

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

Die Bedeutung der Antigenrezeptor-vermittelten NF- κ B-Aktivierung
in der T-Zell-Selektion und
in der Entstehung eines *c-Myc* getriebenen Non-Hodgkin-Lymphoms
im Mausmodell

Stefanie Weiss

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumaier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. J. Ruland
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 05.11.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.05.2009 angenommen.

Science is the poetry of reality.

(R.D.)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung.....	6
1.1 Aufbau und Funktion des Antigenrezeptors.....	6
1.2 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	7
1.3 T-Zell-Rezeptor-vermittelte NF- κ B-Aktivierung.....	8
1.4 Antigenrezeptor-vermittelte NF- κ B-Aktivierung in Thymozyten.....	9
1.5 Entwicklung und Selektion der T-Zellen im Thymus	9
1.6 Die Bedeutung von NF- κ B für die Positive und Negative Selektion der T-Zellen im Thymus	12
1.7 B-Zell-Rezeptor-vermittelte NF- κ B-Aktivierung.....	12
1.8 Die Rolle von NF- κ B in der Genese von Non-Hodgkin-Lymphomen.....	13
1.9 Problemstellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Standardgeräte	16
2.1.2 Chemikalien und biogene Substanzen.....	16
2.1.3 Standardlösungen und Puffer.....	17
2.1.4 Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze	19
2.1.5 Antikörper, Enzyme und Inhibitoren.....	20
2.1.6 Oligonukleotide	20
2.1.7 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	21
2.1.8 Molekularbiologische Kitsysteme	21
2.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.10 Verwendete Software	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Haltung, Zucht und Untersuchung der Mäuse.....	23
2.2.2 Zellkultur	23
2.2.2.1 Präparation und Kultur primärer muriner Zellen.....	23
2.2.2.2 Kultur humaner Zelllinien	24
2.2.2.3 Apoptosemessung durch Trypanblaufärbung.....	24
2.2.3 Stimulations- und Inhibitionsexperimente.....	24
2.2.3.1 Depletion von B-Zellen aus der peripheren Lymphozytenpopulation	24
2.2.3.2 Stimulationsexperimente	25

2.2.3.3	Inhibitionsexperimente	26
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.4.1	DNS-Extraktion	26
2.2.4.2	RNS-Extraktion	26
2.2.4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.4.5	Herstellung nukleärer Zelllysate	29
2.2.4.6	Herstellen radioaktiv-markierter Sonden	29
2.2.4.7	Nachweis von DNS-Bindungsproteinen im Nukleus (EMSA)	29
2.2.4.8	Herstellung zytoplasmatischer Zelllysate	30
2.2.4.9	Bestimmung des Proteingehaltes mit der Bradford-Methode	30
2.2.4.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.2.4.11	Immunoblot (Western Blot)	31
2.2.5	Durchflusszytometrie	31
2.2.5.1	Klassifizierung humaner und muriner Lymphozyten	31
2.2.5.1.1	Proliferationsmessung	32
2.2.5.1.2	Apoptosemessung	33
2.2.5.1.3	Nachweis von intrazellulärer I κ B α -Degradation	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Die Bedeutung der Antigenrezeptor-vermittelten NF- κ B-Aktivierung in der T-Zell-Selektion	34
3.1.1	Fehlende NF- κ B-Aktivierung über den TCR durch Bcl10-Defizienz verhindert Proliferation und Aktivierung auch in OT-2 transgenen reifen T-Lymphozyten	35
3.1.2	Bcl10/Malt1-vermittelte Signale sind für die NF- κ B-Aktivierung in Thymozyten nach Zell-Zell-Interaktion entscheidend	36
3.1.3	Die Rolle von Bcl10/Malt1 in der TCR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung in DP und SP Thymozyten	37
3.1.4	Normale Positive Selektion OT-2 TCR transgener T-Zellen in der Abwesenheit von Bcl10 <i>in vivo</i>	38
3.1.5	Peptid-spezifische klonale Deletion (Negative Selektion) unreifer Thymozyten <i>in vitro</i> ist Bcl10 unabhängig	41
3.2	Die Bedeutung der Antigenrezeptor-vermittelten NF- κ B-Aktivierung in der Entstehung eines <i>c-Myc</i> getriebenen Lymphoms im Mausmodell	42
3.2.1	Die Abwesenheit von Bcl10 verhindert die Entstehung eines reifen <i>c-Myc</i> getriebenen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms im Mausmodell nicht ...	43

3.2.2	Fehlen BCR-vermittelter NF- κ B-Aktivierung ändert den Phänotyp von reifen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen im Modell der E λ - <i>myc</i> transgenen Maus nicht	45
4	Diskussion	47
4.1	Reguläre Positive und Negative Selektion von Thymozyten in Abwesenheit von Bcl10.....	47
4.2	Bcl10/Malt1-unabhängige Entstehung von reifen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen im Modell der E λ - <i>myc</i> transgenen Maus.....	49
5	Zusammenfassung	52
	Literaturverzeichnis.....	53
	Verzeichnis der Abkürzungen	62
	Verzeichnis der Abbildungen	67
	Verzeichnis der Tabellen.....	67
	Lebenslauf	68
	Danksagung	70

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des Antigenrezeptors

B- und T-Lymphozyten spielen eine Schlüsselrolle in der adaptiven Immunabwehr des Menschen. Sie tragen spezielle Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, um adäquat auf die Anwesenheit von antigenen Strukturen reagieren zu können. Stimulation dieser Antigenrezeptoren führt zur Expression zahlreicher Gene, die eine spezifische Immunantwort ermöglichen.

Reife T-Lymphozyten exprimieren einen Antigenrezeptor, der aus je einer komplett rearrangierten α - und β -Kette besteht. Dieses heterodimere Transmembranprotein ist konstitutiv assoziiert mit den ζ und $\epsilon/\delta/\gamma$ Ketten des clusters of differentiation (CD)3-Komplexes. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) kann mit Antigenpeptiden in Interaktion treten, die ihm über major histocompatibility complex (MHC)-Moleküle von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) angeboten werden. Der CD3-Komplex dient der intrazellulären Signaltransduktion. Antigenbindung führt zur Rekrutierung der protein tyrosin kinase p56^{Lck} an den TCR/CD3-Komplex. Das Mitglied der Sarkomavirus Tyrosinkinase (Src) Familie wird so aktiviert und phosphoryliert das immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) der ζ -Kette im TCR/CD3-Komplex. Dieses dient als Bindungsstelle für die zeta-chain associated protein kinase 70 (Zap-70), einer Proteintyrosinkinase der spleen tyrosine kinase (Syk) Familie. Zap-70 wird durch Rekrutierung aktiviert und phosphoryliert daraufhin weitere Adaptormoleküle, die der konsekutiven Signaltransduktion dienen (17,49,91).

Der Antigenrezeptor der B-Zelle wird von einem membrangebundenen Immunglobulin (Ig) gebildet. Dieses besteht aus zwei jeweils identischen leichten und schweren Ketten. Jede schwere Kette besitzt eine transmembranöse Domäne und ist mit einem invarianten I α /I β -Heterodimer assoziiert. Sowohl I α als auch I β besitzen in ihrer cytoplasmatischen Domäne ein ITAM. Nach Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BCR) werden zwei Tyrosinreste der ITAMs durch die Src-Kinase Lck/Yes related novel tyrosine kinase (Lyn) phosphoryliert. An die phosphorylierten ITAMs kann die Kinase Syk über eine Src homology (SH) 2 Domäne binden und die Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden auslösen (58,75).

Stimulation des Rezeptors durch Antigene führt in der physiologischen Situation zu Proliferation und im Zusammenhang mit weiteren Signalen zur Differenzierung der B-Zelle in eine Antikörper-produzierende Plasmazelle. Entfernung des BCRs führt in

reifen, nicht voraktivierten B-Zellen zu Apoptose und dem Verschwinden dieser Zellen aus der Peripherie (57). Auch die Mehrzahl der reifen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome exprimiert einen funktionstüchtigen B-Zell-Rezeptor. Die meisten Translokationen zwischen Onkogen und Immunglobulin befinden sich also in einem nicht-produktiv rearrangierten Ig-Locus (37).

1.2 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Stimulation des Antigenrezeptors in B- und T-Zellen führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, die Differenzierung, Proliferation, Überleben und Effektorfunktionen in unreifen und reifen Lymphozyten vermitteln. Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor κ B (NF- κ B) spielt hierbei eine entscheidende Rolle (95). Die NF- κ B-Proteinfamilie in Säugern setzt sich aus fünf Mitgliedern zusammen:

NF- κ B1 (p50 und sein Vorläuferprotein p105) und NF- κ B2 (p52 und sein Vorläuferprotein p100), sowie RelA (p65), RelB und c-Rel, die eine Carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) besitzen (95,105). Da diese Proteine Homo- und Heterodimere bilden, spricht man häufig auch von NF- κ B-Untereinheiten. Die N-terminale Rel-homology domain (RHD) ist allen Mitgliedern der NF- κ B-Familie gemeinsam und vermittelt o.g. Dimerisierung, Assoziation mit den inhibitor of kappa B (I κ B) Proteinen und Bindung an spezielle DNA-Sequenzen, die so genannten κ B-Bindungsstellen (32).

Nur RelA, c-Rel und RelB können über ihre TAD die Transkription spezifischer Zielgene fördern. Dies geschieht über die Rekrutierung von Koaktivatoren und Entfernen von Repressoren. p50 und p52 hingegen scheinen eher als transkriptionelle Repressoren zu dienen.

In ruhenden Zellen sind die NF- κ B-Dimere im Zytoplasma an I κ B Proteine gebunden und damit inaktiviert. Die Aktivierung von NF- κ B wird v.a. über zwei Signalwege vermittelt, den klassischen oder kanonischen Signalweg und den alternativen. Stimulation des Antigenrezeptors führt zur Aktivierung des klassischen Signalweges. Hierbei phosphorylieren I κ B Kinasen (IKK) die I κ B Proteine, was zu deren Abbau im Proteasom führt. Die freien NF- κ B Dimere können in den Zellkern translozieren und zur Transkription ihrer Zielgene führen (95, 105). Heterodimere aus p50, RelA und c-Rel werden v.a. aktiviert. Der Komplex aus den IKKs besteht aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NF- κ B essential modulator/NEMO). Der alternative Signalweg kann über bestimmte Mitglieder der tumor necrosis family (TNF) aktiviert werden und führt zur Ikk α -induzierten Prozessierung von p100 zu 52. RelB-haltige Komplexe werden freigesetzt (39).

1.3 T-Zell-Rezeptor-vermittelte NF- κ B-Aktivierung

Der Antigenrezeptor von T-Zellen wird über die Interaktion mit MHC/Peptid-Komplexen stimuliert. Dies ermöglicht die Rekrutierung der Kinase p56^{Lck} an den TCR/CD3-Komplex und führt dadurch zur Phosphorylierung des ITAM der ζ Kette. Zap-70 bindet an das ITAM und phosphoryliert daraufhin weitere Adaptormoleküle, die der konsekutiven Signaltransduktion dienen. Dazu gehören auch linker for activation of T cells (LAT), Src homology 2 domain containing leukocyte protein of 76 kD (SLP76) und Vav. Phosphoryliertes LAT formt mit SLP76, Vav und growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) Signalkomplexe, die weitere Effektorenzyme rekrutieren und aktivieren, u.a. die small guanine nucleotide triphosphatases (GTPases), rat sarcoma virus oncogene (Ras) und Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac), Phosphoinositide 3 Kinase (PI3K), die tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma (Tec) family kinase, Interleukin-2 inducible T-cell kinase (Itk) und die Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1). Verschiedene Transkriptionsfaktoren wie activator protein 1 (AP1), nuclear factor of activated T-cells (NF-AT) oder NF- κ B können von hier ausgehend aktiviert werden (17,49,65,91). Optimale Aktivierung von IKK und NF- κ B wird allerdings über die CD3/CD28- Kostimulation erreicht. Sie induziert die Formation eines größeren, aus mehreren Komponenten bestehenden Komplexes an der Kontaktstelle zwischen T-Zelle und APC. Dieser wird auch supramolecular activation complex (SMAC) oder immunologische Synapse (IS) genannt. Diese Kontaktregion der T-Zelle ist reich an Mikrodomänen, welche hohe Konzentrationen an Cholesterin und Glycosphingolipiden enthalten und als „lipid raft“ bezeichnet werden. Einige Signalmoleküle wie LAT und Ras sind konstitutiv mit den lipid rafts assoziiert, während z.B. Proteinkinase C θ (PKC θ), Zap70, Vav, SLP76 und Ikk β nach CD3/CD28 Kostimulation erst rekrutiert werden müssen (12,72). Aktivierte PLC γ 1 hydrolysiert Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP2) in Inositol-3,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). IP3 mobilisiert Calcium aus intrazellulären Speichern. Zusammen mit DAG führt dies zur Aktivierung von PKC. Unter den multiplen Isoformen der Proteinkinase C, die nach CD3/CD28-Kostimulation aktiviert werden, wird nur die calciumunabhängige PKC θ in die immunologische Synapse rekrutiert (66). Aktiviertes PKC θ phosphoryliert das Adaptorprotein Caspase recruitment domain (Card) membrane associated guanylate kinase (Carma1). Humanes Carma1 enthält 1147 Aminosäuren und eine N-terminale Caspase recruitment domain, gefolgt von einer coiled-coil domain (CC), einer PSD95/Dlg/ZO-1 Homologous (PDZ) Domäne, einer SH3 Domäne und einer C-terminal guanylate kinase-like (GUK) Domäne (30). Die Anordnung PDZ-SH3-GUK ist typisch für MAGUK (membrane-associated guanylate kinase)-Proteine. Diese spielen eine

wichtige Rolle in der Regulierung der Schnittstelle zwischen Membrankomponenten und cytoskelettalen Proteinen. Carma1 ist konstitutiv mit der cytoplasmatischen Membran assoziiert und wird nach CD3/CD28 Kostimulation in die immunologische Synapse rekrutiert. Aktiviertes Carma1 kann mit weiteren Carma1-Molekülen oligomerisieren und daraufhin mit nachgeschalteten Signalproteinen interagieren. So werden B-cell lymphoma 10 (Bcl10) und die Paracaspase mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 (Malt1) rekrutiert und bilden zusammen mit Carma1 lipid raft-assoziierte Signalosomen. Bcl10 ist ein Adaptorprotein, das eine N-terminale CARD Domäne und eine C-terminale Ser/Thr-reiche Domäne besitzt. Bcl10 kann an verschiedene NF- κ B Signalmoleküle binden. Am Besten ist die o.g. Interaktion mit Malt1 (61,106) und Carma1 (29,108) untersucht. So interagieren Bcl10 und Carma1 über ihre Card-Domänen, während Bcl10 und Malt1 über aa 106-120 des Bcl10 Proteins miteinander in Verbindung stehen.

Der Carma1/Bcl10/Malt1 Komplex rekrutiert und aktiviert IKK, was über die Phosphorylierung von inhibitorischen I κ B Proteinen zur Aktivierung von NF- κ B führt (6,100).

1.4 Antigenrezeptor-vermittelte NF- κ B-Aktivierung in Thymozyten

Bereits bekannte Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wiesen darauf hin, dass eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Thymozyten über Stimulation des TCR und prae-TCR erreicht werden kann (87,107).

Aktuelle Daten zeigen nun, dass diese NF- κ B-Aktivierung in Thymozyten von Bcl10 und Malt1 abhängig ist (46). Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung einer gestörten T-Zell-Entwicklung in den Thymi von *Bcl10*^{-/-} Mäusen (93). Sie weisen eine erhöhte Anzahl doppelt negativer (CD4⁻/CD8⁻) Thymozyten, eine erhöhte Apoptoserate CD25- und CD44-negativer T-Zellen, sowie eine verminderte Anzahl doppelt positiver (CD4⁺/CD8⁺) T-Zellen auf (93).

1.5 Entwicklung und Selektion der T-Zellen im Thymus

Die T-Lymphozyten von Säugern entwickeln sich aus pluripotenten Vorläuferzellen, die ihren Ursprung in den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks haben. Im Thymus erfolgt die Reifung und Differenzierung der Progenitorzellen zu funktionstüchtigen T-Lymphozyten. Die einzelnen Entwicklungsschritte sind durch unterschiedliche Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle CD4, CD8, CD44 und CD25 gekennzeichnet. Beim Eintritt in die kortikomedulläre Junktionszone des Thymus

exprimieren die pro-T-Zellen weder CD4 noch CD8 und werden deshalb als „doppelt negativ“ (DN) bezeichnet. Auf ihrem Weg zum Cortex proliferieren sie stark und durchlaufen drei Entwicklungsstufen. Diese werden aufgrund unterschiedlicher CD44- und CD25-Ausprägung auf der Zelloberfläche als DN1 (CD44⁺/CD25⁻ Zellen), DN2 (CD44⁺/CD25⁺) und DN3 (CD44⁻/CD25⁺) bezeichnet. Im Stadium DN4 wird CD25 vermindert exprimiert, die Zelle proliferiert stark und wird durch Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 zur „doppelt positiven“ (DP) Zelle (80,111).

Differenzierung, Proliferation und Überleben läuft im pro-T-Zell-Stadium unabhängig vom TCR ab. Während z.B. der Notch-Rezeptor essentiell zur Entwicklung in Richtung T-Lymphozyt beiträgt (84), sichern u.a. der Interleukin (Il) 7-Rezeptor und der stem cell factor (SCF)-Rezeptor das Überleben der Vorläuferzellen. Die hierfür benötigten Liganden und Wachstumsfaktoren werden von den Epithelzellen des Thymus bereitgestellt (50). In der DN3-Phase kommt es schließlich zum Proliferationsstopp und zur Rekombination derjenigen Gene, die für die β -, γ - und δ -Kette des T-Zell-Rezeptors kodieren. Zu diesem Zeitpunkt entscheidet sich, ob sich die T-Vorläuferzelle in Richtung einer α : β - oder einer γ : δ -Zelle weiterentwickelt (62). Erfolgt als erstes Ereignis die suffiziente Rekombination der V(D)J-Segmente der β -Kette, kann ein prae-TCR aus rearrangierter β -Kette, vorläufiger α -Kette (pV) und dem Oberflächenmolekül CD3 exprimiert werden und die Entwicklung in Richtung α : β -Zelle laufen. Darauf folgt die Ausbildung der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 und der Thymozyt wird als „doppelt positiv“ bezeichnet. Da die erfolgreiche Bildung der β -Kette Grundlage für dieses Ereignis ist, wird dieser Schritt auch als „ β -Selektion“ bezeichnet (90).

