



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Institut für Klinische Chemie
Klinikum rechts der Isar

**Die Signaltransduktion der Fusionstyrosinkinase ITK-SYK
im Rahmen der Lymphomentstehung**

Julian Walter Holch

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland
2. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel
3. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 17.10.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.11.2014 angenommen.

meinen Eltern

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
2	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	7
3	EINLEITUNG	11
3.1	Das unspezifizierte periphere T-Zell-Lymphom	11
3.1.1	Klassifikation, Epidemiologie, und Ätiologie	11
3.1.2	Diagnostik.....	11
3.1.2.1	Der Nachweis von Klonalität in peripheren T-Zell-Lymphomen	12
3.1.3	Klinik, Verlauf und Prognosefaktoren	12
3.1.4	Molekulare Pathogenese.....	13
3.1.5	Therapie	13
3.2	Biochemische und molekularbiologische Grundlagen	14
3.2.1	Genumlagerung und Aufbau des T-Zell-Rezeptors.....	14
3.2.1.1	Genumlagerung des T-Zell-Rezeptors in lymphoiden Malignomen	16
3.2.2	Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptor-Komplexes	16
3.2.2.1	Der Signalweg zur Aktivierung von AP-1	19
3.2.2.2	Der Signalweg zur Aktivierung von NFκB	20
3.2.2.3	Der Signalweg zur Aktivierung von NFAT	21
3.2.3	Signaltransduktion des CD28-Korezeptors	21
3.2.4	Signaltransduktion des IL-2-Rezeptors	22
3.3	ITK-SYK im unspezifizierten peripheren T-Zell-Lymphom	23
4	FRAGESTELLUNG UND VORGEHENSWEISE.....	25
4.1	Untersuchung zur Zelltransformation durch ITK-SYK im Mausmodell.....	25
4.2	Analyse der Signaltransduktion von ITK-SYK sowie der zellulären Folgen der ITK-SYK-Expression.....	26
5	MATERIAL UND METHODEN	27
5.1	Material.....	27
5.1.1	Geräte	27

5.1.2	Chemikalien und biogene Substanzen.....	27
5.1.3	Standardlösungen und Puffer.....	28
5.1.4	Molekulargewichtsmarker für DNS.....	28
5.1.5	Oligonukleotide.....	29
5.1.6	Antikörper.....	30
5.1.7	Rekombinante Proteine.....	30
5.1.8	Enzyme.....	31
5.1.9	Inhibitoren.....	31
5.1.10	Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	31
5.1.11	Reagenziensätze.....	32
5.1.12	Verbrauchsmaterialien.....	32
5.1.13	Verwendete retrovirale Expressionsvektoren.....	33
5.1.14	Verwendete Bakterienstämme.....	33
5.1.15	Verwendete Zelllinie.....	33
5.1.16	Verwendete Mäuse.....	34
5.1.17	Verwendete Software.....	35
5.2	Methoden.....	35
5.2.1	Arbeiten mit Mäusen.....	35
5.2.1.1	Haltung.....	35
5.2.1.2	Genotypisierung der verwendeten Mäuse.....	35
5.2.2	Allgemeine Arbeiten mit Zellen.....	36
5.2.2.1	Allgemeine Bedingungen für die Kultivierung von Zellen.....	36
5.2.2.2	Zentrifugation.....	36
5.2.2.3	Bestimmung von Zahl und Vitalität.....	36
5.2.3	Arbeiten mit Zelllinien.....	37
5.2.3.1	Kultivierung.....	37
5.2.3.2	Passagieren von adhärennten Zellen.....	37
5.2.3.3	Einfrieren und Auftauen.....	37
5.2.3.4	Kalzium-Phosphat-Transfektion.....	38
5.2.3.5	Titration des Virusüberstandes.....	39
5.2.3.6	Retrovirale Infektion.....	39
5.2.3.7	Stimulationsexperimente.....	40
5.2.3.8	Inhibitionsexperimente.....	41
5.2.3.9	Analyse der Zytokinsekretion.....	43
5.2.4	Arbeiten mit murinen Zellen.....	44
5.2.4.1	Präparation.....	44
5.2.4.2	Aufreinigung muriner CD4-positiver T-Zellen.....	44
5.2.4.3	Expression von ITK-SYK in murinen CD4-positiven T-Zellen.....	45
5.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	46
5.2.5.1	Polymerasekettenreaktion.....	46

