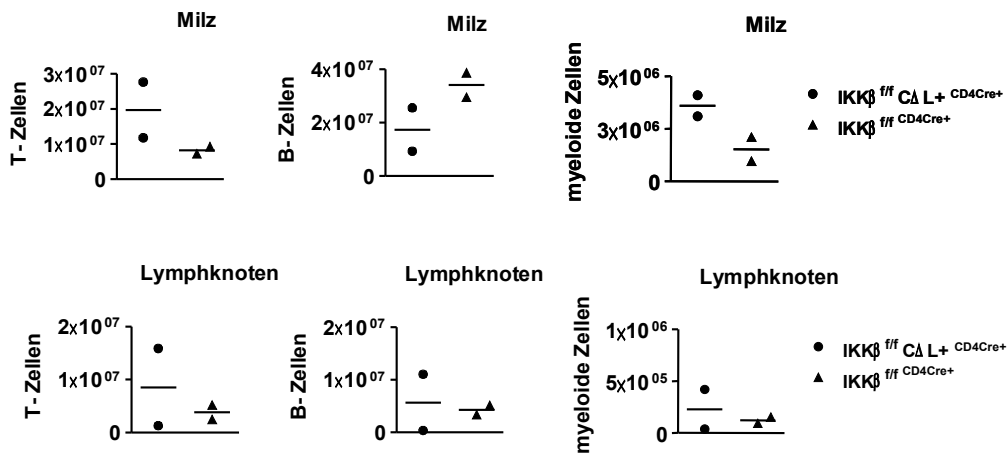
b)



c)



d)



e)

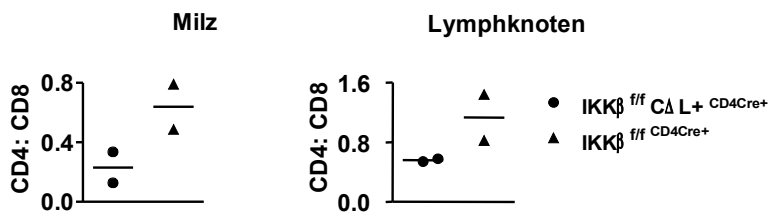
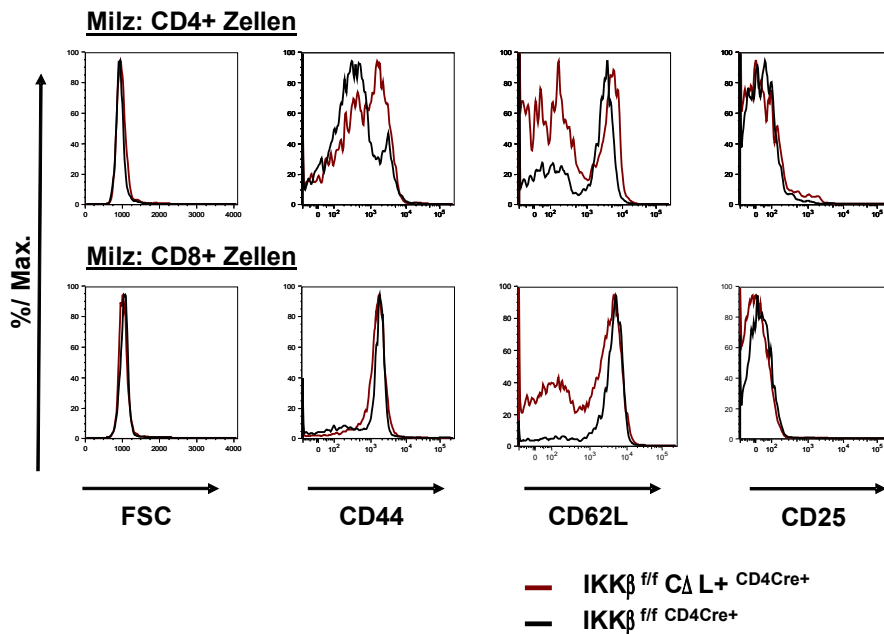


Abb. 23: Unterschiede des Milzgewichts und der einzelnen Zellpopulationen bei erkrankten $IKK\beta^{ff} C\Delta L+ CD4Cre+$ (n=2) im Vergleich zu $IKK\beta^{ff} CD4Cre+$ Mäusen. a) Das Körpergewicht unterschied sich bei $IKK\beta^{ff} C\Delta L+ CD4Cre+$ und $IKK\beta^{ff} CD4Cre+$ Mäusen nicht. Das

Milzgewicht und das Verhältnis Milz-/ Körpergewicht waren bei den $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4Cre+}$ erhöht. b) Anteil der eGFP+ Zellen in CD4+ und CD8+ Zellen aus Milz und Lymphknoten. c) Die Zellzahl in der Milz und dem Lymphknoten ist dargestellt. d) Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl der T Zellen, B Zellen und myeloiden Zellen in Milz und Lymphknoten bestimmt. e) Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen in Milz und Lymphknoten wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Das CD4: CD8-Verhältnis war bei den $IKK\beta^{ff} C\Delta L^{+CD4Cre+}$ Mäusen erniedrigt. Jedes Symbol entspricht einer Maus. Horizontale Linien entsprechen dem Mittelwert.

a)



b)

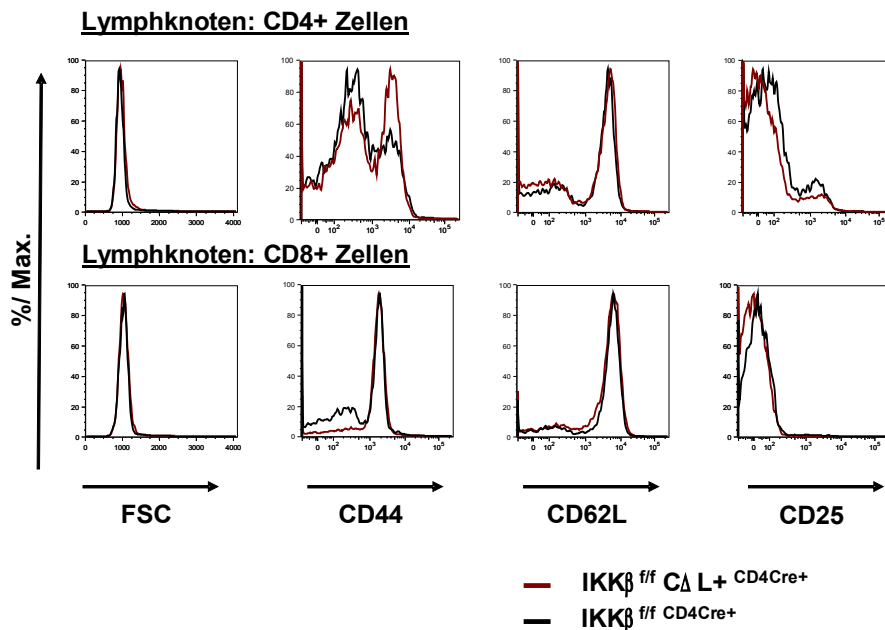


Abb. 24: Aktivierung von T Zellen in Milz und Lymphknoten. Forward Scattering (FSC) als

Maß für die Zellgröße und Expression von CD44, CD62L und CD25 wurden mittels FACS-Analyse in CD4+ und CD8+ Zellen der Milz (a) und Lymphknoten (b) untersucht. a) Es zeigt sich eine Aktivierung der Oberflächenmarker CD44 und CD62L in CD4+ Zellen und CD62L in CD8+ Zellen. b) Es zeigt sich eine Aktivierung der Oberflächenmarker CD44 in CD4+ Zellen. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente mit insgesamt 2 Mäusen je Genotyp.