Signale über den α : β -TCR führen zur Rekombination des Genlokus der α -Kette. Da dessen V- und J-Segmente mehrfach neu angeordnet werden können, steigt die Wahrscheinlichkeit, einen funktionstüchtigen reifen TCR zu exprimieren. Nur dieser kann effizient mit den MHC/Peptid-Komplexen der Stromazellen des Thymus interagieren. Es werden relativ seltene körpereigene Peptide präsentiert, die der Thymozyt suffizient, aber mit nur geringer Affinität erkennen muss. Die vermittelten Signale führen zur Repression von RAG (rearrangement activating gene) und sind für das weitere Überleben des Thymozyten sowie dessen Migration in die Medulla zur endgültigen Differenzierung in eine reife T-Zelle notwendig (88). Es findet somit ein Auswahlprozess unter den T-Vorläuferzellen statt. Nur die Zellen werden „positiv selektiert“, die einen intakten reifen TCR tragen. Der Rest geht durch Neglect in Apoptose. Geht der Thymozyt eine suffiziente Verbindung mit einem MHC I-Molekül ein, so wird das Oberflächenmolekül CD4 herunterreguliert und die Zelle entwickelt sich zu einer „einfach positiven“ (SP) CD8⁺ zytotoxischen T-Zelle. Erfolgt die Interaktion mit einem MHC II-Komplex, so

entsteht eine CD4⁺ T-Effektorzelle. Die CD4⁺ Zellen werden u.a. unterteilt in Th1 (T helper cell) Zellen, die in der zellulären Immunantwort eine Rolle spielen, und Th2 Zellen, die für die humorale Immunantwort entscheidend sind. In der Peripherie reagiert der reife T-Lymphozyt auf die Präsentation derjenigen fremden Peptide, die in ihrer Struktur dem bereits im Thymus erkannten, körpereigenen Peptid ähneln. Autoreaktive T-Zellen sollen den Thymus nicht verlassen. Der hierfür benötigte Auswahlprozess wird als „Negative Selektion“ bezeichnet. Es werden diejenigen DP oder SP T-Zellen eliminiert, deren TCR mit zu starker Affinität an die angebotenen Komplexe aus MHC und körpereigenem Peptid bindet. Sowohl Positive als auch Negative Selektion werden also durch die Interaktion der gleichen Partner vermittelt. Die dahinter stehenden Mechanismen sind nicht hinreichend genug aufgeklärt. Es konnten jedoch einige Signaltransduktionsmoleküle identifiziert werden, die eine gewisse Rolle zu spielen scheinen (71,90,96,101). So zeigen Studien, dass das Src-Kinase-Protein Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) in die Positive Selektion involviert ist (78). Auch die Syk-Kinase Zap-70 (73) und LAT (55), die in der Signalkaskade auf Lck folgen, werden für eine ungestörte Positive Selektion benötigt. Gerade die erfolgreiche Weiterleitung des TCR-vermittelten Signals über die nachgeschalteten Moleküle Grb2-related adaptor downstream of Shc (Gad), Grb2 und PLC γ scheint für die Positive Selektion entscheidend zu sein (109). Über die Regulation der RAG Genexpression nimmt auch die Helix-loop-helix (HLH) Familie von Transkriptionsfaktoren am Auswahlprozess teil (83). Ebenso scheint dies für den Transkriptionsfaktor Schnurri-2 (Shn-2) zu gelten, der an der Signalweiterleitung über die tumor growth factor (TGF) β -Superfamilie beteiligt ist (104). Im Rahmen der Negativen Selektion scheint paradoxerweise ein Großteil derselben Signalwege aktiv zu sein. Da jedoch der MHC/Peptid-Komplex mit stärkerer Affinität bindet, ist auch das weitergeleitete Signal von größerer Intensität. Somit sind z.B. anders geartete Phosphorylierungen nachgeschalteter Moleküle und damit Aktivierung weiterer Signalwege möglich. Auch scheint das Signal nur über einen kürzeren Zeitraum anzudauern. Kostimulation über weitere Rezeptoren (z.B. CD28 oder CD40) ist wohl zudem notwendig (101).

Ein Transkriptionsfaktor, der sowohl in der Positiven als auch Negativen Selektion eine Rolle zu spielen scheint, ist NF- κ B.

1.6 Die Bedeutung von NF- κ B für die Positive und Negative Selektion der T-Zellen im Thymus

Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen lassen vermuten, dass NF- κ B für die Selektion von T-Zellen im Thymus eine zentrale Rolle spielt (8,41,42,68,76,87,107).

So wurde u.a. anhand von *in vitro*-Untersuchungen mit einem I κ B α -Super-Inhibitor-Protein eine Bedeutung von NF- κ B in der Positiven Selektion von CD4⁺ T-Zellen (76) und mittels transgener Inhibition der NF- κ B-Aktivierung eine Bedeutung für die Positive Selektion CD8⁺ Zellen postuliert (42).

Auch konnte gezeigt werden, dass NF- κ B u.a. die Thymozyten während des DN3-Stadiums vor Apoptose schützt. Eine fehlende Aktivierung der Zellen über diesen Transkriptionsfaktor korreliert mit Negativer Selektion. Passend dazu wird während dieses Selektionsprozesses I κ BNS, ein Inhibitor von NF- κ B, hochreguliert (2,26).

Diese bisher durchgeführten Untersuchungen sind jedoch uneinheitlich, z.T. widersprüchlich und basieren auf einer generellen Inhibition des Transkriptionsfaktors *in vitro* oder *in vivo*.

1.7 B-Zell-Rezeptor-vermittelte NF- κ B-Aktivierung

Interaktion zwischen Antigen und BCR führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Lyn, einer Tyrosinkinase der Src Familie. Lyn phosphoryliert die ITAMs von I κ α und I κ β , die im aktivierten Zustand PI3 Kinase und die Proteintyrosinkinasen Syk und Bruton's tyrosine kinase (Btk) rekrutieren (43,79). Diese wiederum phosphorylieren Adaptorproteine wie B-cell linker (Blk) und B-lymphocyte adaptor molecule of 32 kD (Bam32), die PLC γ 2 in den Signalkomplex einbinden (69). Über Bildung von IP3, DAG und dem damit assoziierten Calciumeinstrom gelingt die Aktivierung von PKC β . Analog zu den Prozessen in T-Zellen erfolgt über die Bildung des Carma1/Bcl10/Malt1-Komplexes die Rekrutierung der IKKs in die lipid rafts und ihre Aktivierung. Die anschließende Phosphorylierung der Serinreste von I κ B α und I κ B β führt zu ihrer Polyubiquitin-vermittelten Degradation im Proteasom und zur Freisetzung der bis dahin gebundenen NF- κ B-Dimere. Diese können nun in den Nukleus wandern und über die Bindung an spezifische DNA-Motive die Expression verschiedener Zielgene regulieren (33,58,75).

1.8 Die Rolle von NF- κ B in der Genese von Non-Hodgkin-Lymphomen

In der Entstehung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) besitzen molekulare Aberrationen eine große Bedeutung.

Diese betreffen auch Mitglieder von NF- κ B-aktivierenden Signalwegen. Deregulation des Transkriptionsfaktors ist die Folge. Eine konstitutiv erhöhte Expression von NF- κ B-Zielgenen konnte so u.a. im MALT-Lymphom und dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) vom aktivierten B-Zell-Typ (ABC) nachgewiesen werden (45). In MALT-Lymphomen führt die Translokation des *BCL10* Gens (t(1;14)(q22;q32)) bzw. des *MALT1* Gens (t(14;18)(q32;q21)) auf das Gen der schweren Ig-Kette zur konstitutiven NF- κ B-Expression. In ABC DLBCL-Zellen führt Inhibition von verschiedenen NF- κ B Untereinheiten zum Absterben der Zellen *in vitro* (22). Der exakte Mechanismus der NF- κ B-Deregulation ist hierbei jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

Auch der Entstehung des Burkitt-Lymphoms (BL), einem reifen B-NHL, liegt eine Translokation zugrunde. Durch genetische Aberrationen gerät das Onkogen *c-Myc* (member of the immediate-early gene family) von Chromosom 8 unter die Kontrolle der Verstärkerregion des IgH-Gens auf Chromosom 14, des IgL κ -Gens (leichte Immunglobulinkette κ) auf Chromosom 2 oder des IgL λ -Gens (leichte Immunglobulinkette λ) auf Chromosom 22 und wird überexprimiert. In 80% der BL kann die Translokation t(8;14) nachgewiesen werden, in den verbleibenden 20% die Translokationen t(2;8)(p12;q24) oder t(8;22)(q24;q11) (7). Das Unveränderte der *c-MYC*-Allele wird gar nicht oder nur gering, das translozierte *c-MYC* Gen hingegen stark exprimiert. Typischerweise erfolgt dies durch eine erhöhte Transkription über den Promoter P1, der in der physiologischen Situation nur eine untergeordnete Rolle spielt (63,110). Überexpression von *c-MYC* führt zu Veränderungen in Zellzyklus, Apoptoseverhalten, Wachstum, Differenzierung, Metabolismus und Adhäsion der betroffenen Zellen (11,40).

Eine Interaktion zwischen physiologischem und translozierten *c-MYC* mit NF- κ B wurde in einer Reihe von Arbeiten gezeigt. Im murinen *c-Myc*-Gen konnten zwei Bindungsstellen für NF- κ B gefunden werden: das -1101 bis -1091 Basenpaare (bp) oberhalb des P1-Promotors gelegene „upstream regulatory element“ (URE) (25) und das im Exon1 gelegene „internal regulatory element“ (IRE) (52). Bindung des Transkriptionsfaktors führt zur Expression des *c-Myc* Gens (59,60). Die Aktivierung der humanen Pendanten durch die NF- κ B Untereinheit RelA wird auch beschrieben (54). Nach Translokation des *c-MYC* Gens auf den Ig-Locus wird *c-MYC* durch die Promotor- und Verstärkerelemente des Ig-Gens aktiviert. In t(8;14)-positiven BL ist dies z.B. die IgH (schwere Immunglobulinkette)

3'-Verstärkerregion, die aus vier DNase I-hypersensitive sites (HS 1,2,3 und 4) besteht. Anhand von Vektoranalysen konnte eine starke Aktivierung sowohl der murinen als auch des humanen HS4 durch NF- κ B nachgewiesen werden (48,97). Auch die humane HS3 der Verstärkerregion des IgL λ -Genes wird von NF- κ B reguliert (18). Über Stimulation des κ -Verstärkers des IgL κ -Genes trägt NF- κ B entscheidend zur Aktivierung des P1-Promoters, und damit zur Transkription des *c-MYC* Gens bei (110).

1.9 Problemstellung

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein zentraler Regulator von Proliferation, Überleben und Differenzierung in T- und B-Lymphozyten (95).

Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen lassen vermuten, dass NF- κ B für die Positive und Negative Selektion der T-Zellen im Thymus eine zentrale Rolle spielt (8,41,42,68,76,87,107). Die Ergebnisse dieser bisher durchgeführten Untersuchungen sind jedoch uneinheitlich und z.T. widersprüchlich. Auch erfolgte in den bisherigen Modellen nur eine unselektive Hemmung von NF- κ B z.B. durch I κ B α -Super-Inhibitor-Proteine, dominant negative IKKs oder transgene Inhibition der NF- κ B-Aktivierung (42,68,76,87). Bisher blieb daher unklar, welche der Signalwege auf NF- κ B für das Selektionsgeschehen entscheidend sind. Da der Selektionsprozess ohne Expression eines T-Zell-Rezeptors nicht stattfinden kann, war es das primäre Ziel dieser Dissertation, spezifisch die Bedeutung der T-Zell-Rezeptor-vermittelten NF- κ B Aktivierung für die Positive und Negative Selektion der T-Zellen im Thymus zu untersuchen.

NF- κ B spielt jedoch nicht nur eine Rolle für die Koordination der physiologischen Immunantwort. Deregulation dieses Transkriptionsfaktors trägt auch zur Pathogenese verschiedener Lymphomentitäten bei (45). So betrifft eine Reihe von genetischen Aberrationen in humanen NHL auch Mitglieder von NF- κ B-aktivierenden Signalkaskaden. BCR-vermittelte Signale spielen ebenfalls in der pathologischen Situation des B-Zell-Lymphoms eine entscheidende Rolle. Gerade der Liganden-unabhängige Signalweg scheint mit seiner fragilen Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Faktoren von Bedeutung zu sein (16).

Das weitere Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung der Antigenrezeptor-vermittelten NF- κ B-Aktivierung für die Entstehung eines reifen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Standardgeräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	BioRad, München
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Nunc GmbH&Co, Wiesbaden
Digitalwaage	Kern&Sohn GmbH, Tübingen
Durchflusszytometer (FACScalibur)	BD, Heidelberg
Entwickler Hyperprocessor	Protec, Oberstenfeld
Geltrockner Modell 583	Bio Rad, München
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Laufkammer SUBCELL® GT	BioRad, München
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Magnetrührgerät	Ika GmbH&Co, Staufen
Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Reichert, New York, USA
Phospho Imager	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Phosphor Screen	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
PCR-Thermocycler	Bio Rad, München
Rollmischer	CAT, Staufen
SDS Elektrophoresekammer	Bio Rad, München
Sterile Werkbank	Holten, Gydevang, Dänemark
Holten Lamin Air1.8	
Spectrophotometer ND-1000	Peqlab, Erlangen
Stromgenerator Powerpack	Bio Rad, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Scientific Industries, New York, USA
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad	Memmert, Schwabach

2.1.2 Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid/Bisacrylamid, 30%	Bio-Rad, München
Acrylamid, linear	Ambion, Austin, USA
Agarose	Cambrex, Baltimore MD, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua ad iniectabilia	Delta Select, Pfulingen
Aqua Spüllösung	Delta Select, Pfulingen
Bromochloropropan	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA, Fraktion V	BioLabs, Ipswich MA, USA
Calciumionophor	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Carboxyfluorescein-Diacetat-	Molecular Probes, Leiden

Succinimidylester	
Cyclohexamid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix 25mM	Bioline, Luckenwalde
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 0,7mg/ml	Eurobio, Les Ulis, Frankreich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykoldiamintetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Forene	Abott GmbH&Co. KG, Wiesbaden
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
2-Mecaptoethanol, 50µM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
OVA-Peptid (323-339)	Gen Script Corp., Piscataway NJ, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Phorbolmyristatsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Phosphat buffered saline (PBS), 10x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

2.1.3 Standardlösungen und Puffer

Binding buffer für NF-κB (4-fach)	5mM HEPES (ph7,9) 50mM KCl 0,5mM DTT 10 Vol-% Glycerol in Aqua dest.
Digestion Solution Master Mix (aus : Wizard SC Genomic DNA Purification System)	200µl Nuclei Lysis Solution 50µl 0,5M EDTA (ph8,0) 20µl Proteinase K 20mg/ml 5µl RNase Solution 4mg/ml
DNA-Probenpuffer	50 Vol.-% Glycerol

Material und Methoden

Einfriermedium	0,05 Vol-% Bromphenolblau in TAE (1-fach) 20 Vol-% DMSO 20 Vol-% FCS/FFP in RPMI/IDMM
Enhancer Solution P (5-fach) FACS-Puffer	Peqlab, Erlangen 0,9 Vol-% Azid 3,18 Vol-% FCS in PBS (1-fach)
Detection Reagent1, Peroxide Solution Detection Reagent2, Laufpuffer (10x)	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA 30,2g Tris 144g Glycin 10 Vol-% SDS ad 1000ml Aqua dest.
Luminol Enhancer Solution Lumigen™ TMA-6, Solution A und B PBS (10-fach)	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA 1,37M NaCl 27mM KCl 81mM Na ₂ HPO ₄ 15mM KH ₂ PO ₄ in Aqua dest.
PCR-Puffer (10-fach) Probenpuffer (2-fach)	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA 12,5ml 0,5M Tris/Hcl,ph6,8 10g Glycerin 20ml 10% SDS 5mg Bromphenolblau ad 50ml Aqua dest.
Puffer A	10mM HEPES (pH 7,9) 10mM KCl 0,1mM EDTA 0,1mM EGTA 1mM DTT 1mM PMSF 1 Tablette Complete Mini, EDTA free, gelöst in 1ml H ₂ O/10ml Puffer in Aqua dest.
Puffer C	20mM HEPES (pH 7,9) 0,4M NaCl 1mM EDTA 1mM EGTA 1mM DTT 1mM PMSF 1 Tablette Complete Mini, EDTA free, gelöst in 1ml H ₂ O/10ml Puffer in Aqua dest.
Reaktionspuffer (10-fach) Red Cell Lysis Buffer Saponinpuffer	Peqlab, Erlangen eBioscience, San Diego, USA 0,5% Saponin 5% FCS 0,02% Azid

TAE-Puffer (10-fach)	10mM HEPES in PBS 0,4M Tris Base 1,1% Essigsäure 2% 0,5M EDTA (ph8) in Aqua dest.
Transfer Buffer (semidry)	480mM Tris 390mM Glycin 3,15ml 10% SDS ad 1000ml Aqua dest.
TRI Reagent	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
TBS (10-fach)	24g Tris Base 80g NaCl ad 1000ml aqua dest. (ph 7.4)
TBST-Milch (5%)	0,025% Tween 20 5% Milchpulver in aqua dest.

2.1.4 Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze

CA46	humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie
EL-4-Zellen	humane T-Lymphom-Zelllinie
OCILy10	humane DLBCL-Zelllinie

Die Zelllinie CA46 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig bezogen.

Die Zelllinien EL-4 und OCILy10 wurden uns freundlicherweise vom Ontario Cancer Institute, Toronto zur Verfügung gestellt.

IMDM Medium	1 Vol-% Glutamin (200mM) 1 Vol-% Penicillin/Streptomcin (100u/ml) 0,1 Vol-% β -Mercaptoethanol (50mM) 1000 IE Heparin/500ml Medium in IMDM
-------------	--

RPMI 1640 Medium	1 Vol-% Glutamin (200mM) 1 Vol-% Penicillin/Streptomcin (100u/ml) 0,1 Vol-% β -Mercaptoethanol (50mM) in RPMI 1640
------------------	---

Fresh Frozen Plasma (FFP)	Bayrisches Rotes Kreuz, Wiesentheid
Fetal Bovine Serum (FCS) mit Endotoxin/ LPS-Anteil <0,2EU	Perbio, Bonn
L-Glutamin, 200mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Liquemin N 25000	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung 100 units/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium, L-Glutamine Gibco™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.5 Antikörper, Enzyme und Inhibitoren

anti-mouse B220, APC-konjugiert	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse CD3, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse CD4, APC-konjugiert	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CD4, PE-konjugiert	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CD8, APC-konjugiert	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CD8, PE-Cy5 konjugiert	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse IgD, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse IgG1(A85-1), FITC-konjugiert	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse IgM, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse V α 2, Biotin-Cy5 konjugiert	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse V β 5.10, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin, PE-Cy5-konjugiert	eBioscience, San Diego, USA
7-AAD, Viability Staining Solution	eBioscience, San Diego, USA
anti- β -Aktin, polyklonal, Hase IgG	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
anti-HRP, polyklonal, Hase IgG	Cell Signaling Technologies, Danvers MA, USA
anti-IgG1 k Isotype control	eBioscience, San Diego, USA
anti-I κ B α , polyklonal, Maus IgG	Cell Signaling Technologies, Danvers MA, USA
anti-NF κ B p50 (NLS), polyklonal, Ziege IgG	Santa Cruz, Heidelberg
anti-NF κ B p65 (C-20), polyklonal, Ziege IgG	Santa Cruz, Heidelberg
anti-mouse CD3	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CD28	eBioscience, San Diego, USA
rabbit anti-Syrian hamster IgG	Jackson Immuno Research, Soham, UK
dyna beads pan B (B220)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Complete Mini, EDTA free (protease inhibitor cocktail tablets)	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase 5u/ μ l	Peqlab, Erlangen
Taq-DNA-Polymerase 5u/ μ l	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
c-MYC Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
Helenalin	Calbiochem, Darmstadt

2.1.6 Oligonukleotide

Name	Sequenz
β -Aktin Vorwärts-Primer	5'-GCA TTG CTG ACA GGA TGC AG-3'
β -Aktin Rückwärts-Primer	5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA TC-3'
<i>Bcl10</i> -Wildtyp-Primer	5'-TTG GCT CTC TGC TCT CCT CAC T-3'
<i>Bcl10</i> -neo-Primer	5'-GGG TGG GAT TAG ATA AAT GCC TGC TC-3'
CD95L Vorwärts-Primer	5'-CTT GGG CTC CTC CAG GGT CAG T-3'

CD95L Rückwärts-Primer	5`-TCT CCT CCA TTA GCA CCA GAT CC-3`
c- <i>Myc</i> -I1-Primer	5`-TGT CCA AAG GGG GTG AAA GGG TGC TC-3`
c- <i>Myc</i> -E2-Primer	5`-CTG CTG GTG GTG GGC GGT GTC TC-3`
flanking primer	5`-CGC TCT GAG GAC TGT GGG ACT G-3`
Malt1-Wildtyp-Primer	5`- TGT GTG GAT GAG CTA TCT CCT CTG AGC-3`
Malt1-neo-Primer	5`- GGG TGG GAT TAG ATA AAT GCC TGC TC TC-3`
NF-κB Sense	5`-ATC AGG GAC TTT CCG CTG GGG ACT TTC CG-3`
NF-κB Antisense	5`-CGG AAA GTC CCC AGC GGA AAG TCC CTG AT-3`
NF-γ Sense	5`-AGA CCG TAC GTG ATT CGT TAA TCT CTT-3`
NF-γ Antisense	5`-AAG AGA TTA ACC AATCAC GTA CGG TCT-3`

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

Die Oligonukleotide für die semiquantitative RT-PCR wurden von Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen.