5.2.5.2	Polymerasekettenreaktion im <i>touch-down</i> -Verfahren	46
5.2.5.3	Auftrennen und Nachweis der PCR-Produkte	47
5.2.5.4	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	47
5.2.5.5	Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien	48
5.2.5.6	Isolierung von genomischer DNS aus Suspensionszellen	48
5.2.5.7	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
5.2.6	Durchflusszytometrie	49
5.2.6.1	Einführung	49
5.2.6.2	Zelloberflächenfärbung	50
5.2.6.3	Untersuchung zur intrazellulären Proteinphosphorylierung (<i>PhosflowTM</i>)	50
5.2.6.4	Unterscheidung lebender und toter Zellen	51
5.2.6.5	Auswertung und Darstellung der Daten	51
5.2.7	Spektratypisierung muriner T-Zellen	52
5.2.8	Statistische Analyse	56
6	ERGEBNISSE	57
6.1	Untersuchung zur Zelltransformation durch ITK-SYK im Mausmodell	57
6.2	Untersuchung zellulärer Folgen der Expression von ITK-SYK	59
6.2.1	Untersuchung mit Jurkat T-Zellen	59
6.2.1.1	Zellzahl und Viabilität	60
6.2.1.2	Nachweis von Aktivierungsmarkern	61
6.2.1.3	Sekretion von IL-2	62
6.2.2	Untersuchung mit murinen CD4-positiven T-Zellen	63
6.3	Analyse der Signaltransduktion von ITK-SYK	65
6.3.1	Untersuchung zur intrazellulären Proteinphosphorylierung (<i>PhosflowTM</i>)	65
6.3.1.1	Untersuchung zur intrazellulären Proteinphosphorylierung nach Expression von ITK-SYK	65
6.3.1.2	Untersuchung zur intrazellulären Proteinphosphorylierung nach Stimulation mit Antikörpern	68
6.3.2	Inhibitionsexperimente	70
7	DISKUSSION	72
7.1	Das transformierende Potential von ITK-SYK im Mausmodell	72
7.1.1	Der Nachweis von Klonalität in hämatologischen Neoplasien	72
7.1.2	Der Nachweis von Klonalität in den Mausmodellen mit konditionaler Expression von ITK-SYK	73

7.2 Zelluläre Folgen der ITK-SYK-Expression	74
7.2.1 Verwendete Zellen	75
7.2.2 Aktivierung von T-Zellen durch ITK-SYK.....	75
7.2.3 Die Rolle der <i>Pleckstrin homology</i> -Domäne für die Funktion von ITK-SYK	77
7.2.4 Die Rolle der Proteintyrosinkinase-Domäne für die Funktion von ITK-SYK.....	79
7.3 Die Signaltransduktion von ITK-SYK	80
7.3.1 Analyse von intrazellulärer Proteinphosphorylierung mittels <i>Phosflow</i> TM	81
7.3.2 Analyse der Signaltransduktion mittels Inhibitoren.....	82
7.3.3 Die proximale Signaltransduktion von ITK-SYK in Jurkat-Zellen	83
7.3.4 Die distale Signaltransduktion von ITK-SYK in Jurkat-Zellen.....	83
7.3.5 Modell der Signaltransduktion von ITK-SYK im Rahmen der Lymphomentstehung	85
7.3.5.1 Replikativer Stress durch ITK-SYK	86
7.3.5.2 Die Abhängigkeit des Lymphoms von ITK-SYK	87
7.3.5.3 Die Regulation der Expression von ITK-SYK	88
7.3.5.4 Die Rolle des Antigenrezeptors in der Lymphomentstehung	88
7.3.6 Ausblick	88
8 ZUSAMMENFASSUNG.....	90
9 LITERATURVERZEICHNIS.....	91
10 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....	103
11 VERZEICHNIS DER TABELLEN	105
12 LEBENS LAUF	106
13 DANKSAGUNG	108