6. Diskussion

In lymphoproliferativen Erkrankungen des adaptiven Immunsystems wie im primär gastrointestinalen B Zell Lymphom, im primären ZNS-Lymphom oder im diffus großzelligen B Zell Lymphom, spielt der CBM-Komplexes durch gesteigerte Expression oder konstitutive Aktivierung von CARMA1 eine wichtige Rolle (Dong et al., 2011; Lenz und Davis et al., 2008; Montesinos-Rongen et al., 2010; Nakamura et al., 2005; Oshiro et al., 2006).

Zentraler Punkt dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, inwieweit CARMA1 allein über Aktivierung von IKK β zu T Zellaktivierung, Zellexpansion und Lebensdauer der Mäuse mit einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 beiträgt.

6.1 C Δ L^{+CD4CreERT2+} Modell: Möglichkeit einer selektiven Induktion einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 in T Zellen

Bislang wurde kein Mausmodell mit konstitutiver Aktivierung von CARMA1 bei gleichzeitiger Deletion von IKK β in Lymphozyten veröffentlicht. Das Modell wurde zunächst auf einem T zellspezifischen Hintergrund mit Hilfe der CD4CreERT2/ loxP-Systems untersucht.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Gene T zellspezifisch zu modifizieren, wie z. B. mit dem Cre/ loxP-System. Der Hintergrund ist dabei, Auswirkungen bestimmter, veränderter Gene in T Zellen gezielt untersuchen zu können. Es wird mit T zellspezifischer Expression der Cre-Rekombinase, sowie Cre-exprimierenden Lenti- oder Adenoviren gearbeitet (Lee et al., 2001; Pfeifer et al., 2001; Prost et al., 2001). In dieser Arbeit exprimierten T Zellen mit CD4-Promoteraktivität die CD4CreERT2-Rekombinase. Der modifizierte Estrogenrezeptor der CD4CreERT2-Rekombinase wird durch Tamoxifen oder OH-Tamoxifen aktiviert und die CD4CreERT2-Rekombinase daraufhin aus dem Zytoplasma in den Kern transloziert (Aghajani et al., 2012). Dort erkennt die CD4CreERT2-Rekombinase die loxP-flankierte DNA und deletiert diese. Durch endogenes Estrogen wird die CD4CreERT2-Rekombinase nicht aktiviert (Schwenk et al., 1998). Die CD4CreERT2-Rekombinase führt im IKK β^{ff} C Δ L^{+CD4CreERT2+} Modell über Deletion der STOP-Kassette zur Expression von C Δ L, der konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1, und des unter dem gleichen Promoter stehenden eGFP-Proteins. Aktivierung der CD4CreERT2-Rekombinase führte zudem zur Deletion

des loxP-flankierten 3. Exons von IKK β und zur Inaktivierung von IKK β .

Vorteil des CD4CreERT2-Systems ist es, die Rekombination und damit die Genexpression zeitlich kontrollieren zu können. Denn durch Veränderung der Genexpression mittels einer konstitutiven Cre-Rekombinase kann Zellontogenese und Zellrepertoire verändert werden. So wurden z.B. bei Modifikation der Genexpression durch die CD19Cre-Rekombinase Veränderungen der B Zell-Ontogenese und damit des B Zellrepertoires festgestellt (Hobeika et al., 2006; Rickert et al., 1997). Eine Übertragung auf CD4Cre-Rekombinasen mit Veränderungen der T Zellreifung und des T Zellrepertoires ist möglich. Der Vorteil der induzierbaren CD4CreERT2-Rekombinase ist es, nach Abschluss der Zellontogenese die Genexpression in Zellen verändern zu können.

Zu Beginn der Experimente waren keine Veröffentlichungen mit CD4CreERT2+ Mäusen bekannt. Deshalb wurden umfangreiche Dosisfindungsstudien vorangestellt. Es wurde in dieser Arbeit ein CD4CreERT2+ Mausmodell langfristig, d.h. Wochen bis Monate nach Behandlung mit Tamoxifen und OH-Tamoxifen, beobachtet und untersucht. In einem Beobachtungszeitraum von mehreren Wochen nach Injektion konnte ein Anstieg der eGFP+ Zellen, der Zellen mit stattgefundener Rekombination und Expression von C Δ L, im Blut sowohl bei den C Δ L^{CD4CreERT2+} als auch bei den IKK β ^{ff} C Δ L^{CD4CreERT2+} Mäusen in allen verwendeten Dosen (2mg OHT, 2mg und 4mg Tamoxifen) festgestellt werden. Es zeigte sich damit, dass das Modell zur erfolgreichen Aktivierung der induzierbaren CD4CreERT2-Rekombinase führt. Dosisabhängig zeigte sich ein Unterschied in der Anzahl der eGFP+ Zellen im Blut mit schlechteren Werten der 4mg Tamoxifen-Gruppe und vergleichbaren Ergebnissen für die 2mg OHT- und 2mg Tamoxifen-Gruppe.

Die CreERT2-Rekombinase kann toxisch auf Zellen wirken (Schmidt-Supprian und Rajewsky 2007). Möglich für die geringere Anzahl der eGFP+ Zellen in der 4mg Tamoxifen Gruppe gegenüber der 2mg Gruppe könnte diese toxische Wirkung der aktivierten CD4CreERT2-Rekombinase auf die Zellen sein. Beachtenswert ist auch, dass die Injektion von OH-Tamoxifen, einem Tamoxifen-Metaboliten mit höherer Affinität zum Estrogenrezeptor als Tamoxifen, nicht zu einer deutlichen Steigerung der CreERT2- Aktivität geführt hat.

Anders als in der Publikation von Aghajani et al., 2012 zeigte sich die Expression der

CD4CreERT2-Rekombinase nicht CD4+ zellspezifisch (Aghajani et al., 2012). 98% der Zellen mit stattgefundenener Rekombination waren bei Aghajani et al., CD4+. Neben CD4+ Zellen zeigten in dem hier untersuchtem Mausmodell auch CD8+ Zellen eine stattgefundenene Rekombination, nicht jedoch andere Zelllinien. Das kann darauf beruhen, dass Aghajani et al., einen Tag nach Ende der Tamoxifenbehandlung die peripheren Organe Milz und Lymphknoten untersuchten. Die Expression der CD4CreERT2-Rekombinase erfolgt jedoch auch in T Zellen im Stadium der doppelt positiven, d.h. CD4 und CD8 positiven, Zellen, das jede CD4+ und CD8+ Zelle im Thymus durchläuft. Da in der vorliegenden Arbeit die Mäuse nach frühestens 100 Tagen analysiert wurden, konnten auch, im Unterschied zu Aghajani et al., in den peripheren Organen CD8+ Zellen mit stattgefundenener Rekombination nach Verlassen des Thymus gefunden werden.

Die Zellzahl in Lymphknoten und in der Milz der $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse und der $IKK\beta^{ff}$ $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse war erhöht und die T Zellen waren aktiviert. $IKK\beta^{ff}$ $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse unterschieden sich jedoch nicht von $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäusen. Verantwortlich an dem fehlenden Überlebensvorteil und dem ähnlichen Phänotyp der $IKK\beta^{ff}$ $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ und $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäuse ist am ehesten die fehlende $IKK\beta$ -Deletion in den $C\Delta L$ exprimierenden Zellen der analysierten Mäuse. Wahrscheinlich ist es, dass im CD4CreERT2-Modell nach Injektion von 2mg Tamoxifen und stattgefundenener Rekombination einige Zellen $C\Delta L$ exprimieren bei Deletion von $IKK\beta$, in anderen Zellen die Deletion von $IKK\beta$ jedoch nicht suffizient ist und diese Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber den $IKK\beta$ -defizienten Zellen besitzen. Diese Zellen verdrängen daraufhin die Zellen mit stattgefundenener $IKK\beta$ -Deletion in den Monaten, die zwischen Injektion und Tod lagen, verdrängen.