2.1.7 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

100 bp DNS	Peqlab, Erlangen
Molekulargewichtsmarker	
PageRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Prestained Protein Ladder	

2.1.8 Molekularbiologische Kitsysteme

Wizard SC Genomic DNA	Promega, Mannheim
Purification System	
SuperScript™ Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Neolab, Heidelberg
Falcon 50ml Röhrchen	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Falcon Zellsieb (40µM, 100µ)	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier	Whatman®, Schleicher&Schuell, Dassel
Hyperfilm	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
Kryoröhrchen 2ml	Hartenstein, Würzburg
MicroSpin™G-25 Column	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
PCR 8-er Röhrchen	Peske GmbH, Dortmund
Pipettenspitzen	Beckton-Dickinson, Heidelberg
5ml, 10ml, 25ml, 50ml	
Pipettenspitzen gestopft	Fisher Scientific, Schwerte
(10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	
Pipettenspitzen ungestopft	Hartenstein, Würzburg
(10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	
Zellkulturflasche, 25cm ² , 75cm ²	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten 15 cm ²	TPP, Trasadingen
Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen
(96-well, 24-well, 12-well, 6-well)	
Zellkulturröhrchen 15ml, 50ml	TPP, Trasadingen

2.1.10 Verwendete Software

FlowJo Software
Microsoft Excel
SPSS

Tree Star Inc., Ashland OR
Microsoft, Redmond
SPSS Inc., Chicago

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung, Zucht und Untersuchung der Mäuse

Die verwendeten *Bcl10*-defizienten, *Malt1*-defizienten, OT-2-transgenen und Wildtypmäuse besaßen einen B6/129J gemischten Hintergrund. Die E λ -*myc*-transgenen Mäuse trugen einen C57BL/6N (B6) gemischten Hintergrund.

Bcl10- und *Malt1*-defiziente Mäuse waren wie beschrieben generiert (93,94) und in der Zucht der Arbeitsgruppe Ruland vorhanden. Die OT-2 transgenen Mäuse wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Brocker, Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt.

Die E λ -*myc*-transgenen Mäuse wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Georg Bornkamm, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik der GSF München, zur Verfügung gestellt.

OT-2 TCR transgene Mäuse wurden mit Mäusen mit *Bcl10*^{-/-} oder *Malt1*^{-/-} Hintergrund verpaart. Hieraus entstanden OT-2 TCR⁺ *Bcl10*^{-/-} oder OT-2 TCR⁺ *Malt1*^{-/-} Tiere. Des Weiteren wurden E λ -*myc*-transgene Mäuse in einen *Bcl10*^{-/-} Hintergrund gekreuzt.

Die Genotypierung erfolgte für *Bcl10*, *Malt1* und E λ -*myc* über eine jeweils spezifische Polymerasekettenreaktion. Der transgene OT-2 TCR wurde über Detektion seiner charakteristischen Ketten V α 2 und V β 5.1/5.2 im Durchflusszytometer nachgewiesen.

E λ -*myc*-transgene Mäuse entwickeln im Laufe eines Jahres - frühestens nach ca. einem Monat - Burkitt-ähnliche, reife B-Zell Lymphome. Um die Entstehung eines Lymphoms so rasch wie möglich zu bemerken, wurden die Mäuse zweimal wöchentlich auf Lymphknotenschwellung, reduzierten Allgemeinzustand und Hinweise auf vermehrtes Kratzverhalten untersucht. Traten zwischen diesen Untersuchungsintervallen Auffälligkeiten, wie z.B. verändertes Fressverhalten auf, wurden die Tiere vorzeitig untersucht.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Präparation und Kultur primärer muriner Zellen

Zur Inkulturnahme primärer muriner Zellen wurde RPMI 1640 Medium mit 5% FFP (fresh frozen plasma) verwendet. Während der Kulturhaltung wurde mit RPMI 1640 Medium mit 10% FCS (fetal calf serum) gearbeitet.

An einer Sterilarbeitsbank wurden die Mäuse mit Sezierbesteck möglichst keimfrei geöffnet und die gewünschten Zellen entnommen. Lymphom, Thymus oder Lymphknoten wurden bis zur weiteren Verwendung in 15ml-Röhrchen bei 4 °C aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Zellen vereinzelt, mit Trypanblau gefärbt und der Anteil der lebenden Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Die murinen NHL-Zellen wurden auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ /ml verdünnt. Zur Evaluation optimaler Wachstumsbedingungen wurden die Zellen auf 96-, 24-, 12- und 6-Loch-Platten, sowie 10cm Schalen ausgesät. Je nach Plattentyp wurde ein Volumen von 150µl, 500µl, 1,5ml, 2ml und 10ml ausgebracht.

2.2.2.2 Kultur humaner Zelllinien

Zur Inkulturnahme und Kultur der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) EL-4 wurde das RPMI 1640 Medium mit 5% FCS verwendet, für die CA46-Zellen RPMI 1640 Medium mit 10% FCS. OCILy10-Zellen wurden in IMDM Medium mit 20% FFP kultiviert.

Zunächst wurden die Zellen auf 6-Loch-Platten ausgebracht und sukzessive auf 10cm Platten, 20ml Flaschen und 50ml Flaschen übertragen. Mediumwechsel wurde dreimal wöchentlich durchgeführt. Von allen Zelllinien wurden Teilproben entnommen und eingefroren. Dazu wurden $2 \cdot 5 \cdot 10^6$ Zellen abgenommen, abzentrifugiert und in 500µl eiskaltem Medium aufgenommen. Kryoröhrchen waren zu diesem Zeitpunkt bereits mit 500µl kaltem Einfriermedium befüllt und auf Eis gestellt. Nach Zugabe der Zellen wurden sie über Nacht bei -80° gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.2.2.3 Apoptosemessung durch Trypanblaufärbung

Um den Anteil toter Zellen in der jeweiligen Kultur zu bestimmen, wurden 10µl der Zellsuspension in einem 1:2-Gemisch unter einem Phasenkontrastmikroskop mittels einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Da das negativ geladene Trypanblau nur die geschädigte Zellmembran durchdringen kann, konnten lebende und tote/absterbende Zellen anhand der Färbung differenziert werden.

2.2.3 Stimulations- und Inhibitionsexperimente

2.2.3.1 Depletion von B-Zellen aus der peripheren Lymphozytenpopulation

Um vorwiegend T-Zellen zu stimulieren, wurden die B-Zellen aus der extrahierten peripheren Lymphozytenpopulation depletiert. Dies geschah über supramagnetische Polymerpartikel, die den pan B-Zell-Marker B220 erkennen. Pro Organ wurden zur

Aufreinigung 100µl der Partikellösung eingesetzt. Die Bindung erfolgte in RPMI 1640 mit 1% FCS während zwei 30-minütiger Inkubationsschritte bei 4°C auf einem Rollator. Die Separation der gebundenen B-Zellen erfolgte im magnetischen Feld. Es wurde eine T-Zell-Reinheit von durchschnittlich 90-95% erreicht.

2.2.3.2 Stimulationsexperimente

Peptid-spezifische Apoptose OT-2 TCR transgener Thymozyten wurde *in vitro* durch 24-stündige Inkubation mit Antigen-präsentierenden EL-4-Zellen ausgelöst, die mit Ovalbumin (OVA)-Peptid beladen worden waren. Der transgene TCR erkennt das Peptidepitop 323-339 des Ovalbumins, welches mit MHC II-Molekülen koexprimiert wird. Die EL-4-Zellen wurden in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ /ml auf eine 96-Loch-Platte mit 50µl pro Loch ausgebracht und bei 37°C und 5%CO₂ für 2h vorinkubiert. OVA-Peptid wurde in Endkonzentrationen von 0,3mM bis 0,003µM zugegeben. Die Mischungen wurden bei 37°C und 5%CO₂ für 2h inkubiert.

Nach Präparation der Thymozyten wurden diese in einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ /ml auf die OVA-präsentierenden EL-4-Zellen gegeben und bei 37°C und 5%CO₂ für 24h inkubiert.

Zum Nachweis von IκBα Degradation in unreifen OT-2 TCR T-Zellen nach Stimulation wurden periphere T-Zellen in einer Konzentration von $3,33 \cdot 10^6$ /ml mit 0,3mM OVA-Peptid und $5 \cdot 10^6$ /ml EL-4 Zellen/ml in einer 24-Loch-Platte bei 37°C und 5%CO₂ stimuliert. Cyclohexamid wurde in einer Endkonzentration von 5µg/ml zugegeben, um eine Proteinneusynthese zu verhindern.

Murine Thymozyten wurden per Durchflusszytomter in SP und DP T-Zellen aufgetrennt. Nach einem Waschschrift mit RPMI Medium wurden die T-Zellen ausgezählt und jeweils $3 \cdot 10^6$ SP-Zellen, bzw. $8 \cdot 10^6$ DP-Zellen in 250µl Medium resuspendiert. Im gleichen Volumen wurde der Stimulus PMA/Iono (Phorbolmyristatsäure/Calciumionophor) für 0min, 5min oder 30min so zugegeben, dass eine Endkonzentration von 100µM PMA und 100µM Iono erreicht wurde. Die Stimulation erfolgte bei 37°C im Wasserbad. PMA ist ein Phorbolster, der aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu DAG PKC-Isoformen aktivieren kann. Iono führt als Ionophor durch Induktion des Ca²⁺-Influxes zu einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und ähnelt somit in seiner Wirkung IP3.

Um die Aktivierbarkeit der murinen, transgenen T-Zellen nachzuweisen, wurden u.a. Proliferationsexperimente durchgeführt. Zur Auslösung von Proliferationssignalen wurden die extrahierten reifen, peripheren T-Lymphozyten in einer Konzentration von $3,33 \cdot 10^6$ /ml

mit löslichem Antikörper gegen CD3 und CD28 in einer Endkonzentration von 10µg/ml, bzw. 2µg/ml in einer 24-Loch-Platte bei 37°C und 5%CO₂ für 48h und 72h stimuliert.

Auch sollte die Aktivierbarkeit dieser Zellen *in vitro* über die Expression des Fas7 associated cell surface antigen (Fas)-Liganden nachgewiesen werden. Die dazu notwendige Stimulation erfolgte mit peripheren T-Lymphozyten einer Konzentration von 2·10⁶/ml mit Platten-gebundenem anti-CD3 und anti-CD28 in einer Endkonzentration von 8µg/ml, bzw. 2,5µg/ml in einer 6-Loch-Platte bei 37°C und 5%CO₂ für 24h und 72h. Als Primärantikörper wurde IgG anti-Hamster in einer Konzentration von 10µg/ml verwendet.

2.2.3.3 Inhibitionsexperimente

Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und in verschiedenen Konzentrationen gelagert.

Pro Ansatz wurden 2,5·10⁵ Zellen aus den laufenden Zellkulturen entnommen, auf ein Volumen von 100µl gebracht und auf ein Loch einer 96-Loch-Platte ausgelegt. Verdünnungsreihen zeigten, dass die höchste Sensitivität auf die Inhibitoren bei CA46-Zellen nach Verminderung der FCS-Menge im Medium auf ¼, bei den DLBCL auf ½ erreicht werden konnte. Die Inhibitoren wurden in einem Volumen von 2,5µl zugegeben. DMSO-Endkonzentrationen von 1% wurden nicht überschritten.

Die Zellen wurden anschließend für 6h, 24h oder 48h bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 DNS-Extraktion

Murine DNS wurde aus einem 0,5cm langen Stück Mausschwanz mit dem Wizard SC Genomic DNA Purification System von Promega, Mannheim gemäß den Anweisungen des Herstellers gewonnen.

Zur Freisetzung der DNS und zur Elimination von Proteinen und RNS wurde der Schwanz mit 275µl Digestion Solution Master Mix über Nacht bei 55°C inkubiert. Die Aufreinigung der gewonnenen DNS erfolgte über ein Säulensystem bei Raumtemperatur. Dazu wurde die DNS auf das Wizard SV Minicolumn Assembly gegeben und viermal mit Wizard SV Wash Solution gewaschen. Die an die Säule gebundene DNS wurde durch die Zugabe von 250µl Nuclease-Free Water gelöst.

2.2.4.2 RNS-Extraktion

Nach Ernte der Zellen wurden jeweils 1·10⁶ Lymphozyten in 200µl TRI Reagent aufgenommen und 5min bei Raumtemperatur lysiert. 40µl Bromchlorpropan wurde pro

$1 \cdot 10^6$ Zellen zugegeben und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 15min bei 4 °C und 12000-facher g wurde die obere wässrige Phase abgenommen und die RNA durch Inkubation für 10min auf Eis mit 100µl eiskaltem Isopropanol pro Probe und 0,5µl linearem Acrylamid/ $1 \cdot 10^6$ Lymphozyten präzipitiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 12min bei 4 °C und 12000-facher g wurde der entstehende RNS-Niederschlag einmal mit 75% Ethanol gewaschen und für 10min luftgetrocknet. Nach Resuspension in 10µl RNase-freiem Wasser konnten der RNS-Gehalt der Probe und ihre Reinheit über optische Dichtemessung bestimmt werden.

2.2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um *Bcl10*, *Malt1* und *c-Myc* im Genom der Mäuse nachzuweisen, wurde die murine DNS mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden 2µl aufgereinigte DNS in ein PCR-Röhrchen vorgelegt, und 10,25µl aqua ad iniectabilia, 5µl enhancer solution P, 2µl 10x Reaktionspuffer, 2,5µl dNTP-Mix 25mM, 1µl flanking primer, 1µl neo-primer/ 1µl wildtyp primer und 0,25µl Taq-DNS-Polymerase 5u/µl zugegeben. Zur Amplifikation wurde ein Thermozykler verwendet.

Für die *Bcl10*-PCR und *Malt1*-PCR wurde die DNS zur initialen Denaturierung für 4min auf 92°C erhitzt. In 35 Zyklen wurde die DNS dann denaturiert, die Primer angelagert und der neue Strang verlängert. Jeweils innerhalb 1min erfolgte die Denaturierungsphase bei einer Temperatur von 92°C, die Anlagerungsphase bei 68°C und die Elongationsphase bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben für 10 min auf 72°C aufgeheizt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf 4°C abgekühlt.

Für die *c-Myc*-PCR wurde die DNS initial für 4 min auf 94°C erhitzt, und in 35 Zyklen amplifiziert. Die Denaturierungsphase erfolgte während 45 sec bei 94°C, die Anlagerungsphase während 30 sec bei 61°C und die Elongationsphase während 90 sec bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben für 10 min auf 71°C aufgeheizt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf 4°C abgekühlt.

RNS wurde über eine semiquantitative RT-PCR in DNS umgeschrieben. Hierfür wurde das reverse Transkriptase System SuperScript™ II Reverse Transcriptase von Invitrogen GmbH, Karlsruhe gemäß Anleitung benutzt. 1µg RNS wurde mit 5µl einer zufälligen Primermischung (random primer) und 12µl RNase freiem DEPC-Wasser für 10 min bei 70°C und 300-facher g inkubiert. Nach Zugabe von 4µl 5-fach Erststrangpuffer, 2µl 0,1M DTT und 1µl 25mM dNTP wurde die Mischung für 10 min bei 25°C und anschließend bei 42°C für 2 min bei 300-facher g im Heizschüttelblock inkubiert. Nach Zugabe von 1µl

reverse Transkriptase erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 42°C für 50 min und bei 70 °C für 15 min bei jeweils 300-facher g.

Mit den gewonnenen DNA-Kopien konnte das Expressionsniveau verschiedener Gene durch eine quantitative PCR bestimmt werden. Hierzu wurde 1µl aufgereinigte DNS in ein PCR-Röhrchen vorgelegt, und 36,6µl aqua ad iniectabilia, 5µl 10-fach Puffer, 5µl dNTP-Mix 25mM, 1µl Vorwärts-Primer, 1µl Rückwärts-Primer und 0,4µl Taq-DNS-Polymerase 5u/µl zugegeben. Zur Amplifikation wurde ein Thermozykler verwendet.

Für die *β-Aktin* PCR wurde die DNS zur initialen Denaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt. In 30 Zyklen wurde die DNS amplifiziert. Die Denaturierungsphase erfolgte während 30 sec bei 95°C, die Anlagerungsphase während 30 sec bei 59°C und die Elongationsphase während 60 sec bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben für 10 min auf 72°C aufgeheizt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf 4°C abgekühlt.

Für die PCR des CD95-Liganden wurde die DNS zur initialen Denaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt. In 35 Zyklen wurde die DNS dann denaturiert, die Primer angelagert und der neue Strang verlängert. Die Denaturierungsphase erfolgte während 30 sec bei 95°C, die Anlagerungsphase während 30 sec bei 64°C und die Elongationsphase während 30 sec bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben für 10 min auf 72°C aufgeheizt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf 4°C abgekühlt.

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die in der PCR amplifizierte DNS wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurde ein 1% Agarosegel verwendet. Hierzu wurden 200ml 1xTAE mit 2gr Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen unter 55°C wurden 15µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Pro Geltasche wurden 18µl DNS und 2µl Lastfarbstoff geladen. Als Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet.

Nach Anlegen einer Spannung von 100 Volt wurden die DNS-Fragmente in ca. 90 min aufgetrennt.

Die erwartete *Bcl10*^{+/+} Bande besaß eine Größe von 560 Basenpaaren (bp), die *Bcl10*^{-/-} Bande 336 bp, die *Malt1*^{+/+} Bande 660bp, die *Malt1*^{-/-} Bande 400bp und die *c-Myc*-Bande 950 bp.

Die erwartete *β-Aktin* Bande besaß eine Größe von 150bp, die Bande des CD95-Liganden 611bp.