2 Verzeichnis der Abkürzungen

®	registered, registriert
°C	Grad Celsius
4E-BP1	eukaryotic initiation factor <u>4E</u> binding protein-1
7-AAD	7-Amino-Actinomycin <u>D</u>
AF647	<u>AlexaFluor647</u>
AgR	<u>Antigenrezeptor</u>
AICD	<u>activation-induced cell death</u>
AKT	Synonym für PKB
AP-1	activator protein 1
APC	<u>Allophycocyanin</u>
APO-1	<u>Apoptosis antigen 1</u>
APZ	<u>Antigenpräsentierende Zelle(n)</u>
B220	220 kDa Variante des T200 Glykoproteins
Bad	<u>Bcl-2-associated death promoter</u>
Bcl10	<u>B-cell Lymphoma 10</u>
bp	<u>Basenpaar</u>
bzw.	<u>beziehungsweise</u>
c	Konzentration
c_{final}	finale Konzentration
c_{stock}	Stockkonzentration bzw. Konzentration der Stammlösung
C	<u>Cystein</u>
ca.	circa
Ca^{++}	Kalzium
CaCl_2	Kalziumchlorid
CARD	<u>Caspase recruitment domain</u>
CARMA1	<u>Card-membrane associated guanylate kinase 1</u>
CBM-Komplex	<u>CARMA1-Bcl10-MALT1-Komplex</u>
CD	<u>cluster of differentiation</u>
CDKI	<u>cyclin-dependent kinase inhibitor</u>
cDNA	<u>complementary DNA</u>
CDR	<u>complementarity determining region</u>
CHOEP	CHOP + Etoposid
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
CK1	<u>Casein Kinase 1</u>
cm^2	Quadratzentimeter
COS-7	<u>Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40-7</u>
CRAC	<u>Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels</u>
CREB	<u>cyclic adenosine monophosphate response element-binding</u>
Da	<u>Dalton</u>
DAG	<u>Diacylglycerin</u>
del	Deletion
DMEM	<u>Dulbecco's Modified Eagle Medium</u>
DMSO	<u>Dimethylsulfoxid</u>
DNA	<u>Deoxyribonucleic acid</u>
DNA-PK	<u>DNA-dependent protein kinase</u>
DNS	<u>Desoxyribonukleinsäure</u>
dNTP	<u>Desoxyribonukleotidtriphosphate</u>
E. coli	<u>Escherichia coli</u>
EDTA	<u>Ethylenediaminetetraacetic acid,</u>
eGFP	<u>enhanced GFP</u>
ELISA	<u>enzyme-linked immunosorbent assay</u>