Aghajani et al., 2012 verabreichten CD4CreERT2+/ R26R-EYFP Mäusen eine höhere Dosis Tamoxifen und zwar 5mg/d intragastral über 3-5 Tage und analysierten die Mäuse einen Tag nach Ende der Tamoxifengabe. Die umfangreiche Analyse des $IKK\beta^{ff}$ $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mausmodell dieser Arbeit wurde mit einer niedrigen Dosis von 2mg Tamoxifen intraperitoneal durchgeführt. Inwieweit eine höhere Dosis Tamoxifen, orale Gabe oder OH-Tamoxifen bei den $IKK\beta^{ff}$ $C\Delta L^{+CD4CreERT2+}$ Mäusen neben der Expression von $C\Delta L$ auch zu einer effektiven $IKK\beta$ -Deletion führen kann, bleibt offen, ist aber in Anbetracht der teilweise ebenfalls insuffizienten $IKK\beta$ -Deletion im $IKK\beta^{ff}$ $C\Delta L^{+CD4Cre+}$ Mäuse (s.u.) fraglich.

Zusammenfassend ist in dieser Arbeit erstmals die erfolgreiche Methode einer selektiven Induktion einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 in T Zellen mit Hilfe des CD4CreERT2/ loxP -Systems beschrieben worden. Die Deletion von IKK β im IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Modell war zwar insuffizient, das C Δ L+^{CD4CreERT2+} Modell zeigte jedoch Anzeichen einer hämatoproliferativen Erkrankung wie Zellexpansion und -aktivierung.

6.2 IKK β bedeutend für Erkrankung und Tod eines konstitutiv aktiven CARMA1-Modells

Da die Deletion von IKK β im IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Modell insuffizient war, erfolgten die weiteren Experimente mit IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre} Mäusen. Die CD4Cre-Rekombinase ist dabei nicht abhängig von Tamoxifeninjektion oder anderen externen Stimuli. Die Expression erfolgt konstitutiv nach Aktivierung des CD4-Promoters.

Mit Hilfe des murinen IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Modells wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass IKK β bedeutend für Erkrankung und Tod der Mäuse mit T zellspezifischen Expression eines konstitutiv aktiven CARMA1 Konstrukts ist. Zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist dabei die Kaplan-Meier-Kurve der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse. Von den IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen starben bis zum Ende der Beobachtungen an Tag 465 35%, während keine der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse bis Tag 465 starb. Bei einem mittleren Überleben von C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen mit 49 Tagen (Pechloff 2010, persönliche Mitteilung) ist durch die T zellspezifische Deletion von IKK β in den C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen ein deutlicher Überlebensvorteil erreicht worden. Die Aktivierung von NF- κ B via IKK β scheint somit der entscheidende Pathomechanismus einer konstitutiv aktiven CARMA1 Mutante zu sein. Therapeutische Konsequenzen, die sich daraus ergeben, werden im Kapitel 6.4 diskutiert.

In vivo wurde bisher noch kein Modell mit konstitutiver Aktivierung von CARMA1 in Anlehnung an die Pathogenese des ABC DLBCL und gleichzeitiger Blockade des NF- κ B-Signalweges distal des CBM-Komplexes publiziert. Jedoch hat man eine toxische Wirkung von IKK β -Inhibitoren auf ABC DLBCL Zellen, der Untergruppe des DLBCL mit konstitutiver Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, in vitro festgestellt (Lam et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde eine konstitutiv aktive Mutante von CARMA1 durch Deletion der Linker-Region verwendet. Ein nächster Schritt wäre es, als konstitutiv aktive Form von CARMA1 die onkogenen Mutationen in der Coiled-Coil-Region zu verwenden, um dem Pathomechanismus des DLBCL näherzukommen und das Modell auf B Zellen zu übertragen.

6.3 Veränderter Phänotyp und Tod trotz IKK β^{ff} im murinen C Δ L+ Modell

Durch das Einfügen loxP-flankierter Sequenzen im 3. Exon von IKK β in C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen und damit durch eine, nach Rekombination, mögliche Deletion des 3. Exons/ Inaktivierung von IKK β ist ein deutliches Benefit im Überleben erreicht worden ist. Es kommt jedoch zu Veränderungen im Phänotyp der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse, 35% starben bis Tag 465 und es gibt keinen Überlebensvorteil im induzierbaren CD4CreERT2-Modell, d.h. es gibt keinen Überlebensvorteil der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäusen gegenüber den C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäusen.

24-54 Tage alte IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse zeigten ein erhöhtes Milzgewicht, einen signifikanten prozentualen Anstieg von CD8+ Zellen in Leber und Niere und eine T Zellaktivierung. Ältere, 125-128 Tage alte, IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse zeigten zudem einen prozentualen Anstieg von CD8+ Zellen in mehreren Organen und einen Anstieg der T, B und myeloiden Zellen in den Lymphknoten. Die präfinal analysierten Mäuse (410 und 549 Tage alt) hatten eine vergrößerte Milz, zeigten einen Anstieg der T Zellen und myeloiden Zellen in der Milz und einen prozentualer Anstieg von CD8+ Zellen. Für die Veränderungen der 24-54 Tage, 125-128 Tage alten und präfinal analysierten Mäuse kann es mehrere Erklärungen geben. Zu bedenken ist, dass ähnliche Veränderungen des Phänotyps wie eine vergrößerte Milz, einen prozentualer Anstieg der T Zellen in der Milz, prozentualer Anstieg von CD8+ Zellen in der Milz und T Zellaktivierung auch in C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen auftreten (Pechloff 2010, persönliche Mitteilung).

Die Aktivierung der CD4Cre-Rekombinase, nachweisbar durch eGFP+ Zellen, erfolgte in allen IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen. Nicht in allen analysierten Mäusen ist jedoch eine komplette IKK β -Deletion in den eGFP+ Zellen erfolgt. Bei 33% der 24-54 Tage alten Mäusen war eine leichte und bei den 125-128 Tage alten Mäusen eine deutliche IKK β -Bande im Western Blot sichtbar. Die CD4Cre-Rekombinase war zwar in diesen Zellen

aktiv, führte aber nicht zu einer kompletten Deletion von IKK β . Zudem war IKK β bei den präfinal analysierten IKK β^{ff} C Δ L^{CD4Cre+} Mäusen in T Zellen nachweisbar. So kann für den Tod und den Phänotyp der IKK β^{ff} C Δ L^{CD4Cre+} Mäuse, welcher dem C Δ L^{CD4Cre+} Phänotyp ähnelt, T Zellen mit vorhandenem IKK β bei gleichzeitiger Expression von C Δ L verantwortlich sein, welche einen Selektionsvorteil gegenüber den IKK β -defizienten Zellen besaßen und diese schließlich langsam verdrängten. Zu erklären wären dadurch auch die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es mit zunehmendem Alter der Mäuse zu einem ausgeprägterem Phänotyp mit Zellexpansion und T Zellaktivierung kommt. Aber auch in den Mäusen, die im Western Blot aus Lymphknoten und Milz eine komplette Deletion zeigten, ist bei diesem Modell nicht ganz auszuschließen, dass es nicht in anderen Organen ein lokales Tumorwachstum aus C Δ L⁺ T Zellen ohne IKK β Deletion gegeben hat, das für die Veränderungen im Phänotyp mitverantwortlich gewesen ist.