2.2.4.5 Herstellung nukleärer Zellysate

Die Extraktion der nukleären Proteine erfolgte jeweils aus $2 \cdot 10^7$ Zellen. Zur Darstellung der basalen Situation in den Zellen war keine Stimulation notwendig. Somit konnte die entsprechende Zellzahl direkt aus der Kultur entnommen, 1x mit PBS gewaschen und in 800µl hypoosmolaren Puffer A auf Eis für 15 min lysiert werden. Zur Lyse der Zellmembran wurden 50µl NP-40 10% zugegeben und das Lysat bei 4°C und mit 300 U/min für 5 min geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation bei 14000-facher g bei 4°C für 10 min wurde der Kern durch Inkubation mit 30µl hyperosmolarem Puffer C bei 4°C für 30 min dehydriert. Dies führte zur Lösung der Transkriptionsfaktoren aus dem Kern. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 14000-facher g bei 4°C für 10 min wurden Zellreste von den Transkriptionsfaktoren im Überstand abgetrennt, die in Teilmengen von 6µl in flüssigem Stickstoff konserviert wurden.

2.2.4.6 Herstellen radioaktiv-markierter Sonden

In der Bandshift-Analyse (EMSA) konnte der Transkriptionsfaktor NF-κB in den nukleären Lysaten nachgewiesen werden. Dazu wurde er an ein Stück ^{32}P markierte doppelsträngige Sonde gebunden, die das NF-κB-Bindungsmotif enthält.

Zur Markierung des DNS-Abschnittes wurden 2µl Sense-Oligonukleotide, 2µl T4 Kinase, 10µl 5xForward Reaction Buffer, 5µl ATP ^{32}P und 31µl H₂O für 1h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Abtrennung von ungebundenem ATP ^{32}P erfolgte über ein Säulensystem, das MicroSpin™G-25 Column. Um die markierte DNS doppelsträngig zu machen, wurden 2µl Antisense-Oligonukleotide zugesetzt und anschließend die Radioaktivität auf $1 \cdot 10^6$ counts per minute eingestellt.

2.2.4.7 Nachweis von DNS-Bindungsproteinen im Nukleus (EMSA)

Zur Bindung von NF-κB an die radioaktive Sonde wurde jeweils 6µl nukleärer Extrakt 30 min bei Raumtemperatur mit 5µl 4xBinding Buffer, 1µl Poly dIdC (1µg/ml), 0,1µl (0,1M) DTT, 2,9µl H₂O und 5µl Sonde inkubiert. Zur Trennung der Transkriptionsfaktoren vom restlichen nukleären Lysat verwendeten wir ein 5% Polyacrylgel aus 6,66ml Acrylamid 30%, 2,0ml 10xTBE, 30,85ml H₂O, 400µl 10% APS und 80µl TEMED. Pro Geltasche wurden 20µl Probe und 5µl 4-fach Lastfarbstoff eingesetzt. Als Laufpuffer wurde H₂O mit 0,5 Vol-% TBE verwendet. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 150V bis 200V eingesetzt. Das Gel wurde auf Gel-Blotting-Papier übertragen und in einem Gelrockner bei 80 °C für 2h getrocknet. Die Detektion des radioaktiv-markierten Transkriptionsfaktors

erfolgte über einen Leuchtschirm (Phospho Screen), der an einem Lesegerät (Phospho Imager) ausgewertet wurde.

2.2.4.8 Herstellung zytoplasmatischer Zelllysate

Die Extraktion der zytoplasmatischen Proteine erfolgte aus jeweils $5 \cdot 10^6$ Zellen. Zur Darstellung der basalen Situation in den Zellen war keine Stimulation notwendig.

Zellen, die vor der Proteinextraktion mit Hemmstoffen behandelt werden sollten, wurden in Medium mit einem Volumen von 250 μ l gelöst. Der Inhibitor wurde in gleichem Volumen gelöst zugegeben und das Gemisch bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Somit konnte die entsprechende Zellzahl direkt aus der Kultur entnommen, bei 4°C und 300-facher g für 5 min abzentrifugiert und der Zelleniederschlag in 1ml Stopp-Puffer resuspendiert werden. Zum Aufbrechen der Zellmembranen wurde nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000-facher g der entstehende Zelleniederschlag in flüssigem Stickstoff lysiert. Um die Lyse zu vervollständigen, wurde 50 μ l CHAPS-Puffer zugegeben und die Mischung für 20 min auf Eis inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000-facher g wurden die zytoplasmatischen Proteine vom Dendritus getrennt und im Überstand abgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate bei -20°C gelagert.

2.2.4.9 Bestimmung des Proteingehaltes mit der Bradford-Methode

Anlagerung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an ein Protein führt zur Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 (rot-braun) zu 595 (blau) nm. Die Zunahme der Absorption bei 595nm ist proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung. Die Extinktionsänderung des Bradford-Reagenzes wurde über ein ELISA-Lesegerät bestimmt. Jeweils 1 μ l der zu messenden Proben, bzw. der Kontrollverdünnungsreihe wurde auf 100 μ l des 1:5 verdünnten Bradford-Reagenzes gegeben, das bereits auf die 96-Loch-ELISA-Platte vorgelegt worden war. Zur Verdünnung wurde 1x PBS verwendet. Zur Erfassung der Daten wurde das Programm „Magellan“ benutzt, zur Auswertung der Daten das Programm „Excel“.

2.2.4.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der zytoplasmatischen Zelllysate in einzelne Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Zur Detektion der Proteine wurde ein 10%iges Trenngel verwendet, auf das ein Sammelgel geschichtet wurde. Das Trenngel setzte sich zusammen aus 4,1ml aqua bidestillata, 2,5ml 1,5M Tris/HCl ph 8,8, 3,3ml 30%

Acrylamid-Bisacrylamid, 100 μ l 10%SDS, 50 μ l 10%APS und 5 μ l TEMED. Das Sammelgel setzte sich zusammen aus 3ml aqua bidestillata, 1,2ml 0,5M Tris/HCl pH6,6, 0,7ml 30% Acrylamid-Bisacrylamid, 50 μ l 10%SDS, 25 μ l 10%APS und 5 μ l TEMED. Als Laufpuffer wurde 1x Laufpuffer benutzt. Die Geltaschen wurden mit max. 20 μ l beladen. Vor dem Auftragen der Proben wurden jeweils 50 μ l entnommen, mit 50 μ l 2x Probenpuffer gemischt und für 10 min auf 100° erhitzt. Zur Auftrennung der Proteine wurde für ca. 20 min eine Spannung von 90 Volt und anschließend von 120 Volt angelegt.

2.2.4.11 Immunoblot (Western Blot)

Die Detektion der Proteine I κ B α und β -Aktin erfolgte durch Immunoblot (Western Blot). Nach elektrophoretischer Auftrennung des zytoplasmatischen Zelllysates wurde dieses mittels hydrophober Wechselwirkungen auf eine Polyvinylidendifluoridmembran übertragen. Hierfür wurde das semidry-blotting-Verfahren verwendet. Die Membran wurde durch Methanol aktiviert, Membran und Filterpapier vor dem Transfer mit Transferpuffer getränkt. Der Transfer wurde bei 25 Volt durchgeführt. Das Gelingen des Transfers wurde durch Inkubation der Membran mit Ponceau-Reagenz nachgewiesen. Die Blockierung freier Bindungen erfolgte mit 5%iger TBST-Milch. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in 5%iger TBST-Milch bei 4°C über Nacht. Der primäre I κ B α -Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 und der primäre β -Aktin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Ungebundener Primärantikörper wurde durch Waschen der Membran bei Raumtemperatur mit 5%iger TBST-Milch entfernt. Als Sekundärantikörper wurde horseradish peroxidase (HRP)-gekoppeltes anti-rabbit IgG für I κ B α in einer Verdünnung von 1:2000, und für β -Aktin in einer Verdünnung von 1:10000 in 5%iger TBST-Milch verwendet. Die Inkubation der Membran erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen mit TBST entfernt werden. Für die Lumineszenz der Membran wurde Lumiglo in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Klassifizierung humaner und muriner Lymphozyten

Zur Charakterisierung muriner und humaner Lymphozyten wurden spezifische Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie/FACS (Fluorescence activated cell sorting) detektiert.

Der TCR OT-2-transgener Mäuse setzt sich aus der V α 2-Kette und der V β 5.1/5.2-Kette zusammen. Nach Elimination der Erythrozyten mit 1ml Lysepuffer pro Probe wurden die reifen T-Zellen aus dem peripherem Blut der zu genotypisierenden Mäusen mit 0,5 μ l Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem V β 5.1-Antikörper pro 1 \cdot 10⁶ Zellen, 1 μ l Phycoerythrin (PE)-konjugiertem CD4-Antikörper pro 1 \cdot 10⁶ Zellen, 0,5 μ l Biotin-Cyanine5-(Cy5)-konjugiertem V α 2-Antikörper pro 1 \cdot 10⁶ Zellen, 1 μ l Allophycocyanin (APC)-konjugiertem CD8-Antikörper pro 1 \cdot 10⁶ Zellen und 0,5 μ l Streptavidin pro 1 \cdot 10⁶ Zellen für 20 min bei 4°C. Färbung und Messung der Lymphozyten erfolgte in FACS-Puffer.

T-Zellen wurden über die Oberflächenmarker CD4 und CD8 detektiert. Der prozentuale Anteil der transgenen T-Lymphozyten wurde über das Expressionsniveau der Untereinheiten V α 2 und V β 5.1/5.2 bestimmt. Mit Thymozyten und reifen T-Zellen OT-2-transgener Mäuse wurden dieselben Messungen durchgeführt.

Die Lymphome E λ -myc⁺ Mäuse sind als reife B-Zell-Lymphome charakterisiert. Dieser Phänotyp wurde an den extrahierten Lymphomzellen über Färbung mit 0,5 μ l FITC-konjugiertem IgD-Antikörper pro 1 \cdot 10⁶ Zellen, 1 μ l PE-konjugiertem CD3-Antikörper pro 1 \cdot 10⁶ Zellen, 0,5 μ l Biotin-Cy5-konjugiertem IgM-Antikörper pro 1 \cdot 10⁶ Zellen, 1 μ l APC-konjugiertem B220-Antikörper pro 1 \cdot 10⁶ Zellen und 0,5 μ l Streptavidin pro 1 \cdot 10⁶ Zellen für 20 min bei 4°C nachgewiesen. Über Ausschluss des pan T-Zell-Markers CD3 und Nachweis des pan B-Zell-Markers B220 wurde der B-Zell-Nachweis geführt. Der Reifungsgrad der Zellen wurde über das Expressionsmuster der Oberflächenmarker IgM und IgD bestimmt. IgM lässt sich auf reifen und IgD auf unreifen B-Zellen nachweisen.

2.2.5.1.1 Proliferationsmessung

Die Teilungsrate reifer T-Zellen nach Stimulation wurde über Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) gemessen. Dieses bindet an cytoplasmatische Proteine, die an die Tochterzellen zu gleichen Teilen weitergegeben werden. Im Durchflusszytometer kann der CFSE-Gehalt der Zellen über FL-2 detektiert werden.

Gefärbt wurden die T-Zellen in einer Konzentration von 1 \cdot 10⁷/ml in RPMI 1640 für 10 min bei 37°C mit 2 μ M Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester, dem farblosen Ausgangsstoff des CFSE. Die Reaktion wurde mit eiskaltem RPMI 1640 Medium mit 5% FCS abgestoppt, und die Zellen nach einem Zentrifugationsschritt bei 300-facher g und 4°C im gewünschten Volumen resuspendiert und stimuliert.

Nach der Stimulation wurden jeweils 1 \cdot 10⁶ T-Zellen wie oben beschrieben mit 1 μ l APC-konjugierten Antikörper gegen CD4 und 0,5 μ l PE-Cy5-konjugierten CD8-Antikörper

gefärbt. Über Messung der CFSE-Verteilung in den Zellen konnten Rückschlüsse auf das Teilungsverhalten geschlossen werden.

2.2.5.1.2 Apoptosemessung

Die Apoptosemessung humaner Lymphozyten wurde über den Nachweis von 7-AAD mittels Durchflusszytometer durchgeführt. Nur bei der gestörten Membranpermeabilität der absterbenden/toten Zelle kann der Farbstoff 7-AAD eindringen und an die GC-Regionen des Chromatins binden. Die Färbung der Zellen erfolgte mit 10 μ l 7-AAD pro 1 \cdot 10⁶ Zellen für 20 min bei 4°C. Der prozentuale Anteil toter Zellen wurde sowohl über den Nachweis von 7-AAD bestimmt, als auch über typische Größe und Granulation im Forward-Side-Scatter.

2.2.5.1.3 Nachweis von intrazellulärer I κ B α -Degradation

Zum Nachweis seiner Degradation wurde I κ B α in stimulierten, unreifen T-Zellen intrazellulär angefärbt, und sein Gehalt im Durchflusszytometer gemessen. Nach extrazellulärer Färbung der gewünschten Oberflächenmarker wurden jeweils 1 \cdot 10⁶ T-Zellen mit 1ml PBS mit 2% Paraformaldehyd innerhalb von 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Lyse der Zellen erfolgte über Inkubation mit jeweils 1ml Saponinpuffer für 20 min bei Raumtemperatur, bevor 1 \cdot 10⁶ T-Lymphozyten mit 1 μ l I κ B α -Antikörper oder der entsprechenden Isotypkontrolle für weitere 20 min bei Raumtemperatur gefärbt wurden. Vom FITC-konjugierten Sekundäntikörper wurden 0,3 μ l pro Probe eingesetzt. Die Messung der Zellen erfolgte in PBS mit 2% FCS. Hierbei wurde der I κ B α -Gehalt der Zellen in einem Histogramm bestimmt, das nur die gewünschte T-Zellpopulation zeigte.

3 Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung der Antigenrezeptor-vermittelten NF- κ B-Aktivierung in der T-Zell-Selektion

NF- κ B ist ein zentraler Regulator des Immunsystems, durch den eine Vielzahl von Funktionen wie Reifung, Differenzierung, Aktivierung, Zellüberleben oder Proliferation in Lymphozyten gesteuert wird. Bcl10 und Malt1 sind essentielle Adaptorproteine in der Signalleitung zwischen TCR und NF- κ B in reifen und unreifen T-Zellen.

Die spezifische Rolle des Signalwegs vom TCR nach NF- κ B für die Selektion von T-Zellen im Thymus wurde im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Bei dem verwendeten Mausmodell handelt es sich um *Bcl10*^{-/-} defiziente α/β -TCR-transgene Mäuse. Der transgene OT2-TCR erkennt selektiv das Peptidpitop 323-339 des Ovalbumins. Dies ermöglicht eine spezifische Stimulation des Rezeptors durch OVA. Aufgrund der MHC-II Restriktion entwickeln sich die transgenen Thymozyten zu CD4 SP T-Zellen.

Der *Bcl10* Status der Mäuse wurde nach DNS-Extraktion aus einer Schwanzbiopsie bestimmt. Hierbei wurde die *Bcl10*-Defizienz durch Polymerasekettenreaktion nachgewiesen und mit Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Der Nachweis der Kettenbestandteile V α 2 und V β 5.1/5.2 des transgenen TCRs erfolgte über FACS-Analyse. Bevor die Bedeutung der TCR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung für die Positive und Negative Selektion im Thymus untersucht werden konnte, mussten erst einige grundlegende Voraussetzungen geprüft werden. Zunächst wurde gesichert, dass das Mausmodell der *Bcl10*-defizienten, OT-2 transgenen Maus valide für Untersuchungen der TCR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung ist (Abb. 1 und Abb. 2). Auch wurde von uns bestätigt, dass in dem verwendeten Modell im Rahmen der Zell-Zell-Interaktion von Thymozyten und Peptid-präsentierenden Stromazellen während des Selektionsprozesses in Richtung CD4⁺ Zelle im Thymus nur eine Bcl10/Malt1-vermittelte NF- κ B-Aktivierung möglich ist (Abb. 3). Es wurde des Weiteren im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl in doppelt als auch in einfach positiven Thymozyten die Bcl10/Malt1-Signalkaskade bei der TCR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung von zentraler Bedeutung ist (Abb. 4).

3.1.1 Fehlende NF- κ B-Aktivierung über den TCR durch *Bcl10*-Defizienz verhindert Proliferation und Aktivierung auch in OT-2 transgenen reifen T-Lymphozyten

Die zentrale Rolle TCR-vermittelter NF- κ B Aktivierung für Proliferation und Aktivierung reifer T-Zellen wurde von Ruland *et al.* gezeigt (93). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass diese Aussage auch im verwendeten Modell der OT-2 TCR transgenen Maus Gültigkeit besitzt.

Das Proliferationsverhalten der reifen transgenen T-Zellen wurde über Analyse der CFSE-Verteilung im FACS bestimmt. Hierzu wurden Lymphozyten aus den peripheren Lymphknoten der OT-2 positiven, *Bcl10*-defizienten Tiere extrahiert und *in vitro* mit CD3/CD28 stimuliert. Im Vergleich zu Wildtypzellen proliferieren die *Bcl10*^{-/-} Zellen nach 72h Stimulation kaum, das typische CFSE-Verteilungsmuster einer sich teilenden Zelle ist nicht erkennbar (Abb. 1).

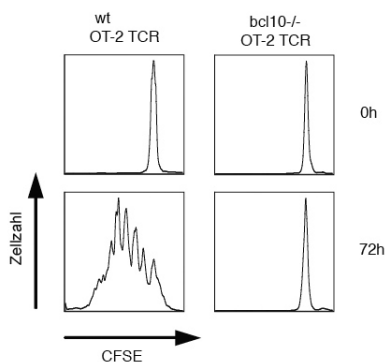


Abbildung 1: Reife transgene T-Zellen proliferieren nach CD3/CD28-Stimulation nur in Anwesenheit von *Bcl10*

Periphere, reife T-Lymphozyten *Bcl10*^{+/+} (erste Spalte) und *Bcl10*^{-/-} (zweite Spalte) OT-2 TCR transgener Mäuse wurden isoliert, mit CFSE gefärbt und in einer Konzentration von 10⁶/ml mit 10 μ g/ml CD3 und 2 μ g/ml CD28 stimuliert. Nach 0h und 72h wurde der CFSE-Gehalt der Zellen im FACS bestimmt. Während sich nach 72h in den transgenen Wildtypzellen die bekannte Verteilung des Farbstoffes nach Proliferationsgeschehen feststellen lässt, zeigen die *Bcl10*-defizienten Zellen das gleiche Färbemuster wie vor der Stimulation.

Zum anderen wurde über das RNA Transkript des Fas-Liganden (CD95-Ligand) die T-Zell-Aktivierung untersucht. Eine ungehemmte Stimulierbarkeit der reifen T-Zelle führt transkriptionell zur verstärkten Synthese des Fas-Liganden, einem Marker für Aktivierbarkeit. Verglichen wurde das Expressionsniveau des CD95-Liganden reifer Wildtypzellen mit dem von reifen *Bcl10*^{-/-} T-Zellen nach Stimulation über den TCR. Diese erfolgte mit 8 μ g/ml CD3 und 2,5 μ g/ml CD28. Nach 24h und 72h wurde aus den reifen T-Zellen die RNA gewonnen, in cDNS umgeschrieben und eine semiquantitative RT-PCR auf CD95-Ligand durchgeführt. Nach 24h gehen die reifen peripheren T-Zellen bereits in

Apoptose. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich für den Fas-Liganden allerdings in allen drei Genotypen nur geringe Expressionsniveaus finden. Nach 72h kann eine deutliche Expressionssteigerung des Fas-Liganden nach Aktivierung des TCRs über CD3 und CD28 in Wildtypzellen, nicht aber in *Bcl10*-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Sowohl das Proliferationsverhalten als auch die Aktivierbarkeit der *Bcl10*^{-/-} OT-2 TCR transgenen T-Zellen zeigen somit ein pathologisches Muster. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TCR-induzierte NF-κB-Aktivierung auch in OT-2 transgenen reifen T-Lymphozyten eine zentrale Bedeutung für Proliferation und Aktivierbarkeit hat (Abb. 2).