EMA	<u>E</u> uropean <u>M</u> edicines <u>A</u> gency
E	<u>G</u> lutamat
engl.	<u>E</u> nglisch
env	<u>e</u> nvelope gene
Erk	<u>E</u> xtracellular signal- <u>r</u> egulated <u>k</u> inases
F	<u>P</u> henylalanin
FACS	<u>F</u> luorescence activated cell sorting
FAM TM	<u>F</u> luorescein <u>a</u> midite; <u>F</u> luorescein-Markierung
FCS	<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> ministration
FI	<u>F</u> luoreszenz <u>i</u> ntensität
FL	<u>F</u> luoreszenzkanal
FOXO	<u>F</u> orkhead box protein <u>O</u>
FTK	<u>F</u> usionst <u>k</u> inase
g	<u>E</u> rdbeschleunigung (1g = 9,81m/s ²)
Gab2	<u>G</u> RB2- <u>a</u> ssociated- <u>b</u> inding protein <u>2</u>
Gads	<u>G</u> rb2-related <u>a</u> dapter <u>d</u> ownstream of <u>S</u> hc
gag	<u>g</u> roup-specific <u>a</u> ntigen
GenTSV	<u>G</u> entechnik <u>s</u> icherheits <u>v</u> erordnung
GEP	<u>G</u> en <u>e</u> xpressionsprofile
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
GLUT1	<u>G</u> lucose <u>t</u> ransporter <u>1</u>
Grb2	<u>G</u> rowth factor <u>r</u> eceptor- <u>b</u> ound protein <u>2</u>
GSK3	<u>G</u> lykogensynthese- <u>K</u> inase <u>3</u>
h	<u>S</u> tunde
H ₂ O	<u>W</u> asser
H ₂ O ₂	<u>W</u> asserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	<u>S</u> chwefelsäure
HBS	<u>H</u> EPES- <u>b</u> uffered <u>S</u> aline
HEPES	2-(4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- <u>e</u> thansulfonsäure
HTNC	<u>H</u> istidine- <u>T</u> AT- <u>N</u> LS- <u>C</u> re
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IgH	<u>I</u> mmunglobulin <u>h</u> eavy chain
IKK	<u>I</u> κB <u>k</u> inase
IL-2	<u>I</u> nterleukin- <u>2</u>
IP ₃	<u>I</u> nositol-1,4,5-trisphosphat
IPI	<u>I</u> nternationaler <u>P</u> rognose- <u>I</u> ndex
IRES	<u>i</u> nterne ribosomale <u>E</u> intritt <u>s</u> telle
ITAM	<u>i</u> mmunoreceptor tyrosine-based <u>a</u> ctivation <u>m</u> otif
ITK	<u>I</u> L- <u>2</u> inducible <u>T</u> -cell <u>k</u> inase
ITK-SYK ^{KD}	<u>K</u> inase- <u>d</u> efekte Mutante von ITK-SYK
IκB	<u>i</u> nhibitor of <u>κ</u> <u>B</u>
JAK	<u>J</u> anus <u>K</u> inase
JNK	<u>c</u> -Jun <u>N</u> -terminal <u>k</u> inase
k	<u>k</u> ilo
K	<u>L</u> ysin
KD	<u>k</u> inase- <u>d</u> ead
LAT	<u>l</u> inker for <u>a</u> ctivation of <u>T</u> -cells
LB-Medium	<u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth <u>M</u> edium
Lck	<u>l</u> ymphocyte-specific protein tyrosine <u>k</u> inase
LTR	<u>l</u> ong <u>t</u> erminal <u>r</u> epeat
M	<u>M</u> olar
MALT1	<u>m</u> ucosa <u>a</u> ssociated lymphoid tissue lymphoma <u>t</u> rans- <u>l</u> ocation gene <u>1</u>
MAPK	<u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inase

MAX	<u>Maximum</u>
mCAT-1	<u>murine cationic amino acid transporter 1</u>
Mdm2	<u>mouse double minute 2</u>
MEK	<u>MAPK/Erk kinase</u>
MgCl ₂	<u>Magnesiumchlorid</u>
MHC	<u>major histocompatibility complex</u>
Mig	<u>MSCV IRES GFP</u>
min	<u>Minute(n)</u>
ml	<u>Milliliter</u>
mM	<u>millimolar</u>
MOI	<u>multiplicity of infection</u>
MRD	<u>minimal residual disease</u>
mRNS	<u>messenger RNS</u>
MSCV	<u>murine stem cell virus</u>
mTORC1	<u>mammalian target of rapamycin Complex 1</u>
mTORC2	<u>mammalian target of rapamycin Complex 2</u>
n.d.	<u>nicht detektierbar</u>
NFAT	<u>nuclear factor of activated T-cells</u>
NFκB	<u>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</u>
NHL	<u>Non-Hodgkin-Lymphom</u>
NLS	<u>nuclear localization signal</u>
nm	<u>Nanometer</u>
nM	<u>Nanomolar</u>
p38	<u>p38 mitogen-activated protein kinase</u>
p65	<u>Transkriptionsfaktor p65</u>
PBS	<u>phosphate buffered saline</u>
PCR	<u>Polymerase chain reaction</u>
PDGFR α	<u>platelet-derived growth factor receptor α</u>
PDK1	<u>phosphoinositide-dependent protein kinase 1</u>
PE	<u>Phycoerythrin</u>
PE-Cy5	<u>Phycoerythrin-Cyanine-5</u>
PFA	<u>Paraformaldehyd</u>
PH	<u>pleckstrin homology</u>
pH	<u>potentia hydrogenium</u>
PI3K	<u>Phosphatidyl-3-Kinase</u>
PIP ₂	<u>Phosphatidylinositolbisphosphat</u>
PIP ₃	<u>Phosphatidylinositoltrisphosphat</u>
PKB	<u>Proteinkinase B</u>
PKCθ	<u>Proteinkinase C θ</u>
PLC	<u>Phospholipase C</u>
PMA	<u>Phorbol-12-Myristat-13-Azetat</u>
pS	<u>O-Phosphoserin</u>
pT	<u>O-Phosphothreonin</u>
PTEN	<u>Phosphatase and Tensin homolog</u>
PTK	<u>Proteintyrosinkinase</u>
PTZL	<u>Periphere(s) T-Zell-Lymphom(e)</u>
pY	<u>O-Phosphotyrosin</u>
R	<u>Arginin</u>
Raf	<u>rapidly accelerated fibrosarcoma virus oncogene</u>
RAG	<u>recombination activating gene</u>
Ras	<u>rat sarcoma virus oncogene</u>
RasGRP	<u>Ras guanyl nucleotide-releasing protein</u>
RHD	<u>Rel-homology domain</u>
RNS	<u>Ribonukleinsäure</u>
RPMI	<u>Roswell Park Memorial Institute</u>

RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
S	<u>S</u> erin
S.	<u>S</u> eite
s.	<u>s</u> iehe
syn.	<u>s</u> ynonym für
S.O.C. Medium	<u>s</u> uper <u>o</u> ptimal <u>b</u> rowth with <u>c</u> atabolite <u>r</u> epression <u>M</u> edium
S1	<u>S</u> icherheitsstufe <u>1</u> nach GenTSV
S6K1	protein <u>S6</u> <u>k</u> inase <u>1</u>
sec	<u>S</u> ekunde(n)
SH	<u>S</u> rc <u>h</u> omology
Shc1	<u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>2</u> domain <u>c</u> ontaining <u>t</u> ransforming <u>p</u> rotein <u>1</u>
SLP-76	<u>S</u> H2 domain containing <u>l</u> eukocyte <u>p</u> rotein of <u>76</u> kDa
SMAC	<u>s</u> upramolecular <u>a</u> ctivation <u>c</u> omplex
SOS	<u>S</u> on of <u>S</u> evenless
Src	<u>s</u> arcomavirus tyrosin <u>k</u> inase
STAT	<u>s</u> ignal <u>t</u> ransducers and <u>a</u> ctivators of <u>t</u> ranscription
SYK	<u>S</u> pleen <u>t</u> yrosine <u>k</u> inase
SZT	<u>S</u> tamm <u>z</u> ell <u>t</u> ransplantation
T	<u>T</u> hreonin
t	<u>t</u> ime
t ()	<u>T</u> ranslokation ()
T200 Glykoprotein	Synonym für CD45
TAE	<u>T</u> RIS- <u>A</u> zetat- <u>E</u> DTA
T-ALL	<u>A</u> kute <u>T</u> - <u>L</u> ymphoblasten <u>L</u> eukämie
TAT	<u>t</u> ransactivator of <u>t</u> ranscription
TCGF	<u>T</u> -cell <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
TD	<u>T</u> ransaktivierungsdomäne
Tec	<u>t</u> yrosine <u>k</u> inase <u>e</u> xpressed in <u>h</u> epatocellular <u>c</u> arcinoma
TH	<u>T</u> ec <u>h</u> omology
TK	<u>T</u> yrosin <u>k</u> inase
TM	unregistered <u>T</u> rade <u>M</u> ark
TRAF6	<u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor-associated <u>f</u> actor <u>6</u>
TREC	<u>T</u> cell <u>r</u> eceptor <u>e</u> xcision <u>c</u> ircle
TRIS	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	<u>P</u> olyoxyethylensorbitanmonolaurat
TZR	<u>T</u> - <u>Z</u> ell- <u>R</u> ezeptor(en)
U	<u>U</u> nits
UK	<u>U</u> nited <u>K</u> ingdom
UpM	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
uPTZL	<u>u</u> nspezifizierte(s) <u>p</u> eriphere(s) <u>T</u> - <u>Z</u> ell- <u>L</u> ymphom(e)
USA	<u>U</u> nited <u>S</u> tates of <u>A</u> merica
UV	<u>U</u> ltraviolettstrahlung
µm	<u>M</u> ikrometer
µg	<u>M</u> ikrogramm
µl	<u>M</u> ikroliter
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation
Y	<u>T</u> yrosin
ZAP-70	<u>Z</u> eta-chain-associated protein kinase of <u>70</u> kDa

3 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung und Pathophysiologie des un spezifizierten peripheren T-Zell-Lymphoms. Des Weiteren werden mögliche Therapieansätze gegen diese Krankheitsentität untersucht. Einleitend soll ein Überblick über die Krankheit sowie die zum Verständnis notwendigen biochemischen Grundlagen gegeben werden.