Die CD4Cre-Rekombinase deletiert zwar effektiv loxP-flankierte DNA in T Zellen vom Stadium der doppelt positiven Zelle im Thymus an, dabei muss die Deletion der CD4Cre-Rekombinase jedoch nicht in allen Zellen erfolgen und nicht auf beiden Allelen erfolgen, besonders wenn die Rekombination einen Selektionsnachteil für die Zellen darstellt (Lee et al. 2001; Pasparakis und Schmidt-Supprian et al., 2002). Schmidt-Supprian et al., analysierten IKK β Δ K^{fl/d} CD4Cre⁺ Mäuse (Schmidt-Supprian et al., 2003). Diese Mäuse besaßen neben der CD4Cre-Rekombinase ein insuffizientes IKK β -Allel mit deletierter Kinase-region und ein IKK β -Allel mit loxP flankierter Kinase-region. In der Milz im Gegensatz zum Thymus besaß ein überwiegender Teil der T Zellen noch die loxP-flankierte Kinase-region aufgrund von einer inkompletten Rekombination. Auch wenn es im Thymus aussah, als wäre die Rekombination nahezu erfolgreich gewesen, scheinen die Zellen mit inkompletter Rekombination einen Selektionsvorteil gegenüber den Zellen mit erfolgter Rekombination besessen zu haben und letztere in den peripheren Organen zu verdrängen (Schmidt-Supprian et al., 2003).

Die Hypothese wird durch eine Publikation von Li et al., gestützt. Bei den IKK β^{ff} CD19Cre⁺ Mäusen war dabei, wie in dieser Arbeit, das 3. Exon von IKK β^{ff} von loxP-Sequenzen flankiert. Die Rekombination erfolgte jedoch B zellspezifisch. Die Experimente ergaben, dass in einigen B Zellen der IKK β^{ff} CD19Cre Mäuse ein funktionelles IKK β -Allel erhalten war. Die Rekombination fand somit nicht auf beiden Allelen statt, während B Zellen aus heterozygoten IKK $\beta^{+/ff}$ CD19Cre Mäusen, also

Mäusen mit einem Wildtyp IKK β Allel, das zweite, loxP flankierte Allel nahezu komplett deletiert hatten (Li et al., 2003). Dieser Effekt war besonders bei älteren Mäusen festzustellen (Li et al., 2003). Durch die Deletion von IKK β scheinen die B Zellen auch hier einen Selektionsnachteil gegenüber den B Zellen mit inkompletter IKK β -Deletion besessen zu haben und diese dann zu verdrängen (Li et al., 2003).

Kongruent zu den Ergebnissen der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse sind die Ergebnisse des IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mausmodells. Die Zellzahl im Lymphknoten und in der Milz der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäuse war zwar gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht und die T Zellen waren aktiviert, IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäuse unterschieden sich jedoch nicht von C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäusen. Verantwortlich an dem fehlenden Überlebensvorteil und dem ähnlichen Phänotyp der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} und C Δ L+^{CD4CreERT2+} Mäuse ist am ehesten auch hier der Selektionsvorteil der IKK β exprimierenden eGFP+ Zellen gegenüber den eGFP+ Zellen mit erfolgreicher Deletion von IKK β^{ff} .

Das Problem einer fehlenden IKK β -Deletion im IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+ (CD4CreERT2+)} Modell könnte durch IKK $\beta^{-/-}$ C Δ L+^{CD4Cre+ (CD4CreERT2+)} Mäuse umgangen werden, die in allen Zellen, nicht nur in T Zellen, defizient für IKK β sind und die IKK β - Deletion unabhängig von einer Cre-Rekombinase ist. Jedoch sind IKK $\beta^{-/-}$ Mäuse nicht überlebensfähig. Fetale IKK $\beta^{-/-}$ Mäuse sterben an akutem Leberversagen durch gesteigerte Apoptose fetaler Hepatozyten (Li Q et al., 1999). Der nächste Schritt wäre somit, C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse mit IKK β -Inhibitoren zu behandeln und Auswirkungen auf das Überleben und den Phänotyp zu analysieren.

Eine andere mögliche Erklärung für die oben genannten Veränderungen im Phänotyp der Mäuse ist, dass in IKK β defizienten T Zellen IKK α kompensatorisch statt IKK β als I κ B-Kinase wirkt (Schmidt-Supprian et al., 2003). Schmidt-Supprian et al., fanden nach anti-CD3-Stimulierung in IKK $\beta^{-/-}$ T Zellen Aktivierung von NF- κ B durch NEMO/ IKK α Komplexe (Schmidt-Supprian et al., 2003). Auch Lam et al. fanden nach IKK β -Inhibierung Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges durch IKK α in ABC DLBCL Zellen (Lam et al., 2008).

Die Aktivierung von MAPK wie JNK oder p38 kann zudem mit zu den Veränderungen im Phänotyp der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse beitragen. Besonders JNK2 wird von CARMA1 nach TCR-Stimulierung reguliert und CARMA1 induzierte Oligomerisierung

von BCL10 scheint dabei bedeutsam zu sein, indem BCL10 als Adaptermolekül für JNK2 und seine Kinasen dient (Blonska et al., 2007). In Jurkat T Zellen mit einer dominant-negativen Form von CARMA1 ist die Aktivierung von JNK nach anti-CD3/CD28-Costimulierung behindert (Gaide und Favier et al., 2002). Auch in CARMA1^{-/-}T Zellen wird JNK nach Stimulierung deutlich schwächer phosphoryliert (Hara et al., 2003). In MALT1^{-/-}T Zellen sieht man nach PMA+ Ionomycin- und TCR-Stimulierung, dass JNK und auch p38 deutlich schwächer phosphoryliert werden (Ruland et al., 2003). In C Δ L⁺ exprimierenden Jurkat T Zellen kam es zur Akkumulierung von c-Jun und JunB und Aktivierung von AP-1 ohne vorherige Stimulierung (Blonska et al., 2012). CARMA1 bzw. der CBM-Komplex spielt somit eine wichtige Rolle in der Aktivierung der MAPK.

Zusammenfassend ist IKK β bedeutend für Erkrankung und Tod eines konstitutiv aktiven CARMA1-Modells. Der veränderte Phänotyp und die verkürzte Lebensdauer trotz IKK β^{ff} im murinen C Δ L⁺ Modell können verschiedene Ursachen haben. Am ehesten ist es durch die insuffiziente Deletion von IKK β zu erklären. Aber auch die kompensatorische IKK α -Aktivierung, die statt IKK β als I κ B-Kinase wirken kann, oder die Aktivierung der MAPK kann mit dazu beitragen.

6.4 Perspektiven: Therapeutische Ansätze

In dieser Arbeit wurde der klassische NF- κ B-Signalweg in T Zellen untersucht. Die Ergebnisse lassen sich jedoch auf den klassischen NF- κ B-Signalweg in B Zellen übertragen. Die derzeitige Standardtherapie des DLBCL besteht aus der so genannten R-CHOP-Therapie, einer Kombinationstherapie aus dem anti-CD20 Antikörper Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Oncovin (Vincristin) und Prednison. Zum Teil wird die R-CHOP-Therapie mit einer Radiotherapie kombiniert. Neue Ansätze und Studien, die auch die Unterteilung des DLBCL in die beiden wichtigsten Untergruppen ABC und GCB berücksichtigen, sind in der Entwicklung.