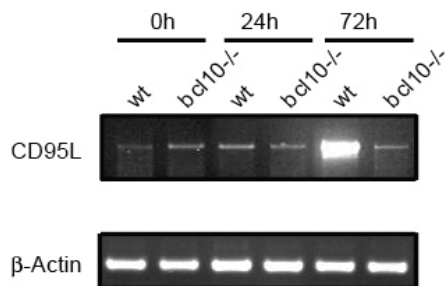


Abbildung 2: Aktivierung des CD95-Liganden in reifen T-Zellen durch TCR-Stimulation benötigt Bcl10

In der Gelelektrophorese zeigt als Amplifikat der semiquantitative rt-PCT nur der Wildtyp eine Hochregulation von CD95-Ligand nach Stimulation des TCR. Im Bcl10-defizienten Tier unterbleibt sie. Die Stimulation erfolgte mit reifen T-Lymphozyten in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ /ml für die angegebenen Zeitpunkte mit $8 \mu\text{g/ml}$ CD3 und $2,5 \mu\text{g/ml}$ CD28. Das rt-PCT Produkt von CD95L besitzt eine Größe von 611bp, das der Ladekontrolle β-Aktin 150 bp.

3.1.2 Bcl10/Malt1-vermittelte Signale sind für die NF-κB-Aktivierung in Thymozyten nach Zell-Zell-Interaktion entscheidend

Bcl10 und Malt1 sind essentielle Adaptorproteine in der Signalleitung zwischen TCR und NF-κB in reifen und unreifen T-Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch im Rahmen der Zell-Zell-Interaktion von Thymozyten und Peptid-präsentierenden Stromazellen im Thymus nur eine Bcl10/Malt1-vermittelte NF-κB-Aktivierung in den Thymozyten möglich ist.

Die Stimulation der extrahierten und aufgereinigten Thymozyten erfolgte für 4h mit der APC-Zelllinie EL-4, die vorher mit 0,3mM OVA-Peptid gepulst worden war. Zur Messung der spezifischen IκBα-Degradation in Thymozyten ohne Verfälschung durch die Stromazellen wurde der IκBα-Gehalt der Zellen im intrazellulären FACS bestimmt. Über die charakteristische Vα2-Kette des transgenen TCRs konnten die OT-2 TCR⁺ T-Lymphozyten von den APC unterschieden werden. Die Neusynthese von IκBα wurde über Zusatz von Cyclohexamid verhindert. Der IκBα-Gehalt ist im Histogramm angezeigt. In

den transgenen Wildtypzellen zeigt sich die gesetzmäßige Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, die in $Bcl10^{-/-}$ OT-2 TCR⁺ Thymozyten fehlt. Die Kurven der Isotyp-gefärbten Zellen sind vor und nach Stimulation identisch. Es findet dementsprechend keine Bcl10/Malt1-unabhängige NF- κ B-Aktivierung nach Kontakt mit OVA-präsentierenden APC in den defizienten Mäusen statt. In Wildtypzellen degradiert $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nicht (Abb. 3).

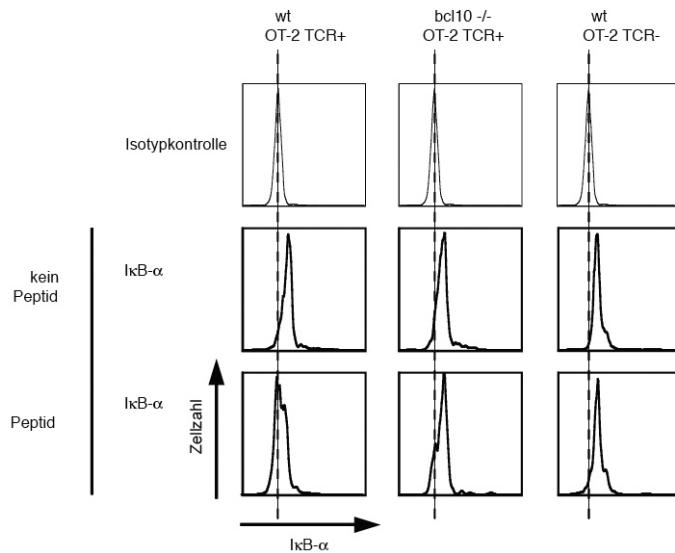


Abbildung 3: $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Degradation in OT-2 TCR transgenen Thymozyten nach Präsentation von OVA ist Bcl10-abhängig

Thymozyten transgener Wildtypmäuse (erste Spalte), transgener $Bcl10$ -defizienter Tiere (zweite Spalte) und von Wildtypmäusen (dritte Spalte) wurden isoliert und mit EL-4 APC kokultiviert, die vorher nicht (Zeile 2) oder mit 0,3mM (Zeile 3) OVA-Peptid gepulst worden waren. Die Zellen wurden nach 4h geerntet und mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und $\text{V}\alpha 2$ extrazellulär und gegen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ oder die Isotypkontrolle intrazellulär gefärbt. Der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Gehalt der unstimulierten und stimulierten Thymozyten ist im Histogramm aufgetragen.

3.1.3 Die Rolle von Bcl10/Malt1 in der TCR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung in DP und SP Thymozyten

Der Reifungsprozess der Thymozyten verläuft im Wesentlichen in vier verschiedenen Stadien, die anhand der Expression der Oberflächenproteine CD4, CD8, CD25 und CD44 definiert werden können. Der Selektionsprozess findet an doppelt positiven Thymozyten durch die Interaktion mit Peptid-präsentierenden Stromazellen statt.

Daten unserer Arbeitsgruppe belegen, dass TCR-vermittelte NF- κ B Aktivierung auch in unreifen T-Zellen über die Signalproteine Bcl10 und Malt1 läuft (46). Die vorliegende Arbeit konnte nun zeigen, dass auch in den DP und SP Thymozyten die Bcl10/Malt1-Signalkaskade bei der TCR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung von zentraler Bedeutung ist. Hierzu wurde getrennt in SP Thymozyten und DP Thymozyten $Bcl10^{-/-}$, bzw. $Malt1^{-/-}$ defizienter Mäuse die NF- κ B Aktivierung nach TCR-Stimulation durch Nachweis der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Degradation untersucht.

Die Trennung der extrahierten Thymozyten in die einzelnen Populationen erfolgte über das Durchflusszytometer. Das Verhalten der Thymozytensubpopulationen von Wildtypmäusen, *Bcl10*-defizienten-Mäusen und *Malt1*-defizienten Mäusen wurde nach Stimulation mit Phorbolmyristatsäure/Calciumionophor im Immunoblot untersucht.

Wie Abbildung 4 zeigt, erfolgt die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, also Aktivierung von NF- κB , sowohl für die SP als auch DP Thymozyten nur im Wildtyp in Anwesenheit von *Bcl10* und *Malt1*.

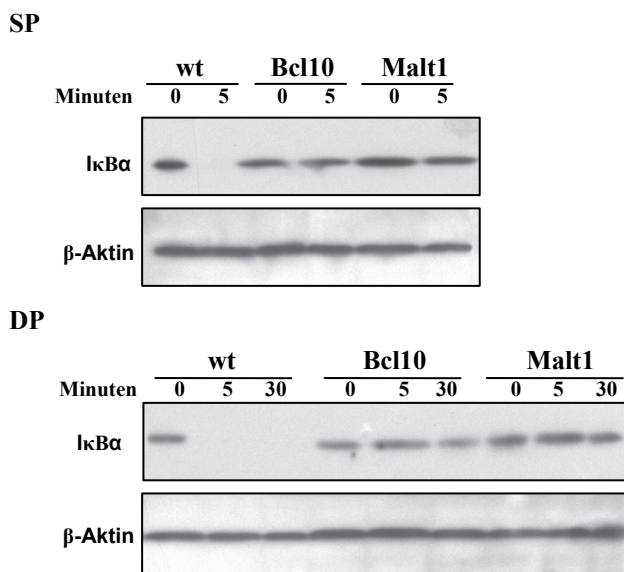


Abbildung 4: $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Degradation in T-Zell Subpopulationen des Thymus

Nach Aufreinigung der extrahierten Thymozyten und Trennung in SP-, bzw. DP-Zellen durch Durchflusszytometrie wurden die Untergruppen getrennt voneinander stimuliert. Die Stimulation der SP-Zellen erfolgte mit jeweils $3 \cdot 10^6$ Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit $100\mu\text{M}$ PMA und $100\mu\text{M}$ Iono. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ besitzt eine Größe von 40kDa. Als Ladekontrolle dient β -Aktin mit einer Größe von 41kDa. Nur in Anwesenheit von *Bcl10* und *Malt1* kann die gewünschte Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ stattfinden.

3.1.4 Normale Positive Selektion OT-2 TCR transgener T-Zellen in der Abwesenheit von *Bcl10 in vivo*

Die Bedeutung des *Bcl10*/*Malt1*-Signalweges für die Positive Selektion wurde an unreifen T-Zellen aus dem Thymus und reifen T-Zellen aus den peripheren Lymphknoten *Bcl10*-defizienter, OT-2 TCR transgener Mäuse untersucht. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte über ihre Oberflächenmarker CD4 und CD8, sowie über den Kettenbestandteil $\text{V}\beta$ 5.1/5.2 des transgenen TCR im FACS.

Hierbei zeigt sich überraschenderweise eine vergleichbare CD4/CD8-Verteilung in den Thymozyten transgener *Bcl10*^{-/-} Tieren und transgener Wildtypmäuse (Abb. 5a). Auch in Abwesenheit von *Bcl10* kann also eine normale Positive Selektion *in vivo* festgestellt

werden. Auch die *Bcl10*-defizienten Thymozyten entwickelten sich gemäß der MHC II-Restriktion ihres transgenen TCR primär zu SP CD4⁺ T-Zellen.

OT-2-transgene *Bcl10*-defiziente CD4⁺ T-Zellen wurden zudem in den peripheren Lymphknoten in normaler Anzahl und Häufigkeit gefunden (Abb. 5b).

Diese *in vivo* Untersuchung zeigt, dass *Bcl10*-defiziente T-Zellen, die den CD4-restringierten OT-2 TCR exprimieren sowohl auf der Stufe der SP Thymozyten, als auch auf der Stufe der reifen peripheren T-Lymphozyten vorhanden sind.

Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen also den Schluss zu, dass die TCR-vermittelte NF-κB-Aktivierung über Bcl10 für die Positive Selektion von CD4⁺ Thymozyten entbehrlich ist.

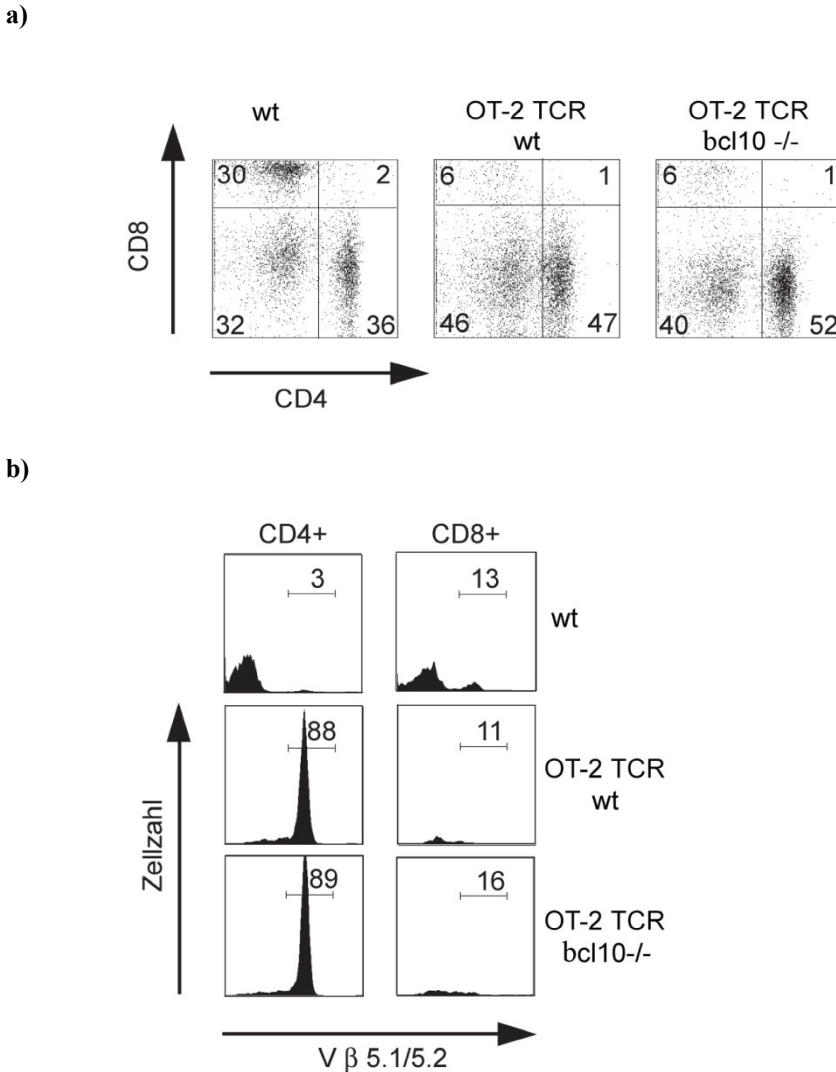


Abbildung 5: Immunphänotypisierung $Bcl10^{-/-}$ OT-2 TCR transgener Thymozyten und reifer T-Zellen

a) Ungestörte Positive Selektion OT-2 TCR transgener Thymozyten in SP CD4⁺ T-Zellen *in vivo*.

1·10⁶ Thymozyten wurden aus Wildtypmäusen (erste Spalte), Wildtyp OT-2 TCR⁺ (zweite Spalte) und $Bcl1^{-/-}$ OT-2 TCR⁺ (dritte Spalte) Mäusen gewonnen. Der prozentuale Anteil CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ und CD4⁻/CD8⁻-Zellen ist im entsprechenden Quadranten angegeben. Die Thymozytengesamtzahl betrug für die OT-2 TCR-negativen Wildtypmäuse 8,6^{wt}·2,9·10⁷ Zellen, für die OT-2-transgenen Wildtypmäuse 8,4^{wt}·2,1·10⁷ Zellen und für die $Bcl10$ -defizienten OT-2-transgenen Mäuse 5,9^{wt}·2,7·10⁷ Zellen. Die Prozentzahlen jeweils einer repräsentativen Maus sind im jeweiligen Quadranten angegeben.

b) Normale Häufigkeitsverteilung peripherer T-Zellen in den Lymphknoten $Bcl10^{-/-}$ OT-2 TCR Mäuse.

1·10⁶ Lymphozyten wurden aus den Lymphknoten von Wildtyp, OT-2 TCR⁺ Wildtyp und $Bcl10^{-/-}$ OT-2 TCR⁺ Mäusen gewonnen, mit Antikörper gegen CD4, CD8 und Vβ5.1/5.2 gefärbt und im FACS analysiert. Die Histogramme zeigen den Prozentsatz der Vβ5.1/5.2⁺ Zellen, in Abhängigkeit von der Koexpression der Oberflächenmarker CD4 und CD8. Beide Experimente wurden dreimal unabhängig unter gleichen Bedingungen durchgeführt, und zeigten jeweils vergleichbare Ergebnisse.

3.1.5 Peptid-spezifische klonale Deletion (Negative Selektion) unreifer Thymozyten *in vitro* ist Bcl10 unabhängig

Hochaffine Bindung an körpereigene Peptide, die im Kontext mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche von Thymusstromazellen präsentiert werden, leitet eine Peptid-spezifische klonale Deletion des spezifisch bindenden Thymozytenklons ein. Die Apoptoseeinleitung wird als Negative Selektion potentiell autoreaktiver Thymozyten beschrieben (81).

In vitro kann dieser Vorgang imitiert werden, wenn Antigen-präsentierende Zellen einem transgenen TCR seinen spezifischen Liganden zeigen. Eine spezifische Untersuchung des Vorganges wird somit möglich.

Die Abhängigkeit der Negativen Selektion von der Bcl10/Malt1-vermittelten NF- κ B-Aktivierung wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit an den Thymozyten *Bcl10*-defizienter, OT-2 TCR transgener Mäuse *in vitro* untersucht. Unreife T-Zellen wurden zusammen mit Antigen-präsentierenden Zellen der Zelllinie EL-4 kultiviert. Diese waren mit ansteigenden Konzentrationen des OVA-Peptids, das vom transgenen TCR erkannt werden kann, inkubiert worden.

24h später wurde in der FACS-Analyse der Anteil der toten, transgenen T-Zellen über die Abnahme des V β 5.1/5.2-positiven Signals bestimmt. Dafür wurden die Zellen mit Antikörper gegen V β 5.1/5.2, CD4 und CD8 gefärbt.

Mit ansteigender Peptidkonzentration kommt es zur Induktion einer spezifischen Apoptose der transgenen T-Zellen. Für *Bcl10*^{+/+}, *Bcl10*^{+/-} und *Bcl10*^{-/-} OT-2 TCR transgene Thymozyten kann ein vergleichbares Apoptoseverhalten beobachtet werden (Abb. 6).

Im Rahmen dieser *in vitro* Untersuchung findet auch in Abwesenheit von Bcl10-vermittelten Signalen vom TCR auf NF- κ B normale und ungehinderte Peptid-spezifische klonale Deletion CD4-restringierter Thymozyten statt. Diese Daten sprechen demgemäß gegen eine maßgebliche Rolle dieses Signalweges für die Negative Selektion von Thymozyten *in vitro*.

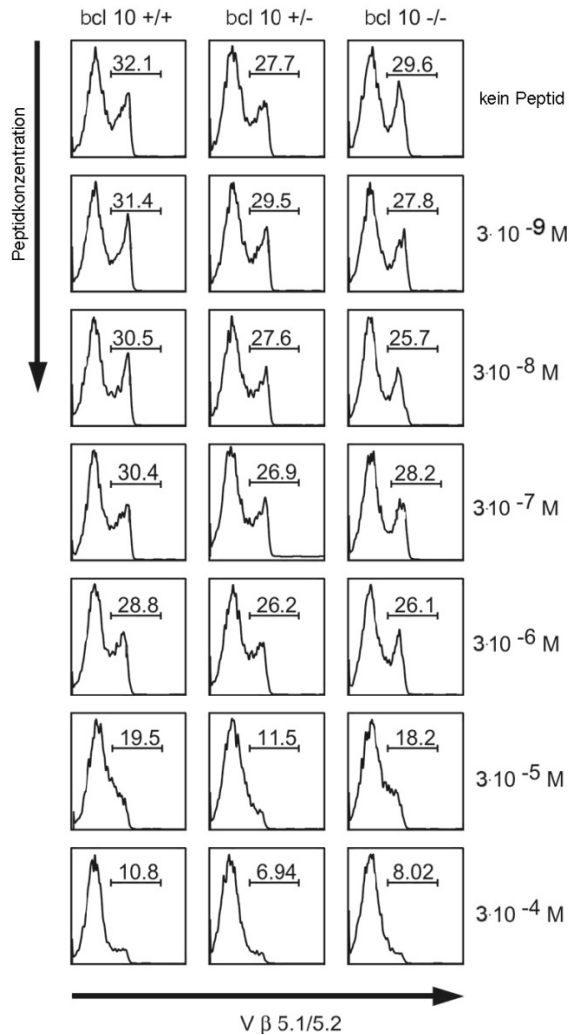


Abbildung 6: Peptid-spezifische Apoptose OT-2 TCR transgener DP-Thymozyten in Abwesenheit von Bcl10 *in vitro*

Reguläre klonale Deletion OT-2 TCR⁺ Thymozyten *in vitro*. Thymozyten *Bcl10*^{+/+} (erste Spalte), OT-2 TCR transgener *Bcl10*^{+/-} (zweite Spalte) und *Bcl10*^{-/-} (dritte Spalte) Mäuse wurden isoliert und mit EL-4 APC kokultiviert, die vorher mit den angegebenen Peptidkonzentrationen inkubiert worden waren. Der prozentuale Anteil der überlebenden OT-2 TCR transgenen Thymozyten ist in den Histogrammen gegen die verwendete Konzentration von OVA-Peptid aufgetragen. Das Experiment wurde dreimal unabhängig unter gleichen Bedingungen durchgeführt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.