3.1 Das un spezifizierte periphere T-Zell-Lymphom

3.1.1 Klassifikation, Epidemiologie, und Ätiologie

Das periphere T-Zell-Lymphom (PTZL) stellt eine maligne Erkrankung dar, die ihren Ursprung in peripheren bzw. postthymischen T-Zellen oder natürlichen Killerzellen hat [113]. Ungefähr 12% aller Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) gehören dieser heterogenen Gruppe an, die gemäß aktueller WHO-Klassifikation von 2008 nach dem bestimmenden Manifestationsort unterteilt wird [115]. Die Häufigkeit der einzelnen Entitäten variiert mit ethnischer Herkunft und Geographie. Generell stellt das un spezifizierte periphere T-Zell-Lymphom (uPTZL) in Europa mit einem Anteil von 30 bis 50% die größte Subgruppe dar [5, 115]. Vergleichende Untersuchungen der Genexpression zeigen, dass es sich bei dieser um keine homogene Gruppe handelt (vgl. 3.1.4). Die Ätiologie der uPTZL ist, wie die der meisten NHL, weitgehend unklar. Für letztere Gruppe werden Umweltnoxen sowie immunologische und infektiologische Ursachen diskutiert [113].

3.1.2 Diagnostik

Für die Diagnose eines PTZLs werden Morphologie, der Immunphänotyp, der Genotyp sowie die klinische Präsentation berücksichtigt [113]. Kann auf dieser Grundlage keine Einteilung einer reifzelligen T-Zell-Neoplasie getroffen werden, handelt es sich per Definition um ein uPTZL [115]. Hierbei wurden distinkte Varianten wie das lymphoepitheloide [68], das folliculäre [44] oder das perifolliculäre [145] uPTZL beschrieben. Die Morphologie der uPTZL ist sehr variabel [5]. Immunhistochemisch zeigt sich eine unterschiedliche Expression der T-Zell-assoziierten Antigene CD2, CD3, CD5, CD7 [113]. Am häufigsten findet sich CD3 [5]. CD4 lässt sich häufiger (ca. 45%) als CD8 (ca. 15%) nachweisen, wobei Koexpression von CD4 und CD8 oder deren kompletter Verlust in ca. 55% beobachtet werden [5]. CD52 kann in ca. 40% und CD30 in 6% der Fälle detektiert werden [5]. Der Karyotyp weist in den meisten Fällen komplexe Aberrationen mit häufiger Beteiligung von del(5q) und del(9p) auf [115].

Spezifische molekulare Marker konnten für das uPTZL oder distinkte Subgruppen jedoch noch nicht etabliert werden [51].

3.1.2.1 Der Nachweis von Klonalität in peripheren T-Zell-Lymphomen

Neben der Phänotypisierung spielt der Nachweis von Klonalität eine grundlegende Rolle für die Diagnostik von PTZL [5]. Die Diagnose einer malignen lymphoproliferativen Erkrankung lässt sich in den meisten Fällen über zytomorphologische Untersuchungen zusammen mit immunhistologischen und immunphänotypischen Verfahren stellen [168]. In 5-10% der Fälle reichen diese Analysen jedoch alleine nicht aus [168]. Insbesondere periphere T-Zell-Lymphome sind so nur schwierig zu diagnostizieren [131]. Es besteht die Gefahr, sie mit reaktiver Lymphoproliferation, z.B. im Rahmen von autoimmunologischen Geschehen, zu verwechseln [31]. Um den Verdacht einer malignen lymphoiden Erkrankung in zweifelhaften Fällen zu erhärten, kann die Untersuchung auf Klonalität der expandierten Zellen hilfreich sein [168]. In über 98% lymphoider Malignome findet sich auf den Zellen ein gemeinsamer Antigenrezeptor als Ausdruck eines klonalen Ursprungs [168]. Mit der Typisierung des Rezeptorspektrums (Spektratypisierung) lässt sich ein vorherrschender Antigenrezeptor und somit die Klonalität in Lymphomen nachweisen. Neben der Primärdiagnostik kann die Spektratypisierung auch zur Überwachung der Therapie eingesetzt werden [113]. So können verbliebene Tumorzellen bei einer minimalen Rest Erkrankung (engl. *minimal residual disease*; MRD) nachgewiesen werden.