Der positive Effekt auf das Überleben der C Δ L⁺CD4^{Cre+} Mäuse bei zusätzlicher T zellspezifischer IKK β -Deletion ist eindeutig. Besonders für Patienten mit dem aggressiven ABC DLBCL mit konstitutiver Aktivierung des NF- κ B-Signalweges ergeben sich daraus neue Therapieansätze durch Blockade des IKK-Komplexes oder

weiter distal im NF- κ B-Signalweg durch Inhibierung der I κ B-Degradierung oder durch Inhibierung von NF- κ B.

Derzeit gehören IKK β -Inhibitoren noch nicht zur Standardtherapie des DLBCL. Jedoch konnte in vitro festgestellt werden, dass IKK β -Inhibitoren auf ABC DLBCL Zellen toxisch wirken und eine zusätzliche IKK α -Blockade synergistisch zu den IKK β -Inhibitoren wirkt, da IKK α kompensatorisch zu IKK β als I κ B-Kinase wirken und NF- κ B aktivieren kann (Lam et al., 2005). Somit könnte neben dem Einsatz von IKK β -Inhibitoren auch eine kombinierte Therapie aus IKK α - und IKK β -Inhibitoren von Nutzen für Patienten mit dem ABC DLBCL sein.

IKK β -Inhibitoren wurden bereits in vivo erprobt. Es wurden gute Ergebnisse für den IKK β -Inhibitor MLN120B in einem Mausmodell des Multiplen Myeloms gezeigt (Hideshima et al., 2006). Der IKK-Inhibitor IKK16 wurde bereits in vivo erprobt in einem Mausmodell, das zwar nicht die Auswirkungen des Inhibitors auf hämatoproliferative Erkrankungen zeigte, jedoch gute Ergebnisse in Bezug auf Multi-Organ-Versagen in einem Sepsis-Modell zeigte (Coldewey et al., 2013). Auch der IKK-Inhibitor IMD-0354 wurde bereits in vivo in einem Rattenmodell erprobt (Watanabe et al., 2013).

Es gibt bereits therapeutische Ansätze in klinischer Erprobung, die auf der Stelle von I κ B, somit etwas weiter distal im NF- κ B-Signalweg, eingreifen. Nach Aktivierung phosphoryliert der IKK-Komplex I κ B, was zur K48-Ubiquitinierung und anschließenden Degradierung von I κ B durch das 26S Proteasom führt (Blonska und Lin, 2009). Dies führt zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nukleus. Hemmung des NF- κ B Signalweges in B Zellen durch Behinderung der I κ B α -Degradierung kann z.B. durch den 26S Proteasomeninhibitor Bortezomib oder durch den NEDD8-Activating Enzyme Inhibitor MLN4924 erreicht werden (Dunleavy et al., 2009; Milhollen und Traore et al., 2010). Dunleavy et al. beschreiben für Patienten mit rezidivierendem oder therapierefraktärem DLBCL einen Vorteil für die Kombination von Chemotherapeutika mit Bortezomib beim ABC Subtyp (Dunleavy et al., 2009). Ruan et al. veröffentlichten 2011 eine Phase II Studie für die Kombinationstherapie R-CHOP und Bortezomib als Ersttherapie beim DLBCL. Der aggressivere ABC Subtyp des DLBCL hat, wie in der Einleitung erwähnt, eine höhere Letalität als der GCB Subtyp. In dieser Studie jedoch konnte durch die Kombinationstherapie von Bortezomib und R-CHOP eine ähnliche Überlebensdauer der beiden Subtypen erreicht werden (Ruan et al., 2011). Bortezomib

konnte also besonders die Letalität der Patienten mit dem aggressiven ABC DLBCL senken.

Zusammenfassend ist IKK β bedeutend für Erkrankung und Tod eines konstitutiv aktiven CARMA1-Modells. Der veränderte Phänotyp und die verkürzte Lebensdauer trotz IKK β^{ff} im murinen C Δ L+ Modell können mehrere Ursachen haben. Am ehesten ist es durch die insuffiziente Deletion von IKK β zu erklären. Aber auch die kompensatorische IKK α Aktivierung, die statt IKK β als I κ B-Kinase wirken kann, oder die Aktivierung der MAPK können mit dazu beitragen. Neue Strategien in der Therapie des DLBCL, die mit dem NF- κ B-Signalweg distal des CBM-Komplex interferieren, wie z.B. durch Inhibierung der I κ B α -Degradierung, sind bereits in klinischer Erprobung. Das Ergebnis dieser Arbeit legt nahe, dass weiterhin der Fokus auf den distalen NF- κ B-Signalweg zur Entwicklung neuer Therapieansätze gelegt werden sollte.

7. Zusammenfassung

In lymphoproliferativen Erkrankungen des adaptiven Immunsystems wie im primär gastrointestinalen B Zell Lymphom, im primären ZNS-Lymphom oder im diffus großzelligen B Zell Lymphom, spielt der CBM-Komplex durch gesteigerte Expression oder konstitutive Aktivierung von CARMA1 eine wichtige Rolle (Dong et al., 2011; Lenz und Davis et al., 2008; Montesinos-Rongen et al., 2010; Nakamura et al., 2005; Oshiro et al., 2006). Zentraler Punkt dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, inwieweit CARMA1 alleine über Aktivierung von IKK β zu T Zellaktivierung, Zellexpansion und Lebensdauer der Mäuse mit einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 beiträgt.

Für die Fragestellung wurde ein Mausmodell mit T zellspezifischer Expression einer konstitutiv aktiven Form von CARMA1, eines CARMA1-Konstrukt mit Deletion der Linker Region, verwendet. Zudem wurde IKK β in diesem Modell T zellspezifisch deletiert. Das Modell wurde zunächst auf einem T zellspezifischen Hintergrund mit Hilfe der CD4CreERT2/ loxP-Systems untersucht. Die Ergebnisse lassen sich jedoch auf den klassischen NF- κ B-Signalweg in B Zellen übertragen. In dieser Arbeit ist dabei erstmals die erfolgreiche Methode einer selektiven Induktion einer konstitutiv aktiven Mutante von CARMA1 in T Zellen mit Hilfe des CD4CreERT2/ loxP -Systems beschrieben worden. Die Deletion von IKK β im IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Modell war zwar insuffizient, das C Δ L+^{CD4CreERT2+} Modell zeigte jedoch Anzeichen einer hämatoproliferativen Erkrankung wie Zellexpansion und -aktivierung.

Da die Deletion von IKK β im IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4CreERT2+} Modell insuffizient war, erfolgten die weiteren Analysen mit IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen. Die CD4Cre-Rekombinase ist dabei nicht abhängig von Tamoxifeninjektion oder anderen externen Stimuli. Die Expression erfolgt konstitutiv nach Aktivierung des CD4-Promoters. Mit Hilfe des IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Modells konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IKK β bedeutend für Erkrankung und Tod der Mäuse mit T zellspezifischen Expression eines konstitutiv aktiven CARMA1 Konstrukts ist. Zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist dabei die Kaplan-Meier-Kurve der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse. Von den IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen starben bis zum Ende der Beobachtungen an Tag 465 35%, während keine der IKK β^{ff} C Δ L+^{CD4Cre+} Mäuse bis Tag 465 starb. Bei einem mittleren Überleben von C Δ L+^{CD4Cre+} Mäusen mit 49 Tagen (Pechloff 2010, persönliche Mitteilung) ist durch die T zellspezifische Deletion

von IKK β in den C Δ L^{+CD4Cre+} Mäusen ein deutlicher Überlebensvorteil erreicht worden. Die Aktivierung von NF- κ B via IKK β scheint somit der entscheidende Pathomechanismus einer konstitutiv aktiven CARMA1 Mutante zu sein.