3.2 Die Bedeutung der Antigenrezeptor-vermittelten NF-κB-Aktivierung in der Entstehung eines c-Myc getriebenen Lymphoms im Mausmodell

NF-κB steuert Proliferation, Überleben und Differenzierung in T- und B-Lymphozyten in entscheidendem Maße. Deregulierte NF-κB-Aktivierung ist verantwortlich für eine Vielzahl von lymphoiden Erkrankungen und deren Voranschreiten (45).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der BCR-vermittelten NF-κB-Aktivierung auf die Entstehung reifer B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome *in vivo* zu untersuchen.

Als Mausmodell dienten *Bcl10*^{-/-} Eλ-*myc* transgene Mäuse. Diese tragen ein humanes *MYC*-Gen, das unter der Kontrolle des humanen IgLλ-Locus steht. Sie entwickeln im Verlauf eines Jahres ein reifes, hochmalignes B-Zell-Lymphom, das histopathologisch und immunphänotypisch dem humanen Burkitt-Lymphom (BL) ähnelt. Oberflächenexpression von IgM und CD19 liegt vor, nicht jedoch von CD5 und CD23 (56). Da *Bcl10* v.a. für Proliferation und Überleben reifer B-Zellen eine Rolle spielt, jedoch weniger für die Differenzierung unreifer B-Lymphozyten, schien die Wahl der Eλ-*myc*-transgenen Maus zudem günstig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst *in vitro*-Untersuchungen an unstimulierten, humanen Burkitt-Lymphom-Zellen durchgeführt. Diese zeigten in den Vorversuchen im EMSA konstitutive NF-κB-Aktivität. Auch konnte in den Untersuchungen mit Inhibitoren der MYC-MAX-Interaktion und der NF-κB Untereinheit p65 der Einfluss von NF-κB für das Überleben dieser Zellen demonstriert werden. Als Kontrollzellen für die humane Burkitt-Zelllinie CA46 diente die ABC DLBCL-Zelllinie OCILy10.

Die, auf diesen Ergebnissen aufbauenden, *in vivo*-Versuche wurden an *Bcl10*^{-/-} Eλ-*myc*-transgenen Mäusen durchgeführt.

3.2.1 Die Abwesenheit von Bcl10 verhindert die Entstehung eines reifen c-Myc getriebenen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms im Mausmodell nicht

Der Einfluss der BCR-vermittelten NF-κB-Aktivierung auf die Lymphomentstehung reifer Non-Hodgkin-Lymphome wurde an *Bcl10*^{-/-} Eλ-*myc* transgenen Mäusen *in vivo* untersucht. Es wurden Eλ-*myc* transgene Mäuse in einen *Bcl10*^{-/-} Hintergrund gekreuzt und die Inzidenz der entstehenden Lymphome über einen Zeitraum von 300 Tagen beobachtet. Nach Feststellen einer Lymphommanifestation erfolgte dessen molekularbiologische Charakterisierung.

Der *c-Myc* und *Bcl10* Status der Mäuse wurde 3-4 Wochen nach Geburt und zum Zeitpunkt der Erkrankung, bzw. nach 300 Tagen mittels Polymerasekettenreaktion bestimmt.

Insgesamt wurden 74 Mäuse untersucht. 14 Tiere waren *Bcl10*^{+/+}, 44 *Bcl10*^{+/-} und 16 Mäuse *Bcl10*^{-/-}. In einem Zeitraum von 300 Tagen entwickelten 9 von 14 Wildtypmäusen (64,29%), 35 von 44 *Bcl10*^{+/-} Mäusen (79,55%) und 9 von 16 *Bcl10*^{-/-} Mäusen (56,25%) ein Burkitt-ähnliches Lymphom. Das mediane Überleben betrug für transgene *Bcl10*^{+/+} Tiere 218 Tage, für *Bcl10*^{+/-} 137 Tage und *Bcl10*^{-/-} 168 Tage. 50% der *Bcl10*^{+/+} Tiere waren bis Tag 205 gestorben, bis Tag 136 die Hälfte der *Bcl10*^{+/-} Tiere und bis Tag 126

50% der $Bcl10^{-/-}$ Mäuse. Nach 300 Tagen lebten noch 36% der $Bcl10^{+/+}$ Tiere und 21% der $Bcl10^{+/-}$, bzw. 43% der $Bcl10^{-/-}$ Mäuse (Abb. 7).

Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Überlebenskurven der verschiedenen Genotypen wurde der Logrank-Test verwendet. Zu dessen Berechnung wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt. Als Nullhypothese H_0 wurde postuliert, dass der Verlauf der Überlebenskurven bei den einzelnen Gruppen gleich sei.

Zunächst wurde der Logrank-Test auf alle drei Genotypen angewendet. Dabei ergibt sich ein χ^2 -Wert von 2,583. Dieser Wert wurde mit dem 0,95-Quantil der χ^2 -Verteilung mit zwei Freiheitsgraden verglichen, der lt. Vergleichstabelle 5,99 beträgt. Da $\chi^2 < \chi^2_{2;0.95}$ ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. H_0 kann nicht verworfen werden, bzw. nur mit einer unzureichenden Signifikanz von 27,5%.

Auch auf die Genotypen $Bcl10^{-/-}$ und $Bcl10^{+/-}$ einzeln angewendet ergibt sich mit dem Logrank-Test kein signifikanter Unterschied. Auch hier ist χ^2 mit 1,017 kleiner als der Vergleichswert, in diesem Fall 3,84 (0,95-Quantil der χ^2 -Verteilung mit einem Freiheitsgrad). H_0 könnte also nur mit einer unzureichenden Signifikanz von 31,3% verworfen werden.

Gerade auch die Überlebenskurven von $Bcl10^{-/-}$ und $Bcl10^{+/+}$ unterscheiden sich bei einem χ^2 -Wert von 0,009 (Vergleichswert 3,84) nicht signifikant (92,7%).

Der Vergleich von $Bcl10^{+/-}$ und $Bcl10^{+/+}$ ergibt einen χ^2 -Wert von 2,234. Die H_0 -Hypothese könnte nur mit einer unzureichenden Signifikanz von 13,5% verworfen werden. In weiterführenden Untersuchungen wurden die Genotypen $Bcl10^{+/+}$ und $Bcl10^{+/-}$ zu einer statistischen Gruppe zusammengefasst und mit $Bcl10^{-/-}$ verglichen. Auch hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Überleben der entsprechenden Tiere. So betrug der χ^2 -Wert 0,599 bei einem Vergleichswert von 3,84, Signifikanzniveau 43,9%.

Das Fehlen von $Bcl10$ und die damit verbundene Hemmung der NF- κ B-Aktivierung über den BCR verhindert oder vermindert in $E\lambda$ -*myc* transgenen Mäusen also nicht die Entstehung Burkitt-ähnlicher Lymphome. Auch das Auftreten der Erkrankung wird durch Unterbrechung der Signalkaskade nicht hinausgezögert (Abb. 7).

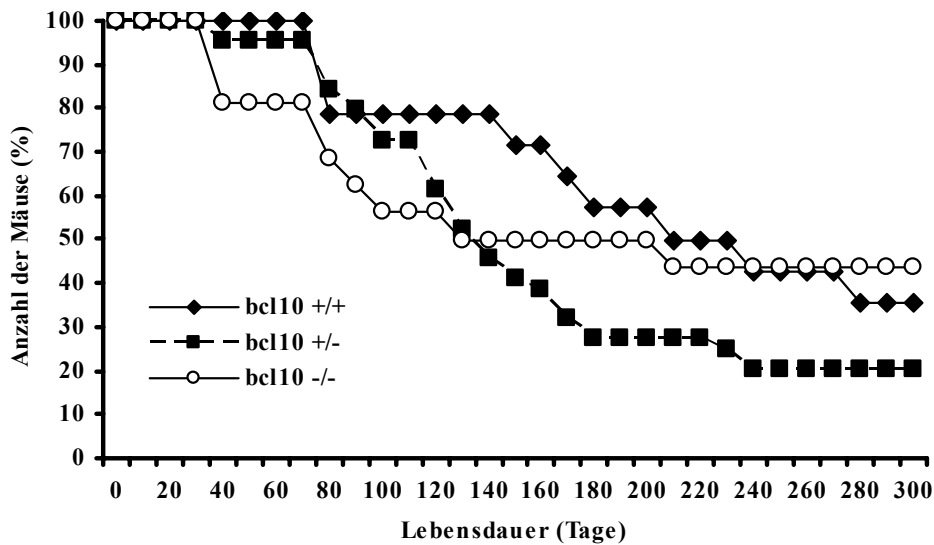


Abbildung 7: Lymphominzidenz in *c-Myc* transgenen Mäusen in Abwesenheit von *Bcl10*

Myc transgene Mäuse mit Wildtyp, *Bcl10*^{+/-} oder *Bcl10*^{-/-} Hintergrund wurden über einen Zeitraum von 300 Tagen beobachtet und die Lymphominzidenz und der damit verbundene Tod verzeichnet. Die Anzahl der *Eλ-myc*⁺ *Bcl10*^{-/-} Mäuse betrug n=16, der *c-Myc*⁺ *Bcl10*^{+/-} Tiere n=44 und der transgenen Wildtypmäusen n=14.

3.2.2 Fehlen BCR-vermittelter NF-κB-Aktivierung ändert den Phänotyp von reifen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen im Modell der *Eλ-myc* transgenen Maus nicht

Die vorliegende Arbeit zeigt zudem mittels Durchflusszytometer, dass das Fehlen von *Bcl10* auch den vorbeschriebenen Phänotyp der sich entwickelnden Lymphome nicht ändert.

Entscheidend in der FACS-Analyse war der Anteil an B220 positiven Zellen und der IgM Anteil. Es wurden die Tumore von 6 *Bcl10*^{+/+}, 10 *Bcl10*^{+/-} und 8 *Bcl10*^{-/-} Tieren verglichen. Zunächst wurden Median und Mittelwert des prozentualen Anteils B220 positiver, bzw. IgM positiver Tumorzellen untersucht. Diese waren für alle drei Genotypen vergleichbar. Zur weiteren Untersuchung statistisch signifikanter Unterschiede wurde der Students T-Test verwendet. Zu dessen Berechnung wurde das Programm MS Excel 2003 benutzt. Die Nullhypothese H_0 besagt bei dieser Untersuchung, dass sich die Phänotypen der drei Genotypen in Bezug auf B220 und IgM nicht unterscheiden. Sie kann selbst bei einem Vergleich von *Bcl10*^{+/+} und *Bcl10*^{-/-} nur mit einem unzureichenden Signifikanzniveau von 23,6% für B220 bzw. 63,7% für IgM abgelehnt werden. Es findet sich also auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Tieren mit unterschiedlichem *Bcl10*-Status (Tabelle 1a und b).

a)

Genotyp	B220 Median (%)	B220 Mittelwert (%)	B220 Stabw.	IgM Median (%)	IgM Mittelwert (%)	IgM Stabw.
<i>Bcl 10</i> ^{+/+}	89,85	89,18	4,15	83,05	80,8	14,1
<i>Bcl 10</i> ^{+/-}	90,2	89,14	6,46	84,45	80,55	11,3
<i>Bcl 10</i> ^{-/-}	83,2	84,85	7,17	79,4	76,67	16,56

b)

T-Test (p-Wert)	B220	IgM
<i>Bcl10</i> ^{+/+} versus <i>Bcl10</i> ^{+/-}	0,987	0,971
<i>Bcl10</i> ^{+/+} versus <i>Bcl10</i> ^{-/-}	0,236	0,637
<i>Bcl10</i> ^{+/-} versus <i>Bcl10</i> ^{-/-}	0,258	0,602

Tabelle 1: Statistische Analyse der Merkmalsausprägungen B220 und IgM auf Tumore transgener *Bcl10*^{+/+}, *Bcl10*^{+/-} und *Bcl10*^{-/-} Tiere

a) Ergebnis der Stichprobenuntersuchung von 6 Tumoren *Bcl10*^{+/+} Tiere, 10 Tumoren *Bcl10*^{+/-} Tiere und 8 Tumoren *Bcl10*^{-/-} Tiere

Median und Mittelwert der transgenen Tiere sind trotz unterschiedlichem *Bcl10*-Status der Tiere vergleichbar. So beträgt der Median der B220-Ausprägung für *Bcl10*^{+/+} 89,85%, für *Bcl10*^{+/-} 90,2% und für *Bcl10*^{-/-} 83,2%. Die dazu gehörigen Mittelwerte betragen 89,18%, 89,14% und 84,85%. Der Median der IgM-Ausprägung beträgt für *Bcl10*^{+/+} 83,05%, für *Bcl10*^{+/-} 84,45% und für *Bcl10*^{-/-} 79,4%. Die dazu gehörigen Mittelwerte betragen 80,8%, 80,55% und 76,67%.

b) Studentischer T-Test der obigen Stichprobenuntersuchung

Die Nullhypothese H_0 , die keinen Unterschied in der Ausprägung der Merkmale B220 und IgM postuliert, kann nur mit unzureichendem Signifikanzniveau verworfen werden. Dieses beträgt für B220 und den Vergleich *Bcl10*^{+/+} versus *Bcl10*^{+/-} 0,987, den Vergleich *Bcl10*^{+/+} versus *Bcl10*^{-/-} 0,236 und den Vergleich *Bcl10*^{+/-} und *Bcl10*^{-/-} 0,258. Für IgM beträgt es für den Vergleich *Bcl10*^{+/+} versus *Bcl10*^{+/-} 0,971, den Vergleich *Bcl10*^{+/+} versus *Bcl10*^{-/-} 0,637 und den Vergleich *Bcl10*^{+/-} und *Bcl10*^{-/-} 0,602.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Antigenrezeptor-vermittelten NF- κ B-Aktivierung für die Positive und Negative Selektion der T-Zellen im Thymus und für die Entstehung reifer B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome im *c-Myc* getriebenen Mausmodell untersucht. Die Bedeutung dieses zentralen Signalweges wurde also sowohl in physiologischer als auch pathologischer Situation betrachtet.

4.1 Reguläre Positive und Negative Selektion von Thymozyten in Abwesenheit von Bcl10

Positive und Negative Selektion sind entscheidende Ereignisse während der Differenzierung von T-Zellen im Thymus. Diese Auswahlprozesse stellen sicher, dass nur diejenigen Thymozyten in die Peripherie entlassen werden, die einen funktionstüchtigen, nicht-selbstreaktiven TCR auf ihrer Oberfläche tragen.

Zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B wohl eine zentrale Bedeutung für das Selektionsgeschehen besitzt (9,26,41,42,68,87,99). Im Rahmen dieser bisherigen Arbeiten erfolgte jedoch nur eine unspezifische Hemmung der NF- κ B-Aktivität, z.B. über artifizielle

I κ B-Superrepressoren. Die Bedeutung einzelner Signalwege wurde nicht aufgeschlüsselt. Neben veränderter NF- κ B Aktivierung über den TCR wurden auch Signale von einer Vielzahl von Oberflächenrezeptoren, wie z.B. CD30, Fas oder andere Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Superfamilie (20) unterbunden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun durch Untersuchungen an *Bcl10*-defizienten, OT-2 TCR transgenen Tieren spezifisch die Bedeutung der TCR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung für die Positive und Negative Selektion im CD4-restringierten Mausmodell untersucht.

Aufgrund der bisher bekannten Daten wurde ein gestörtes Selektionsgeschehen im untersuchten Tiermodell erwartet. Erstaunlicherweise zeigen jedoch die vorliegenden Daten der *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen eine ungestörte Positive und Negative Selektion in OT-2 TCR-transgenen *Bcl10*^{-/-} Mäusen (Abb.5, Abb.6).

Einen möglichen Erklärungsversuch legen bereits bekannte *in vitro*-Untersuchungen an *Pkc θ* -defizienten Mäusen nahe. Hier hatte sich gezeigt, dass *Pkc θ* keine Rolle in Thymozyten spielt, sondern nur die TCR-vermittelte NF- κ B Aktivierung in peripheren T-Zellen kontrolliert (103). Die vorliegende Dissertation und ergänzende Daten unserer Arbeitsgruppe (46) beweisen jedoch, dass der Bcl10/Malt1-Komplex auch in unreifen

T-Lymphozyten eine Rolle für die CD3/CD28-vermittelte NF- κ B-Aktivierung spielt. Ganz explizit wurde zudem in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sowohl in DP als auch SP Thymozyten Signale vom TCR nach NF- κ B über Bcl10 und Malt1 vermittelt werden (Abb.4). Eine Bcl10-unabhängige NF- κ B-Aktivierung im Rahmen der Peptid-spezifischen Apoptoseinduktion über Peptid-beladene APCs konnte in dieser Arbeit ebenfalls ausgeschlossen werden (Abb.3). Bcl10 ist notwendig zur Aktivierung von NF- κ B durch die Interaktion zwischen APC und Thymozyt.

Auch die direkte Aktivierung von NF- κ B durch Stimulation von PKCs durch PMA/Iono ist abhängig von den Schlüsselmolekülen Bcl10 und Malt1 (46,92,93,94).

Das Selektionssignal allerdings scheint in bestimmten Situationen beim Ausfall zentraler Strukturen auf alternative Komplexe zurückgreifen zu können. Dies bestätigen auch externe Arbeiten an *Carma1*-deletierten Mäusen (38,47). Carma1 kann durch verschiedene PKC Isoformen phosphoryliert und aktiviert werden und führt seinerseits zur Komplexbildung mit Bcl10 und Malt1 und somit zur Signalweiterleitung nach NF- κ B (64,100). Die Untersuchungen mit TCR H-Y transgenen Mäusen zeigten, dass die Selektion der T-Zellen im Thymus in Abwesenheit von *Carma1* nicht gestört ist (38). Eine mögliche Erklärung ist das Vorliegen von Isoformen des Proteins Carma1, z.B. Carma2 oder Carma3, die die Rolle des fehlenden Proteins übernehmen.

Auch lassen die vorliegenden Ergebnisse die Möglichkeit zu, dass für das Selektionsgeschehen ein Netzwerk aus alternativen und auch modulierenden Signalmolekülen verantwortlich ist.