3.1.3 Klinik, Verlauf und Prognosefaktoren

Der Altersgipfel der Patienten liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr bei ausgeglichenem Geschlechterverhältnis [5]. Im Gegensatz zu reifzelligen B-Zell-Lymphomen werden uPTZL meistens im Stadium III-IV nach Ann-Abor diagnostiziert [113]. Hierbei stehen der Befall von Lymphknoten, Haut, Leber, Milz, Knochenmark und peripherem Blut neben B-Symptomatik im Vordergrund. Klinisch gehören uPTZL zu den aggressivsten NHL. Häufig kommt es zu Rezidiven (5-Jahres-Rezidivrate: 74%). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei lediglich 20% [5, 113].

Weder der für B-Zell-Lymphome etablierte Internationale Prognose-Index (IPI) noch die Morphologie spiegeln ausreichend den klinischen Verlauf wieder [5]. Anhand eines modifizierten Indexes unter Berücksichtigung der Parameter Alter, Allgemeinzustand, Lactatdehydrogenasekonzentration im Serum (LDH) sowie Quantität des Proliferationsmarkers Ki-67 kann eine Aussage über die Prognose getroffen werden [5]. Ein älterer prognostischer Index für uPTZL berücksichtigt neben Alter,

Allgemeinzustand und LDH auch die Knochenmarksbeteiligung [65]. Es konnte gezeigt werden, dass CD15-Expression sowie Epstein-Barr-Virusinfektion der Tumorzellen mit einem schlechten Krankheitsverlauf korrelieren [176].

3.1.4 Molekulare Pathogenese

Die molekulare Pathogenese der uPTZL ist kaum verstanden [5]. Um die heterogene Gruppe der uPTZL weiter zu klassifizieren und zugrunde liegende pathogenetische Mechanismen aufzuklären, wurden in einer Reihe von Studien Genexpressionsprofile (GEP) erstellt [5]. Die Ergebnisse sind jedoch in der Gesamtheit schwierig zu interpretieren [43]. Im Folgenden werden die wichtigsten Resultate kurz dargestellt:

Ballester *et al.* konnten drei Gruppen von uPTZL mit spezifischen GEP unterscheiden. Zu den untersuchten Genen gehören jene des JAK/STAT-Signalweges wie auch NFκB, BCL-2 und das Gen für Cyclin D2 [13]. Martinez-Delgado *et al.* konnten zwei Gruppen anhand der Expression NFκB-abhängiger Gene differenzieren. Dabei ist auffällig, dass eine reduzierte Expression dieser Gene mit signifikant erniedrigtem Überleben der Patienten korreliert [105]. Piccaluga *et al.* zeigten, dass uPTZL ein GEP aufweisen, das eng verwandt mit dem von aktivierten T-Zellen ist [127]. Agostinelli *et al.* konnten in uPTZL aufgrund von GEP eine Deregulation von 155 Genen belegen, deren Funktion typischerweise in malignen Zellen gestört ist [5]. Hierzu zählen Gene für Chemosensitivität, Transkription, Proliferation, Apoptose, Matrixalteration und Zelladhäsion. Letztere könnten das disseminierte Befallsmuster der uPTZL erklären [5].

In einer weiteren Studie wies Feldman *et al.* eine Überexpression von SYK in 62 von 66 untersuchten uPTZL nach [60]. Wilcox *et al.* zeigte hierauf, dass SYK-Inhibition zu Apoptose und Zellzyklusarrest in PTZL-Zelllinien führen kann [178].