Auch bei deutlich reduzierter Letalität in dem IKK β^{ff} C Δ L^{+CD4Cre+} Modell kam es zur Veränderungen im Phänotyp, d.h. zu T Zellaktivierung und Zellexpansion. Dies ist am ehesten durch die insuffiziente Deletion von IKK β zu erklären, da nicht in allen Mäusen eine erfolgreiche IKK β -Deletion in den C Δ L exprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnte. Aber auch die kompensatorische IKK α -Aktivierung, die statt IKK β als I κ B-Kinase wirken kann, oder die Aktivierung der MAPK können mit dazu beitragen.

Besonders für Patienten mit dem aggressiven ABC DLBCL mit konstitutiver Aktivierung des NF- κ B-Signalweges ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit neue Therapieansätze durch Blockade des IKK-Komplexes oder weiter distal im NF- κ B-Signalweg durch Inhibierung der I κ B-Degradierung oder durch Inhibierung von NF- κ B. Derzeit gehören IKK β -Inhibitoren noch nicht zur Standardtherapie des DLBCL. Jedoch konnte in vitro festgestellt werden, dass IKK β -Inhibitoren auf ABC DLBCL Zellen toxisch wirken und eine zusätzliche IKK α -Blockade synergistisch zu den IKK β -Inhibitoren wirkt, da IKK α kompensatorisch zu IKK β als I κ B-Kinase wirken und NF- κ B aktivieren kann (Lam et al., 2005). Somit könnte neben dem Einsatz von IKK β -Inhibitoren auch eine kombinierte Therapie aus IKK α - und IKK β -Inhibitoren von Nutzen für Patienten mit dem ABC DLBCL sein. IKK β -Inhibitoren wurden bereits in vivo im Tiermodell erprobt.

Es gibt bereits therapeutische Ansätze in klinischer Erprobung, die auf der Stelle von I κ B, somit etwas weiter distal im NF- κ B-Signalweg, eingreifen. Hemmung des NF- κ B Signalweges in B Zellen durch Behinderung der I κ B α -Degradierung kann z.B. durch den 26S Proteasomeninhibitor Bortezomib oder durch den NEDD8-Activating Enzyme Inhibitor MLN4924 erreicht werden (Dunleavy et al., 2009; Milhollen und Traore et al., 2010). Bortezomib zeigt in klinischen Studien gute Ergebnisse in der Therapie des DLBCL, besonders des ABC Subtyps (Dunleavy et al., 2009; Ruan et al., 2011). Das Ergebnis dieser Arbeit legt nahe, dass weiterhin der Fokus auf den distalen NF- κ B-Signalweg zur Entwicklung neuer Therapieansätze gelegt werden sollte.

8. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Activated B cell-like
AICD	Activation Induced Cell Death
AP-1	Activator protein 1
APC	Antigen Presenting Cell
ATF	Activating transcription factor
B7-1	CD80
B7-2	CD86
BAFF	B Cell Activating Factor
BCL10	B cell lymphoma 10
BIMP	Bcl10-interacting maguk protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CamKII	Calmodulin-dependent protein kinase II
CARMA1	CARD-and membrane-associated guanylate kinase-like domain-containing protein
CARD	Caspase recruitment domain
CBM-Komplex	CARMA1-BCL10-MALT1-Komplex
CD	Cluster of differentiation
CD40L	Cluster of differentiation 40 ligand
c-Jun	c-jun transcription factor
CK1a	Casein kinase 1 alpha
c-Rel	v-Rel Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog C
DAG	Diacylglycerol
DLBCL	Diffus großzelliges B Zell Lymphom
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fas	Fs7 associated cell surface antigen
FCS	Fetale calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
FSC	Forward scatter
Fyn	fgr/yes-related novel PTK
GCB	Germinal center like
GUK	Guanylate kinase like
HPK1	Hematopoietic progenitor kinase 1
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor of kappa B
IKK	Inhibitor of kappa B kinase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IP3	Inositol trisphosphate
IS	Immunologische Synapse
ITAMS	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
JNK	c-Jun NH2-terminal kinases
JunB	Jun B proto-oncogene
JunD	Jun D proto-oncogene
kb	1000 Basenpaare
kDa	Kilodalton
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LN	Lymph node
LPS	Lipopolysaccharide
MAGUK	Membrane-associated GUK
MALT1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
MALT Lymphom	Mucosa associated lymphoid Tissue Lymphom
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAP2K	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAP3K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MHC	Major histocompatibility complex
MKK7	MAP kinase kinase 7

NEMO	NF- κ B essential modifier
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
p38	Protein of 38 kDa
p65	Protein of 65 kDa
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1 Homologous
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanine-5
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphinositide 3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ 1	Phospholipase C γ 1
PMBL	Primary mediastinal B cell lymphoma
Ras-GRP	Guanine nucleotide releasing protein
RelA	v-Rel Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A
RelB	v-Rel Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog B
RHD	Rel homology domain
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFK	Src family kinase
SH3	Src homology 3
shRNA	Short hairpin RNA
SMAC	Supramolecular activation Clusters
Src	v-Src Sarcoma Viral Oncogene Homolog
TAK1	Transforming growth factor-b (TGFb)- activated protein kinase
Taq	Thermophilus aquaticus

TBS	Tribromosalicylanilide
TCR	T Zell Rezeptoren
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Th	T helper cell
Thr	Threonin
TLR	Toll-like receptor
TNFa	Tumor necrosis family
TRAF6	TNF-Receptor-Associated Factor
Tregs	Regulatory T cell
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ty	Tyrosin
Zap70	Zeta-chain associated protein kinase 70

9. Literaturverzeichnis

Aghajani K, Kheertivasan S, Yu Y, Gounari F. Generation of CD4CreERT2 Transgenic Mice to Study Development of Peripheral CD4-T-Cells. *Genesis* 2012; 50: 908–913.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511.

Aster JC, Bonilla FA. Normal B and T lymphocyte development. Uptodate 2011.

Bertin J, Wang L, Guo Y, Jacobson MD, Poyet JL, Srinivasula SM, Merriam S, DiStefano PS, Alnemri ES. CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD) / membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NFkappa B. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 11877–11882.

Blonska M, Joo D, Zweidler-McKay PA, Zhao Q, Lin X. CARMA1 controls Th2 cell-specific cytokine expression through regulating JunB and GATA3 transcription factors. *J. Immunol.* 2012; 188: 3160-3168.

Blonska M, Lin X. CARMA1-mediated NF- κ B and JNK activation in lymphocytes. *Immunological Reviews* 2009; 228: 199–211.

Blonska M, Lin X. NF- κ B signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins. *Cell Res.* 2011; 21: 55-70.

Blonska M, Pappu BP, Matsumoto R, Li H, Su B, Wang D, Lin X. The CARMA1-Bcl10 signaling complex selectively regulates JNK2 kinase in the T cell receptor-signaling pathway. *Immunity* 2007; 26: 55–66.

Bonilla FA. The adaptive cellular immune response. Uptodate 2011.

Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004; 25: 280-288.

Brenner D, Brechmann M, Röhling S, Tapernoux M, Mock T, Winter D, Lehmann WD, Kiefer F, Thome M, Krammer PH, Arnold R. Phosphorylation of CARMA1 by HPK1 is critical for NF-kappaB activation in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2009; 106: 14508-14513.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40.

Che T, You Y, Wang D, Tanner MJ, Dixit VM, Lin X. MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 15870–15876.

Cheng J, Montecalvo A, Kane LP. Regulation of NF- κ B induction by TCR/CD28. *Immunol. Res.* 2011; 50: 113-117.

Coldewey SM, Rogazzo M, Collino M, Patel NSA, Thiernemann C. Inhibition of I κ B kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. *Dis Model Mech.* 2013; 6: 1031-1042

Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 1861-1874.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239–252.

Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 1999; 284: 309–313

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; 76: 1025–1037.

Dimitratos SD, Woods DF, Stathakis DG, Bryant PJ. Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays* 1999; 21: 912–921.

Dong G, Chanudet E, Zeng N, Appert A, Chen YW, Au WY, Hamoudi RA, Watkins AJ, Ye H, Liu H, Gao Z, Chuang SS, Srivastava G, Du MQ. A20, ABIN-1/2, and CARD11 mutations and their prognostic value in gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 1440-51.

Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 55–72.

Dong C, Yang DD, Tournier C, Whitmarsh AJ, Xu J, Davis RJ, Flavell RA. JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 2000; 405: 91–94.

Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave SS, Wright G, Grant N, Shovlin M, Jaffe ES, Janik JE, Staudt LM, Wilson WH. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2009; 113: 6069-6076.

Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, Widder P, Rosenberger F, van der Merwe PA, Allen PM, Shaw AS. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 1998; 94: 667–677.

Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 859–868.

Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre mice. *Methods Mol. Biol.* 2009; 530: 343-363.

Fuchs SY, Dolan L, Davis RJ, Ronai Z. Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* 1996; 13: 1531–1535.

Fuchs SY, Xie B, Adler V, Fried VA, Davis RJ, Ronai Z. c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 32163–32168.

Freedman AS, Friedberg JW. Initial treatment of diffuse large B cell lymphoma. Uptodate 2011.

Gaide O, Favier B, Legler DF, Bonnet D, Brissoni B, Valitutti S, Bron C, Tschopp J, Thome M. CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 836–843.

Gaide O, Martinon F, Micheau O, Bonnet D, Thome M, Tschopp J. Carma1, a CARD-containing binding partner of Bcl10, induces Bcl10 phosphorylation and NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* 2001; 496: 121–127.

Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA. An α/β T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 1996; 274: 209-219.

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 1996; 15: 2760–2770.

Hara H, Bakal C, Wada T, Bouchard D, Rottapel R, Saito T, Penninger J. The molecular adapter Carma1 controls entry of I κ B kinase into the central immune synapse. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 1167-1177.

Hara H, Wada T, Bakal C, Koziaradzki I, Suzuki S, Suzuki N, Nghiem M, Griffiths EK, Krawczyk C, Bauer B, D'Acquisto F, Ghosh S, Yeh WC, Baier G, Rottapel R, Penninger JM. The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity* 2003; 18: 763-75.

Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol. Cell Biol.* 1999; 77: 304-311.

Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B and the immune response. *Oncogene* 2006; 25: 6758-6780.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 2004; 18: 2195-2224.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132: 344–362.

Hernandez JB, Newton RH, Walsh CM. Life and death in the thymus-cell death signaling during T cell development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010; 22: 865-871.

Hideshima T, Neri P, Tassone P, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C, Dang L, Munshi N, Richardson P, Schenkein D, Anderson KC. MLN120B, a novel IkappaB kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 1;12(19):5887-94.

Hobeika E, Thiemann S, Storch B, Jumaa H, Nielsen PJ, Pelanda R, Reth M. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:13789–13794.

Ishiguro K, Green T, Rapley J, Wachtel H, Giallourakis C, Landry A, Cao Z, Lu N, Takafumi A, Goto H, Daly MJ, Xavier RJ. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is a modulator of CARMA1-mediated NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26: 5497-5508.

Jameson SC, Masopust D. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 2009; 31: 859-871.

Jost P, Ruland J. Aberrant NF-κB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 2007; 109: 2700-2707.

Jun JE, Wilson LE, Vinuesa CG, Lesage S, Blery M, Miosge LA, Cook MC, Kucharska EM, Hara H, Penninger JM, Domashenz H, Hong NA, Glynn RJ, Nelms KA, Goodnow CC. Identifying the MAGUK protein CARMA1 as a central regulator of humoral immune responses and atopy by genomewide mouse mutagenesis. *Immunity* 2003; 18: 751-762.

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Dérijard B, Moore G, Davis R, Karin M. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 1994; 8: 2996–3007.

Kane LP, Lin J, Weiss A. It's all Rel-ative: NF- κ B and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol.* 2002; 23: 413-420.

Kuo W, Duke CJ, Abe MK, Kaplan EL, Gomes S, Rosner M R. ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 2004; 22: 23073-23081.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1979; 227: 680-685.

Lam LT, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottellet M, Nong Y, Wen D, Adams J, Dang L, Staudt LM. Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 28-40.

Lam LT, Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Wright G, Xu W, Zhao H, Yu X, Dang L, Staudt LM. Compensatory IKK α activation of classical NF- κ B signaling during IKK β inhibition identified by an RNA interference sensitization screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2008; 105: 20798–20803.

Lamason RL, McCully RR, Lew SM, Pomerantz JL. Oncogenic CARD11 mutations induce hyperactive signaling by disrupting autoinhibition by the PKC-responsive inhibitory domain. *Biochemistry* 2010; 49: 8240-8250.

Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, Ullrich A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1996; 93: 4355-4359.

Lee KY, D'Acquisto F, Hayden MS, Shim JH, Ghosh S. PDK1 nucleates T cell receptor induced signaling complex for NF- κ B activation. *Science* 2005; 308: 114–118.

Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, Pérez-Melgosa M, Sweetser MT, Schlissel MS, Nguyen S, Cherry SR, Tsai JH, Tucker SM, Weaver WM, Kelso A, Jaenisch R, Wilson CB. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 2001; 15: 763–774.

Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao H, Xu W, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Chan WC, Staudt LM. Oncogenic CARD11 mutations in human diffus large B cell lymphoma. *Science* 2008; 319: 1676-1679.

Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the I B kinase 2 gene. *Science* 1999; 284: 321-325.

Li ZW, Omori SA, Labuda T, Karin M, Rickert RC. IKK beta is required for peripheral B cell survival and proliferation. *J. Immunol.* 2003; 170: 4630-4637.

Lin X, Wang D. The roles of CARMA1, Bcl10, and MALT1 in antigen receptor signaling. *Semin. Immunol.* 2004; 16: 429-435.

Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF-kappaB inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 3792-3797.

Liu HH, Xie M, Schneider MD, Chen ZJ. Essential role of TAK1 in thymocyte development and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 11677-11682.

Matsumoto R, Wang D, Blonska M, Li H, Kobayashi M, Pappu B, Chen Y, Wang D, Lin X. Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T cell receptor mediated NF-kB activation. *Immunity* 2005; 23: 575-585.

McAllister-Lucas LM, Inohara N, Lucas PC, Ruland J, Benito A, Li Q, Chen S, Chen FF, Yamaoka S, Verma IM, Mak TW, Núñez G. Bimp1, a MAGUK family member linking protein kinase C activation to Bcl10-mediated NF-kappaB induction. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 30589-30597.

McCully RR, Pomerantz JL. The protein kinase C-responsive inhibitory domain of CARD11 functions in NF-kappaB activation to regulate the association of multiple signalling cofactors that differentially depend on Bcl10 and MALT1 for association. *Mol. Cell Biol.* 2008; 28: 5668-5686.

Milhollen MA, Traore T, Adams-Duffy J, Thomas MP, Berger AJ, Dang L, Dick LR,

Garnsey JJ, Koenig E, Langston SP, Manfredi M, Narayanan U, Rolfe M, Staudt LM, Soucy TA, Yu J, Zhang J, Bolen JB, Smith PG. MLN4924, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, is active in diffuse large B-cell lymphoma models: rationale for treatment of NF- κ B dependent lymphoma. *Blood* 2010; 116: 1515–1523.

Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998; 395: 82-86.

Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Brunn A, Gesk S, Richter J, Hong K, Wiestler OD, Siebert R, Küppers R, Deckert M. Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF-kappaB pathway in primary CNS lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 529-535.

Mordmuller B, Krappmann D, Esen M, Wegener E, Scheidereit C. Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism. *EMBO Rep.* 2003; 4: 82–87.

Morton, LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 2006; 107: 265-276.

Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway`s Immunobiology, 7th Edition, Chapter 1- Basic concepts in immunobiology. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, New York, 2008.

Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway`s Immunobiology, 7th Edition, Chapter 6- Signaling through immune system receptors. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, New York, 2008.

Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway`s Immunobiology, 7th Edition, Chapter 7- The development and survival of lymphocytes. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, New York, 2008.

Nakamura S, Nakamura S, Matsumoto T, Yada S, Hirahashi M, Suekane H, Yao T, Goda K, Iida M. Overexpression of caspase recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase 1 (CARMA1) and CARD9 in primary gastric B-cell

lymphoma. *Cancer* 2005; 104: 1885-1893.

Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J, Staudt LM. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 2006; 441: 106-110.

Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 1803-1811.

Oshiro A, Tagawa H, Ohshima K, Karube K, Uike N, Tashiro Y, Utsunomiya A, Masuda M, Takasu N, Nakamura S, Morishima Y, Seto M. Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/ lymphoma. *Blood* 2006; 107: 4500-4507.

Pasparakis M, Schmidt-Suppran M, Rajewsky K. I κ B kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 743-752.

Pechloff K. Persönliche Mitteilung 2010

Pfeifer A, Brandon EP, Kootstra N, Gage FH, Verma IM. Delivery of the Cre recombinase by a selfdeleting lentiviral vector: Efficient gene targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 11450–11455.

Prost S, Sheahan S, Rannie D, Harrison DJ. Adenovirus-mediated Cre deletion of floxed sequences in primary mouse cells is an efficient alternative for studies of gene deletion. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:E80.

Rawlings DJ, Sommer K, Moreno-Garcia ME. The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 799-812.

Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 1997. 25:1317–1318.

Rossman JS, Stoicheva NG, Langel FD, Patterson GH, Lippincott-Schwartz J, Schaefer BC. POLKADOTS are foci of functional interactions in T-Cell

receptormediated signaling to NF-kappaB. *Mol. Biol. Cell* 2006; 17: 2166–2176.

Ruan J, Martin P, Furman RR, Lee SM, Cheung K, Vose JM, Lacasce A, Morrison J, Elstrom R, Ely S, Chadburn A, Cesarman E, Coleman M, Leonard JP. Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 690-697.

Rueda D, Thome M. Phosphorylation of CARMA1: The link(er) to NF-κB activation. *Immunity* 2005; 23: 551–553.

Ruland J, Duncan GS, Wakeham A, Mak TW. Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* 2003; 19: 749-758.

Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol. Cell* 2004a; 15: 713–725.

Sabapathy K, Wagner EF. JNK2: a negative regulator of cellular proliferation. *Cell Cycle* 2004b; 3: 1520–1523.

Sagaert X, De Wolf-Peeters C, Noels H, Baens M. The pathogenesis of MALT lymphomas: where do we stand? *Leukemia* 2007; 21: 389-396.

Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadié M, Simonetti A, Lutz JM, Berrino F. HAEMACARE Working Group. Incidence of hematologic malignancies in europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010; 116: 3724-3734.

Schaefer BC, Kappler JW, Kupfer A, Marrack P. Complex and dynamic redistribution of NF-kappaB signaling intermediates in response to T cell receptor stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 1004–1009.

Schmidt-Supprian M, Courtois G, Tian J, Coyle AJ, Israel A, Rajewsky K, Pasparakis M. Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 2003; 19: 377-389.

Schmidt-Supprian M und Rajewsky K. Vagaries of conditional gene targeting. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 665-668.

Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-Receptor Signaling to Nuclear Factor κ B. *Immunity* 2006; 25: 701-715.

Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF. Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 1427-1432.

Shambharkar PB, Blonska M, Pappu BP, Li H, You Y, Sakurai H, Darnay BG, Hara H, Penninger J, Lin X. Phosphorylation and ubiquitination of the IkappaB kinase complex by two distinct signaling pathways. *EMBO J.* 2007; 26: 1794–1805.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4: E131–E136.

Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NF- κ B system for both canonical and noncanonical signaling. *Cell Res.* 2011; 21: 86-102.

Shinohara H, Maeda S, Watarai H, Kurosaki T. IkappaB kinase beta-induced phosphorylation of CARMA1 contributes to CARMA1 Bcl10 MALT1 complex formation in B cells. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 3285-3293.

Shinohara H, Yasuda T, Aiba Y, Sanjo H, Hamadate M, Watarai H, Sakurai H, Kurosaki T. PKC beta regulates BCR mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 1423–1431.

Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-García ME, Ovechkina YL, Rawlings DJ. Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF- κ B activation. *Immunity* 2005; 23: 561–574.

Stilo R, Liguoro D, Di Jeso B, Formisano S, Consiglio E, Leonardi A, Vito P. Physical and functional interaction of CARMA1 and CARMA3 with Ikappa kinase gamma-NFkappaB essential modulator. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 34323-34331.

Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y. JNK is involved in signal

integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994; 77: 727–736.

Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol. Cell* 2004; 14: 289–301.

Thome M, Charton JE, Pelzer C, Hailfinger S. Antigen Receptor Signaling to NF- κ B via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2010; 2: a003004.

Veldhoen M. The role of T helper subsets in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21: 606-611.

Wan YY, Chi H, Xie M, Schneider MD, Flavell RA. The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 851–858.

Wang L, Guo Y, Huang WJ, Ke X, Poyet JL, Manji GA, Merriam S, Glucksmann MA, DiStefano PS, Alnemri ES, Bertin J. Card10 is a novel caspase recruitment domain/membrane-associated guanylate kinase family member that interacts with BCL10 and activates NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 21405–21409.

Wang D, Matsumoto R, You Y, Che T, Lin XY, Gaffen SL, Lin X. CD3/ CD28 costimulation induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol. Cell Biol.* 2004; 24: 164-171.

Watanabe R, Azuma RW, Suzuki JI, Ogawa M, Itai A, Hirata Y, Komuro I, Isobe M. Inhibition of NF-kappaB activation by a novel IKK inhibitor reduces the severity of experimental autoimmune myocarditis via suppression of T-cell activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Oct 4

Weiss L, Whitmarsh AJ, Yang DD, Rincon M, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of c-Jun NH (2)-terminal kinase (Jnk) gene expression during T cell activation. *J. Exp. Med.* 2000; 191:139–146.

Xiao G, Fong A, Sun SC. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase

involves docking I κ B kinase alpha (IKK α) to p100 and IKK α -mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 30099–30105.

Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell Mol Immunol.* 2004; 1: 186-192.

Zhang YL, Dong C. MAP kinases in immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* 2005; 2: 20-27.

Zhou, H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, Eby M, Xiao W and Dixit VM. Bcl10 activates the NF- κ B pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 2004; 427: 167–171.

10. Danksagung

Ich danke herzlich Prof. Dr. med. Jürgen Ruland, der es mir ermöglicht hat, die Arbeit in dem Forschungslabor für Molekulare Immunologie am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München durchzuführen.

Zudem gilt ein großer Dank allen MitarbeiterInnen des Forschungslabors für Molekulare Immunologie für die freundliche und konstruktive Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich Dr. rer. nat. Uta Meyer zum Büschenfelde, Dr. rer. nat. Konstanze Pechloff und Vera Pfänder für die Unterstützung während der Arbeit danken.