Durch aktuelle Arbeiten kristallisieren sich nun dessen zentralen und unerlässlichen Strukturen heraus. So zeigen neuere Studien, dass Thymozyten, die kein Calcineurin b1 besitzen, spezifische Defekte in der Positiven Selektion aufweisen (74). Die Aktivierung des Calcineurinsignalwegs erfolgt über IP3-vermittelte Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Zu den wichtigsten Zielstrukturen des Calcineurinproteins gehören die Transkriptionsfaktoren der NF-AT-Familie, die ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Positiven Selektion zu spielen scheinen (14). Auch der Erk-Signalweg und das „serum response factor accessory protein1“ sind in diesem Prozess essentiell (3,4,19,27,30,31,74,77,98).

Zudem geht man aktuell davon aus, dass Apoptose im Rahmen der Negativen Selektion über das proapoptotische Protein Bim (BH3 only protein) vermittelt wird (10). Bim scheint in diesem Kontext sowohl notwendig, als auch hinreichend für die Induktion des Zelltodes zu sein. Mögliche Mechanismen der Bim-Aktivierung, die zur Deletion autoreaktiver Lymphozyten führten, sind posttranslationelle Veränderungen (102) oder PKC- und Calcium-abhängige transkriptionelle Induktion (13). Die genauen Aktivierungswege sind

bisher jedoch unbekannt (13). Trotz eines möglichen Zusammenhangs zwischen PKCs und Bcl10-vermittelter Signaltransduktion, sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gegen eine Rolle des Bcl10/Malt1-Signalweges in der direkten oder indirekten Regulation der Bim-Aktivität. Dies geschieht aufgrund der Tatsache, dass die Abwesenheit von Bcl10 die Negative Selektion im transgenen Mausmodell nicht beeinflusst.

Frühere Untersuchungen postulierten zwar eine zentrale Rolle für NF- κ B in der Positiven Selektion (9,42,68), unsere Ergebnisse zeigen jedoch zusammen mit der Carma1-Studie, dass der TCR-vermittelte Signalweg nach NF- κ B nicht unbedingt für diesen Prozess benötigt wird. TCR-unabhängige Signale könnten zur benötigten NF- κ B Aktivierung und zum Überleben der Zellen beitragen und die TCR-vermittelten Signale über Calcineurin b1 und Erk, die zu positiver Selektion führen, indirekt modulieren.

Abschließend sollte zudem berücksichtigt werden, dass für eine intakte Negative Selektion nicht nur Signale über den TCR/MHC-Komplex benötigt werden. So scheinen u.a. CD28 und CD40 eine Rolle für die Negative Selektion zu spielen (28,82).

4.2 Bcl10/Malt1-unabhängige Entstehung von reifen B-Zell

Non-Hodgkin-Lymphomen im Modell der $E\lambda$ -myc transgenen Maus

B-Zellen exprimieren physiologischerweise einen Antigenrezeptor auf ihrer Oberfläche. Von ihm ausgehende Signalwege spielen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und das Überleben des B-Lymphozyt (57). Es kann zwischen einem Liganden-unabhängigen, sogenannten tonischen, und einem Antigen-vermittelten Signal unterschieden werden. Das Aktivitätsgleichgewicht zwischen Proteinkinasen wie Lyn oder Syk und Proteintyrosinphosphatasen scheint für ein stabiles tonisches Signal von großer Bedeutung zu sein (67).

Auch in der pathologischen Situation des B-Zell-Lymphoms spielen BCR-vermittelte Signale eine entscheidende Rolle. Gerade der Liganden-unabhängige Signalweg scheint mit seiner fragilen Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Faktoren bedeutend (16).

Eine aktuelle Veröffentlichung zeigte zudem, dass die Lymphomentität in den untersuchten Tieren entscheidend davon beeinflusst wird, welcher der beiden Signalwege dereguliert ist (86). Hierfür wurden verschiedene *Myc*-transgene Mausmodelle geschaffen, die eine Kooperation zwischen tonisch- oder Antigen-aktiviertem BCR mit dem Protoonkogen *Myc* zuließen. Antigenabhängige Aktivierung förderte primär die Entstehung von BL-Lymphomen. Ligandenunabhängigkeit führte zur Entwicklung von Lymphomentitäten, die der chronisch lymphatischen Leukämie ähnelten.

NF- κ B ist einer der zentralen Transkriptionsfaktoren, der über BCR-vermittelte Signale aktiviert wird. Dieser ist in einer Vielzahl von Lymphomentitäten aberrant konstitutiv aktiv (45). Es war jedoch bisher ungeklärt, inwiefern die BCR-vermittelte NF- κ B-Aktivierung zur Lymphomentstehung beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese wichtige Fragestellung mittels $E\lambda$ -*myc*-transgenen, *Bcl10*-defizienten Mäusen bearbeitet. Das Transgen führt im Verlauf eines Jahres zur Entwicklung eines reifen B-Zell NHLs mit erhaltenem, funktionstüchtigen BCR. Die humane Burkitt-charakteristische Translokation von *MYC* auf das *IgL λ* -Gen mit anschließender Überexpression des Onkogens wird in diesem System nachgeahmt und führt zu einem Burkitt-ähnlichen Phänotyp des entstehenden Lymphoms (56). *Bcl10*-Defizienz unterbricht die BCR-vermittelte NF- κ B-Aktivierung, und führt u.a. zu verminderten basalen Immunglobulinkonzentrationen und einer verringerten Immunglobulinproduktion nach Stimulation des Antigenrezeptors (93).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren im Vorfeld der *in vivo*-Untersuchungen *in vitro*-Versuche an der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie CA46 durchgeführt worden. Hier hatte sich eine deutliche basale Aktivität von NF- κ B im EMSA gezeigt. Auch führte Inhibition von RelA, das ein hohes Transaktivierungspotential besitzt (5,34,59), zur Apoptose der Lymphomzellen der CA46 Linie *in vitro*.

Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte in der EBV-positiven humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi eine konstitutive NF- κ B-Expression festgestellt werden (85). Genexpressionsanalysen bestätigten diese Ergebnisse (21).

Trotz der vielversprechenden *in vitro*-Ergebnisse zeigten die *in vivo*-Untersuchungen, dass sich im Tiermodell die Lymphomentstehung des reifen B-NHLs der $E\lambda$ -*myc* Maus durch die Abwesenheit von *Bcl10* weder verhindern noch hinauszögern lässt (Abb.7). Die Überlebenskurven der Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Auch der Immunphänotyp der sich entwickelnden reifen B-Zell-Lymphome wurde durch die fehlende BCR-vermittelte NF- κ B-Aktivierung nicht verändert (Abb.8, Tab.1). Für die Entstehung *c-Myc*⁺ Lymphome in unserem experimentellen Versuchsaufbau ist die BCR-vermittelte NF- κ B-Aktivierung als Proliferations- und Überlebensreiz folglich nicht notwendig.

Die parallele Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe an $E\mu$ -*myc* Mäuse bestätigte die eigenen Ergebnisse in Teilbereichen. So zeigten *in vivo*-Untersuchungen, dass die NF- κ B Untereinheit p50 (NF- κ B1) keine oder nur eine untergeordnete Rolle in der Entstehung von hochmalignen, *c-Myc*-getriebenen B-Zell-Lymphomen spielt – unabhängig vom aktivierenden Signalweg: NF- κ B1-defiziente $E\mu$ -*myc* Mäuse entwickeln in gleichem Maße B-Zell NHL wie die transgenen Wildtypiere (51).

Aktuelle Untersuchungen an weiteren Signalmolekülen unterstützen jedoch weiterhin die Bedeutung BCR-vermittelter Signale für die Lymphomentstehung. So zeigten folliculäre Lymphomzellen im Vergleich zu den B-Zellen gesunder Spender eine raschere Aktivierung des BCR-Signalnetzwerkes über Phosphorylierung von Btk, Syk, Erk1/2 und p38. Auch erfolgte die Signalweiterleitung über einen längeren Zeitpunkt und mit höherer maximaler Signalintensität (44).

Als wichtige Zielstrukturen kommen nun Rezeptor-proximale Kinasen wie PI3-Kinase (1,15,35,70) oder Syk in Frage. *In vitro*-Untersuchungen an isolierten B-Zell-Lymphomzellen aus E μ -myc Mäusen und humanen BL-Zellen zeigen eine konstitutive Aktivierung von Syk durch Stimulation des BCRs. Inhibition der Kinase führt zur Hemmung des Lymphomwachstums (36). Auch konnte ein Syk-abhängiges tonisches B-Zell-Signal in diffus großzelligen Lymphomzellen nachgewiesen werden (16). Bemerkenswerterweise wurden jedoch auch DLBCL-Zellen gefunden, in denen dieser Signalweg nur eine untergeordnete Rolle spielt. Auch in einer Reihe von Mantelzelllymphomzellen induzierte der Syk-Inhibitor Piceatannol Apoptose. Eine Überexpression von Syk konnte jedoch auch hier nicht in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden (89). Syk scheint als zentraler Regulator neben NF- κ B noch weitere Zielmoleküle zu aktivieren, die für die Lymphomentstehung maßgeblich sind. JNK (c-JUN N-terminal kinase), ein Mitglied der MAPK (mitogen-activated protein kinase), ist hierbei ein potentieller Kandidat (36).

Abschließend sollte zudem bedacht werden, dass eine Reihe weiterer Signalwege in der Lymphomentstehung zu berücksichtigen sind. In EBV-positiven Burkitt-Lymphomen ermöglicht so z.B. die Nachahmung von CD40-vermittelter NF- κ B-Aktivierung dem EBV latent membrane protein 1 (LMP1) entscheidend zur Onkogenese beizutragen (23,24,53).

5 Zusammenfassung

Für Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und Überleben von T- und B-Zellen spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine zentrale Rolle. Während kontrollierte NF- κ B-Aktivität also für die Koordination einer physiologischen Immunantwort entscheidend ist, kann dessen konstitutive Aktivierung zur Entstehung von Lymphomen beitragen. In der Antigenrezeptor-vermittelten Aktivierung von NF- κ B spielen die Adaptorproteine Bcl10 und Malt1 eine entscheidende Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand *Bcl10*-defizienter Mäuse die Bedeutung der Antigenrezeptor-vermittelten NF- κ B-Aktivierung in der T-Zell-Selektion und in der Entstehung eines *c-Myc* getriebenen Lymphoms untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Bcl10 und Malt1 in doppelt und einfach positiven Thymozyten eine zentrale Rolle für die TCR-vermittelte Aktivierung von NF- κ B spielen. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Signalleitung über den Bcl10/Malt1-Komplex nach NF- κ B nicht an der Selektion der T-Zellen beteiligt ist.

Zur Klärung des pathologischen Aspekts von NF- κ B in reifen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen wurden Untersuchungen an *Bcl10*^{-/-} *E λ -myc*-transgenen Tieren durchgeführt. Die Versuche an unserem Mausmodell ergaben anhand der statistischen Auswertung des Überlebens der Tiere und der immunphänotypischen Untersuchungen, dass die Entwicklung eines reifen B-NHLs im *E λ -myc*-transgenen Mausmodell auch bei fehlender BCR-vermittelter NF- κ B-Aktivierung möglich ist. Zur Onkogenese von Burkitt-ähnlichen Lymphomen in diesem Mausmodell konnte beigetragen werden, dass diese Bcl10/Malt1-unabhängig ist.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation konnten im Journal of Immunology publiziert werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO, Tschlis PN. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94 (1997): 3627-32.
- 2 Aifantis I, Gounari F, Scorrano L, Borowski C, von Boehmer H. Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT. *Nat Immunol*. 2 (2001): 403-9.
- 3 Alberola-Ila J, Forbush KA, Seger R, Krebs EG, Perlmutter RM. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 373 (1995): 620-3.
- 4 Alberola-Ila J, Hogquist KA, Swan KA, Bevan MJ, Perlmutter RM. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* 184 (1996): 9-18.
- 5 Ballard DW, Dixon EP, Peffer NJ, Bogerd H, Doerre S, Stein B, Greene WC. The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89 (1992): 1875-9.
- 6 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 NF-kappa B. *J Biol Chem*. 276 (2001): 11877-82.
- 7 Blum AK, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104 (2004): 3009-20.
- 8 Bolland S, Pearse RN, Kurosaki T, Ravetch JV. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* 8 (1998): 509-16.
- 9 Boothby MR, Mora AL, Scherer DC, Brockman JA, Ballard DW. Perturbation of the T lymphocyte lineage in transgenic mice expressing a constitutive repressor of nuclear factor (NF)-kappaB. *J Exp Med*. 185 (1997): 1897-1907.
- 10 Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM, Strasser A. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415 (2002): 922-6.
- 11 Boxer L, Dang C. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20 (2001): 5595-01.
- 12 Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol*. 19 (2001): 375-96.

- 13 Cante-Barrett K, Gallo EM, Winslow MM, Crabtree GR. Thymocyte negative selection is mediated by protein kinase C- and Ca²⁺-dependent transcriptional induction of bim. *J Immunol* 176 (2006): 2299-06.
- 14 Canté-Barrett K, Winslow MM, Crabtree GR. Selective role of NFATc3 in positive selection of thymocytes. *J Immunol.* 179 (2007):103-10.
- 15 Cavin LG, Wang F, Factor VM, Kaur S, Venkatraman M, Thorgeirsson SS, Arsura M. Transforming growth factor-alpha inhibits the intrinsic pathway of c-Myc-induced apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in murine hepatocellular carcinomas. *Mol Cancer Res.* 3 (2005): 403-12.
- 16 Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig TE, Habermann TM, Kutok JL, Shipp MA. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 111 (2008): 2230-7.
- 17 Clements JL, Boerth NJ, Lee JR, Koretzky GA. Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol.* 17 (1999): 89-108.
- 18 Combriato G, Klobeck HG. Regulation of human Ig lambda light chain expression by NF-kappaB. *J Immunol.* 168 (2002): 1259-66.
- 19 Costello PS, Nicolas RH, Watanabe Y, Rosewell I, Treisman R. Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection. *Nat Immunol* 5 (2004): 289-98.
- 20 Cusson N, Oikemus S, Kilpatrick ED, Cunningham L, Kelliher M. 2002. The death domain kinase RIP protects thymocytes from tumor necrosis factor receptor type 2-induced cell death. *J Exp Med* 196 (2002): 15-26.
- 21 Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, Greiner TC, Weisenburger DD, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Delabie J, Rimsza LM, Braziel RM, Grogan TM, Campo E, Jaffe ES, Dave BJ, Sanger W, Bast M, Vose JM, Armitage JO, Connors JM, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Fisher RI, Miller TP, Montserrat E, Wilson WH, Bahl M, Zhao H, Yang L, Powell J, Simon R, Chan WC, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med.* 354 (2006): 2431-42.
- 22 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.* 194 (2001): 1861-74.
- 23 Dirmeier U, Hoffmann R, Kilger E, Schultheiss U, Briseno C, Gires O, Kieser A, Eick D, Sugden B, Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* 24 (2005): 1711-7.

- 24 D'Souza BN, Edelstein LC, Pegman PM, Smith SM, Loughran ST, Clarke A, Mehl A, Rowe M, Gelinas C, Walls D. Nuclear factor kappa B-dependent activation of the antiapoptotic bfl-1 gene by the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and activated CD40 receptor. *J Virol.* 78 (2004): 1800-16.
- 25 Duyao MP, Buckler AJ, Sonenshein GE. Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87 (1990): 4727-31
- 26 Fiorini E, Schmitz I, Marissen WE, Osborn SL, Touma M, Sasada T, Reche PA, Tibaldi EV, Hussey RE, Kruisbeek AM, Reinherz EL, Clayton LK. Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell* 9 (2002): 637-48.
- 27 Fischer AM, Katayama CD, Pages G, Pouyssegur J, Hedrick SM. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 23 (2005): 431-43.
- 28 Foy TM, Page DM, Waldschmidt TJ, Schoneveld A, Laman JD, Masters SR, Tygrett L, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Xu JC, Flavell RA, Oehen S, Hedrick SM, Noelle RJ. An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J Exp Med.* 182 (1995): 1377-88.
- 29 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.* 496 (2001): 121-7.
- 30 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* 3 (2002): 836-43.
- 31 Gallo EM, Winslow MM, Canté-Barrett K, Radermacher AN, Ho L, McGinnis L, Iritani B, Neilson JR, Crabtree GR. Calcineurin sets the bandwidth for discrimination of signals during thymocyte development. *Nature* 450 (2007): 731-5.
- 32 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16 (1998): 225-60.
- 33 Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 109 (2002): S81-96.
- 34 Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J.* 290 (1993): 297-308.
- 35 Grumont RJ, Strasser A, Gerondakis S. B cell growth is controlled by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent induction of Rel/NF-kappaB regulated c-myc transcription. *Mol Cell.* 10 (2002): 1283-94.
- 36 Gururajan M, Chui R, Karuppanan AK, Ke J, Jennings CD, Bondada S. c-Jun N-terminal kinase (JNK) is required for survival and proliferation of B-lymphoma cells. *Blood* 106 (2005): 1382-91.

- 37 Gururajan M, Jennings CD, Bondada S. Cutting edge: constitutive B cell receptor signaling is critical for basal growth of B lymphoma. *J Immunol* 15 (2006): 5715-9
- 38 Hara H, Wada T, Bakal C, Kozieradzki 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* 18 (2003): 763-75.
- 39 Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 132 (2008): 344-62.
- 40 Hecht J, Aster J. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol*. 18 (2000): 3707-21.
- 41 Hettmann T, DiDonato J, Karin M, Leiden JM. An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J Exp Med*. 189 (1999): 145-154.
- 42 Hettmann T, Leiden JM. NF-kappa B is required for the positive selection of CD8⁺ thymocytes. *J Immunol*. 165 (2000): 5004-5010.
- 43 Horikawa K, Nishizumi H, Umemori H, Aizawa S, Takatsu K, Yamamoto T. Distinctive roles of Fyn and Lyn in IgD- and IgM-mediated signaling. *Int Immunol*. 11 (1999): 1441-9.
- 44 Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, Levy R. Altered B-cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells. *Blood*. 108 (2006): 3135-42.
- 45 Jost PJ, Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications. *Blood* 109 (2007): 2700-7.
- 46 Jost PJ, Weiss S, Ferch U, Gross O, Mak TW, Peschel C, Ruland J. Bcl10/Malt1 signaling is essential for TCR-Induced NF-kappaB activation in thymocytes but dispensable for positive or negative selection. *J Immunol*. 178 (2007): 953-60.
- 47 Jun JE, Wilson LE, Vinuesa CG, Lesage S, Blery M, Miosge LA, Cook MC, Kucharska EM, Hara H, Penninger JM, Domashenz H, Hong NA, Glynne RJ, Nelms KA, Goodnow CC. Identifying the MAGUK protein Carma-1 as a central regulator of humoral immune responses and atopy by genome-wide mouse mutagenesis. *Immunity* 18 (2003): 751-62.
- 48 Kanda K, Hu HM, Zhang L, Grandchamps J, Boxer LM. NF-κB activity is required for the deregulation of c-myc expression by the immunoglobulin heavy chain enhancer. *J Biol Chem*. 275 (2000): 32338-46.
- 49 Kane LP, Weiss A. The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. *Immunol Rev*. 192 (2003): 7-20.

- 50 Kees UR, Ford J. Synergistic action of stem-cell factor and interleukin-7 in a human immature T-cell line. *Immunology*. 96 (1999): 202-6.
- 51 Keller U, Nilsson JA, Maclean KH, Old JB, Cleveland JL. Nfkb 1 is dispensable for Myc-induced lymphomagenesis. *Oncogene* 24 (2005): 6231-40.
- 52 Kessler DJ, Spicer DE, La Rosa FA, Sonenshein GE. A novel NF-kappa B element within exon 1 of the murine c-myc gene. *Oncogene* 7 (1992): 2447-43.
- 53 Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*. 17 (1998): 1700-9.
- 54 Kim DW, Gazourian L, Quadri SA, Romieu-Mourez R, Sherr DH, Sonenshein GE. The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 16 (2000): 5498-506.
- 55 Koonpaew S, Shen S, Flowers L, Zhang W. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med*. 203 (2006): 119-29.
- 56 Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, Taddesse-Heath L, Feigenbaum L, Park SS, Gerbitz A, Klobeck G, Hoertnagel K, Polck A, Bornkamm GW, Janz S, Morse HC 3rd, Burkitt Lymphoma in the mouse. *J Exp Med*. 192 (2000): 1183-90.
- 57 Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewski N, Rajewski K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 117 (2004): 787-800.
- 58 Kurosaki T. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol*. 2 (2002): 354-63.
- 59 LaRosa FA, Pierce JW, Sonenshein GE. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Mol Cell Biol*. 14 (1994): 1039-44.
- 60 Lee H, Arsura M, Wu M, Duyao M, Buckler AJ, Sonenshein GE. Role of Rel-related factors in control of c-myc gene transcription in receptor-mediated apoptosis of the murine B cell WEHI 231 line. *J Exp Med*. 181 (1995): 1169-77.
- 61 Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister-Lucas LM, Abazeed ME, Chen FF, Yamaoka S, Seto M, Nunez G. Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in Malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem*. 276 (2001): 19012-19.
- 62 MacDonald HR, Radtke F, Wilson A. T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment. *Curr Opin Immunol*. 13 (2001): 219-24.

- 63 Madisen L, Krumm A, Hebbes TR, Groudine M. The immunoglobulin heavy chain locus control region increases histone acetylation along linked c-myc genes. *Mol Cell Biol.* 18 (1998): 6281-92.
- 64 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- κ B activation. *Immunity* 23 (2005): 575-85.
- 65 Miller AT, Berg LJ. New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system. *Curr Opin Immunol.* 14 (2002): 331-40.
- 66 Monks CR, Kupfer H, Tamir I, Barlow A, Kupfer A. Selective modulation of protein kinase C- θ during T-cell activation. *Nature.* 385 (1997): 83-6.
- 67 Monroe JG. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol.* 6 (2006): 283-94.
- 68 Mora AL, Stanley S, Armistead W, Chan AC, Boothby M. Inefficient ZAP-70 phosphorylation and decreased thymic selection in vivo result from inhibition of NF- κ B/Rel. *J Immunol.* 167 (2001): 5628-34.
- 69 Moreno-Garcia ME, Sommer KM, Bandaranayake AD, Rawlings DJ. Proximal signals controlling B-cell antigen receptor (BCR) mediated NF- κ B activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 584 (2006): 89–106.
- 70 Moriyama H, Yonehara S. Rapid up-regulation of c-FLIP expression by BCR signaling through the PI3K/Akt pathway inhibits simultaneously induced Fas-mediated apoptosis in murine B lymphocytes. *Immunol Lett.* 109 (2007): 36-46.
- 71 Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science* 250 (1990): 1720-3.
- 72 Narayan P, Holt B, Tosti R, Kane LP. CARMA1 is required for Akt-mediated NF- κ B activation in T cells. *Mol Cell Biol.* 26 (2006): 2327-36.
- 73 Negishi I, Motoyama N, Nakayama K, Senju S, Hatakeyama S, Zhang Q, Chan AC, Loh DY. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature.* 376 (1995): 435-8.
- 74 Neilson JR, Winslow MM, Hur EM, Crabtree GR. Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity* 20 (2004): 255-66.
- 75 Niiro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol.* 2 (2002): 945-56.
- 76 Ochoa-Garay J, Kaye J, Coligan JE. Nuclear factor κ B is required for peptide antigen-induced differentiation of a CD4⁺CD8⁺ thymocyte line. *J Immunol.* 160 (1998): 3835-43.

- 77 Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286 (1999): 1374-7.
- 78 Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*. 23 (2004): 7990-8000.
- 79 Patterson HC, Kraus M, Kim YM, Ploegh H, Rajewsky K. The B cell receptor promotes B cell activation and proliferation through a non-ITAM tyrosine in the Igalpha cytoplasmic domain. *Immunity*. 25 (2006): 55-65.
- 80 Petrie HT. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 3 (2003): 859-66
- 81 Pircher H, Brduscha K, Steinhoff U, Kasai M, Mizuochi T, Zinkernagel RM, Hengartner H, Kyewski B, Muller KP. Tolerance induction by clonal deletion of CD4+8+ thymocytes in vitro does not require dedicated antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*. 23 (1993): 669-74.
- 82 Punt JA, Havran W, Abe R, Sarin A, Singer A. T cell receptor (TCR)-induced death of immature CD4+CD8+ thymocytes by two distinct mechanisms differing in their requirement for CD28 costimulation: implications for negative selection in the thymus. *J Exp Med*. 186 (1997): 1911-22.
- 83 Quong MW, Romanow WJ, Murre C. E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol*. 20 (2002).
- 84 Radtke F, Wilson A, MacDonald HR. Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr Opin Immunol*. 16 (2004): 174-9.
- 85 Rath PC. Relationship between constitutive nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and inhibitor kappaB-alpha (IkappaB-alpha) in an interferon-alpha-sensitive human Burkitt lymphoma cell line. *Biochim Biophys Acta*. 1741 (2005): 253-63.
- 86 Refaeli Y, Young RM, Turner BC, Duda J, Field KA, Bishop JM. The B cell antigen receptor and overexpression of MYC can cooperate in the genesis of B cell lymphomas. *PLoS Biol*. 6 (2008): e152.
- 87 Ren HA, Schmalstieg NS, van Oers NS, Gaynor RB. I-kappa B kinases alpha and beta have distinct roles in regulating murine T cell function. *J Immunol*. 168 (2002): 3721-31.
- 88 Res P, Spits H. Developmental stages in the human thymus. *Semin Immunol*. 11 (1999): 39-46.
- 89 Rinaldi A, Kwee I, Tadorelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, Poretti G, Gaidano G, Calabrese G, Martinelli G, Baldini L, Pruneri G, Capella C, Zucca E, Cotter FE, Cigudosa JC, Catapano CV, Tibiletti MG, Bertoni F. Genomic and expression profiling

- identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 132 (2006): 303-16.
- 90 Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol.* 8 (2008): 9-21.
- 91 Rudd CE. Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell.* 96 (1999): 5-8.
- 92 Ruefli-Brasse A, French DM, Dixit VM. Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* 302 (2003): 1581-84.
- 93 Ruland J, Duncan GS, Elia A, del Barco Barrantes I, Nguyen L, Plyte S, Millar DG, Bouchard D, Wakeham A, Ohashi PS, Mak TW. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 104 (2001): 33-42.
- 94 Ruland J, Duncan GS, Wakeham A, Mak TW. Differential requirement for MALT1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* 19 (2003): 749-758.
- 95 Ruland J, Mak TW. From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF-kappaB. *Semin Immunol.* 15 (2003): 177-83.
- 96 Sebзда E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS. Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol.* 17 (1999): 829-74.
- 97 Sepulveda MA, Emelyanov AV, Birshstein BK. NF-kappa B and Oct-2 synergize to activate the huma 3' Igh hs4 enhancer in B cells. *J Immunol.* 172 (2004): 1054-64.
- 98 Sharp LL, Schwarz DA, Bott CM, Marshall CJ, Hedrick SM. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity* 7 (1997): 609-18.
- 99 Siebenlist U, Brown K, Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear factor- κ B. *Nat Rev Immunol* 5 (2005): 435-45.
- 100 Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-Garcia ME, Ovechkina YL, Rawlings DJ. Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity* 23 (2005): 561-74.
- 101 Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 21 (2003): 139-76.
- 102 Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5 (2005): 189-200.
- 103 Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL, Littman DR. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404 (2000): 402-7.

- 104 Takagi T, Harada J, Ishii S. Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nat Immunol.* 2 (2001): 1048-53.
- 105 Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol.* 4 (2004): 348-59.
- 106 Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6 (2000): 961-7
- 107 Voll RE, Jimi E, Phillips RJ, Barber DF, Rincon M, Hayday AC, Flavell RA, Ghosh S. NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity* 13 (2000): 677- 89.
- 108 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.* 24 (2004): 164-71.
- 109 Wange RL. LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways. *Sci STKE.* 63 (2000): RE1.
- 110 Wittekindt NE, Hörtnagel K, Geltinger C, Polack A. Activation of c-myc promoter P1 by immunoglobulin kappa gene enhancers in Burkitt lymphoma: functional characterization of the intron enhancer motifs kappaB, E box 1 and E box 2, and of the 3' enhancer motif PU. *Nucleic Acids Res.* 28 (2000): 800-8.
- 111 Zuniga-Pflücker JC. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol.* 4 (2004): 67-72.

Verzeichnis der Abkürzungen

7-AAD	7-amino-actinomycin
Abb.	Abbildung
ABC DLBCL	activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma
AP1	activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
Bam32	B-lymphocyte adaptor molecule of 32 kD
Bcl	B-cell Lymphoma
<i>Bcl10</i> ^{+/+}	zwei Bcl10 Wildtypallele
<i>Bcl10</i> ^{+/-}	ein Bcl10 Wildtypallel und ein Bcl10 mutiertes Allel
<i>Bcl10</i> ^{-/-}	zwei mutierte Bcl10 Allele
BCR	B cell receptor
Bim	BH3 only protein
BL	Burkitt-Lymphom
Blk	B lymphoid kinase
Blnk	B-cell linker
BMS	4-(2Aminoethyl)amino-1,8-dimethylimidazol[1,2-a]quinoxaline
bp	base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
Btk	Bruton's tyrosine kinase
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
Card	Caspase recruitment domain
Carma1	Card-membrane associated guanylate kinase 10
CC	coiled-coil domain
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD	cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CHAPS	Cholic acid sulfobetaine 1-propanaminium,N,N dimethyl-3-sulfo-N-(3-(((3alpha,5beta,7alpha,12alpha)-3,7,12-trihydroxy-24-oxocholan-24-yl)amino)propyl)-,hydroxide, inner salt

Verzeichnis der Abkürzungen

<i>c-myc</i> ^{+/+}	zwei <i>c-myc</i> Wildtypallele
<i>c-myc</i> ^{+/-}	ein <i>c-myc</i> Wildtypallel und ein <i>c-myc</i> mutiertes Allel
<i>c-myc</i> ^{-/-}	zwei mutierte <i>c-myc</i> Allele
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerin
dd	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	double positive
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendiaminglycerinsäure
EMSA	Electromobility Shift Assay
Erk	Extracellular-signalregulated-kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fas	Fs7 associated cell surface antigen
FCS	fetal calf serum
FFP	fresh frozen plasma
FITC	Fluoresceinisothiocyant
Fyn	fgr/yes-related novel PTK
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gad	Grb2-related adaptor downstream of Shc
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSF	Gesellschaft für Strahlenforschung
GTPase	small guanine nucleotide triphosphatases
GUK	C-terminal guanylate kinase-like
h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid
HLH	Helix-loop-helix
HRP	horseradish peroxidase
HS	hypersensitive sites

Verzeichnis der Abkürzungen

IC ₅₀	Inhibitor Concentration 50
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin heavy chain
IgL	Immunglobulin light chain
IKK	inhibitor of kappa B kinase
IκB	inhibitor of kappa B
IκBNS	I kappa B negative selection
Il	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
Iono	Calciumionophor
IP	Inositol-3,4,5-Triphosphat
IRE	internal regulatory element
IS	immunologische Synapse
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
Itk	Interleukin-2 inducible T-cell kinase
Jnk	c-JUN N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
LAT	linker for activation of T cells
LN	Lymph node
Lck	lympocyte-specific protein tyrosine kinase
Lyn	Lck/Yes related Novel Tyrosine Kinase
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase
Malt1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
<i>Malt1</i> ^{+/+}	zwei Malt1 Wildtypallele
<i>Malt1</i> ^{+/-}	ein Bcl10 Wildtypallel und ein Bcl10 mutiertes Allel
<i>Malt1</i> ^{-/-}	zwei mutierte Malt1 Allele
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
Myc	member of the immediate-early gene family
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	NF-κB essential modulator

Verzeichnis der Abkürzungen

NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nM	nanomolar
NP-40	Nonidet P-40
OCI	Ontario Cancer Institute
OT-2 TCR	OVA-specific, MHC class II-restricted $\alpha\beta$ T cell receptor
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate-buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1 Homologous
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanine-5
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbolmyristatsäure
PMSF	Phenylmethansufonylfluorid
Poly dIdC	Poly(2'-deoxyinosinic-2'-deoxycytidylic acid) sodium salt
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAG	rearrangement activating gene
Ras	rat sarcoma virus oncogene
RHD	Rel-homology domain
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkriptase
SCF	stem cell factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src homology
Shn-2	Schnurri-2
SLP76	Src homology 2 domain containing leukocyte protein of 76 kD
SMAC	supramolecular activation complex
SP	single positive
Src	Sarkomavirus Tyrosinkinase
Stabw	Standardabweichung
Syk	spleen tyrosine kinase

Verzeichnis der Abkürzungen

TAD	terminale Transaktivierungsdomäne
TAE	Diethylcarbamoylmethyl-2-methylbenzoate
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tribromosalicylanilide
TBST	TBS mit Tween
TCR	T-cell receptor
Tec	Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	tumor growth factor
Th	T helper cell
TNF	tumor necrosis family
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRIS/HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan/ Chlorwasserstoffsäure
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U/min	Umdrehungen in der Minute
URE	upstream regulatory element
V	Volt
Vav	Protein, das nach dem 6. Buchstaben des hebräischen Alphabets benannt wurde
wt	Wildtyp
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Zap-70	zeta-chain associated protein kinase 70

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Reife transgene T-Zellen proliferieren nach CD3/CD28-Stimulation nur in Anwesenheit von Bcl10	35
Abbildung 2:	Aktivierung des CD95-Liganden in reifen T-Zellen durch TCR-Stimulation benötigt Bcl10	36
Abbildung 3:	I κ B α -Degradation in OT-2 TCR transgenen Thymozyten nach Präsentation von OVA ist Bcl10-abhängig	37
Abbildung 4:	I κ B α Degradation in T-Zell Subpopulationen des Thymus	38
Abbildung 5:	Immunphänotypisierung <i>Bcl10</i> ^{-/-} OT-2 TCR transgener Thymozyten und reifer T-Zellen	40
	a) Ungestörte Positive Selektion OT-2 TCR transgener Thymozyten in SP CD4 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i> .	
	b) Normale Häufigkeitsverteilung peripherer T-Zellen in den Lymphknoten <i>Bcl10</i> ^{-/-} OT-2 TCR Mäuse.	
Abbildung 6:	Peptid-spezifische Apoptose OT-2 TCR transgener DP-Thymozyten in Abwesenheit von Bcl10 <i>in vitro</i>	42
Abbildung 7:	Lymphominzidenz in <i>c-Myc</i> transgenen Mäusen in Abwesenheit von Bcl10	45

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Statistische Analyse der Merkmalsausprägungen B220 und IgM auf Tumore transgener <i>Bcl10</i> ^{+/+} , <i>Bcl10</i> ^{+/-} und <i>Bcl10</i> ^{-/-} Tiere.....	46
	a) Studentischer T-Test der obigen Stichprobenuntersuchung	
	b) Ergebnis der Stichprobenuntersuchung von 6 Tumoren <i>Bcl10</i> ^{+/+} Tiere, 10 Tumoren <i>Bcl10</i> ^{+/-} Tiere und 8 Tumoren <i>Bcl10</i> ^{-/-} Tiere	

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Stefanie Weiss
Geburtsdatum: 30.11.1981
Geburtsort: Trostberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul- und Berufsausbildung

1988 - 1992 Besuch der Heinrich- Braun-Volksschule Trostberg
1992 - 2001 Besuch des Hertzhaimer-Gymnasiums Trostberg und Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (1,0)
Okt. 2001- Sept. 2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München und Erwerb des Physikums (1,66)
Sept. 2003 - Nov. 2007 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
Aug. 2006 - Dez. 2006 1. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Abdominal- und Allgemein Chirurgie des Hôpital Saint-Antoine, Paris
Dez. 2006 - Feb. 2007 2. Terial (erster Abschnitt) des Praktischen Jahres in der I. Medizinischen Klinik des Klinikums München rechts der Isar
Februar 2007 - April 2007 2. Terial (zweiter Abschnitt) des Praktischen Jahres in der III. Medizinischen Klinik des Klinikums München rechts der Isar
April 2007 - Juli 2007 3. Terial des Praktischen Jahres in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums München rechts der Isar
November 2007 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)
Approbation als Ärztin
Seit Januar 2008 Assistenzärztin an der III. Medizinischen Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie des Klinikums rechts der Isar in München

Stipendien und Auszeichnungen

Okt. 2001 - Sept. 2005 Stipendium für Besonders Begabte des Freistaates Bayern
Sept. 2005 - Nov. 2007 Stipendium im Rahmen des Max-Weber-Programms der Studienstiftung des Deutschen Volkes
Seit April 2005 TUM Förderprogramm „Erfahrene Wege in die Forschung“

Wissenschaftliche Publikationen

Jost PJ, Weiss S, Ferch U, Gross O, Wak TW, Peschel C, Ruland J.
Bcl10/Malt1 Signaling Is Essential for TCR-Induced NF- κ B Activation in Thymocytes but Dispensable for Positive or Negative Selection.
J Immunol. 178 (2007): 953-60.

S. Weiss, P. Jost, C. Peschel, J. Ruland
Molekulare Pathogenese von MALT-Lymphomen: unabhängige chromosomale Translokationen deregulieren zentralen B-Zell Signaltransduktionsweg
Molecular pathogenesis of MALT lymphoma: independent chromosomal translocation deregulate a central signalling pathway in B cells
Med Welt. 58(2007): 578-81

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. C. Peschel, der es mir ermöglichte, die vorliegende Dissertation an seiner Klinik durchzuführen.

Im Besonderen möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. med. Jürgen Ruland für die Überlassung dieses vielseitigen und interessanten Themas, sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die fachkundige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Vor allem bedanke ich mich zudem bei meinem Betreuer Dr. med. Philipp Jost, der mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert hat und dem ich alles erdenklich Gute für seine weitere (Forscher-) Zukunft wünsche.

Ganz herzlich möchte ich auch Uta Ferch und Dr. rer. nat. Andreas Gewies danken, die ich sowohl fachlich als auch menschlich extrem schätze, und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Katja Meiners, Stefanie Klemm, Olaf Groß und Stephanie Leeder waren in jeder Hinsicht wunderbare Kollegen und stets eine große Hilfe. Bei Konstanze Pechloff, Thomas Patzelt und Mercedes Castineira möchte ich mich besonders für die gute Atmosphäre bedanken, die ich immer sehr geschätzt und genossen habe.

Meine medizinische Mitstreiterin Katrin Finger wurde zu einer sehr guten Freundin. Dafür und für ihre Hilfsbereitschaft und Loyalität möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem Beate Beck - für ihre Freundschaft und die fachliche Bereicherung.

Zu danken gilt nun insbesondere auch
meinen Eltern Dr. Stefan & Gisela Weiss,
meiner Schwester Nicole und

T.B.F. Jilg

«Merci beaucoup»