3.1.5 Therapie

Außerhalb von Studien erfolgt die Primärtherapie von PTZL derzeit mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (CHOP-Schema) [76]. Bei Patienten, die jünger als 60 Jahre sind und sich initial mit erhöhter Lactatdehydrogenasekonzentration im Serum präsentieren, erweist sich die Zugabe von Etoposid als sinnvoll (CHOEP-Schema). Bei lokalisierten Stadien zeigt zudem eine kombinierte Radiochemotherapie Vorteile gegenüber alleiniger Chemotherapie. In der Rezidivsituation sollte eine autologe oder allogene SZT erwogen werden [76]. Vergleichend Patienten mit PTZL und diffus großzelligem B-Zell-Lymphom konnte hier eine Studie nach autologer SZT für erstere Gruppe kein schlechteres Überleben

feststellen [154]. In der Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse scheint die autologe SZT für jüngere Patienten in stabilem Allgemeinzustand eine Therapieoption in der Erstlinie zu sein [76]. Derzeit ist eine prospektive, randomisierte Studie aktiv, in der Patienten (18-60 Jahre) mit PTZL nach Induktionstherapie eine autologe oder eine allogene SZT erhalten (DSHNHL 2006-1A). Für ältere Patienten (>60 Jahre) verfolgt eine weitere Studie (DSHNHL 2006-1B) einen anderen Ansatz. Hier wird die Wirksamkeit einer Antikörpertherapie mit Alemtuzumab zusammen mit CHOP-Chemotherapie bei PTZL untersucht.

Wegen der schlechten Prognose mit konventioneller Chemotherapie werden dringend alternative Therapieansätze für uPTZL benötigt [51]. Erste Ergebnisse liegen für mehrere Pharmaka mit unterschiedlichen Wirkmechanismen vor. Hierzu gehören Histon-Deacetylase-, mTOR- und Proteasominhibitoren sowie Immunmodulatoren und monoklonale Antikörper [181]. Mit dem Antifolat Pralatrexat (FOLOTYN®) wurde von der *Food and Drug Administration* (FDA) ein erstes Medikament speziell gegen rezidivierende und / oder refraktäre PTZL zugelassen [51]. In Europa wurde Pralatrexat 2008 als Arzneimittel gegen seltene Leiden ausgewiesen [55]. Am 19. April 2012 versagte jedoch die europäische Arzneimittelagentur EMA die Genehmigung für das Inverkehrbringen von Pralatrexat [56].

3.2 Biochemische und molekularbiologische Grundlagen

3.2.1 Genumlagerung und Aufbau des T-Zell-Rezeptors

T-Zellen spielen in der adaptiven Immunantwort eine zentrale Rolle [112]. Um Antigene auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) erkennen zu können, besitzen sie spezielle Rezeptoren [41]. Diese T-Zell-Rezeptoren (TZR) bestehen aus je zwei verschiedenen Peptidketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Je nach Phänotyp der T-Zelle paart sich eine α - mit einer β -Kette (α : β -T-Zelle) oder eine γ - mit einer δ -Kette (γ : δ -T-Zelle). Der heterodimere TZR ist nicht-kovalent gebunden an den *cluster of differentiation* (CD)3-Komplex, von welchem die intrazelluläre Signaltransduktion ihren Ursprung nimmt [73]. TZR und CD3 werden zusammen als T-Zell-Rezeptor-Komplex bezeichnet [112]. Der TZR kann Antigenpeptide binden, die ihm über *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-II-Moleküle der APZ angeboten werden [41].

Die für die TZR-Ketten kodierenden Genloci haben für ein vielfältiges Repertoire an Rezeptoren mehrere verschiedener Gensegmente, die in Gruppen zusammengefasst sind: V-(*variable*), J-(*joining*) und C-(*constant*) Segmente [41]. Im TZR β - und TZR δ -

Genlocus existieren zusätzlich D-(*diversity*) Segmente [41]. In der frühen Thymozytenentwicklung wird je eines der verschiedenen V-, D- und J-Gensegmente zu einem funktionellen Gen umgelagert (syn. rekombiniert) [41, 112]. Die V-(D)-J-Genumlagerung wird hierbei durch einen Enzymkomplex vermittelt, der aus Lymphozyten-spezifischen Proteinen (z.B. *recombination activating gene 1/2*; RAG1/2) und ubiquitär exprimierten Enzymen zur DNS-Reparatur (z.B. *DNA-dependent protein kinase*; DNA-PK) besteht [109, 144]. Für Einzelheiten der Reaktionen siehe Abb. 1.

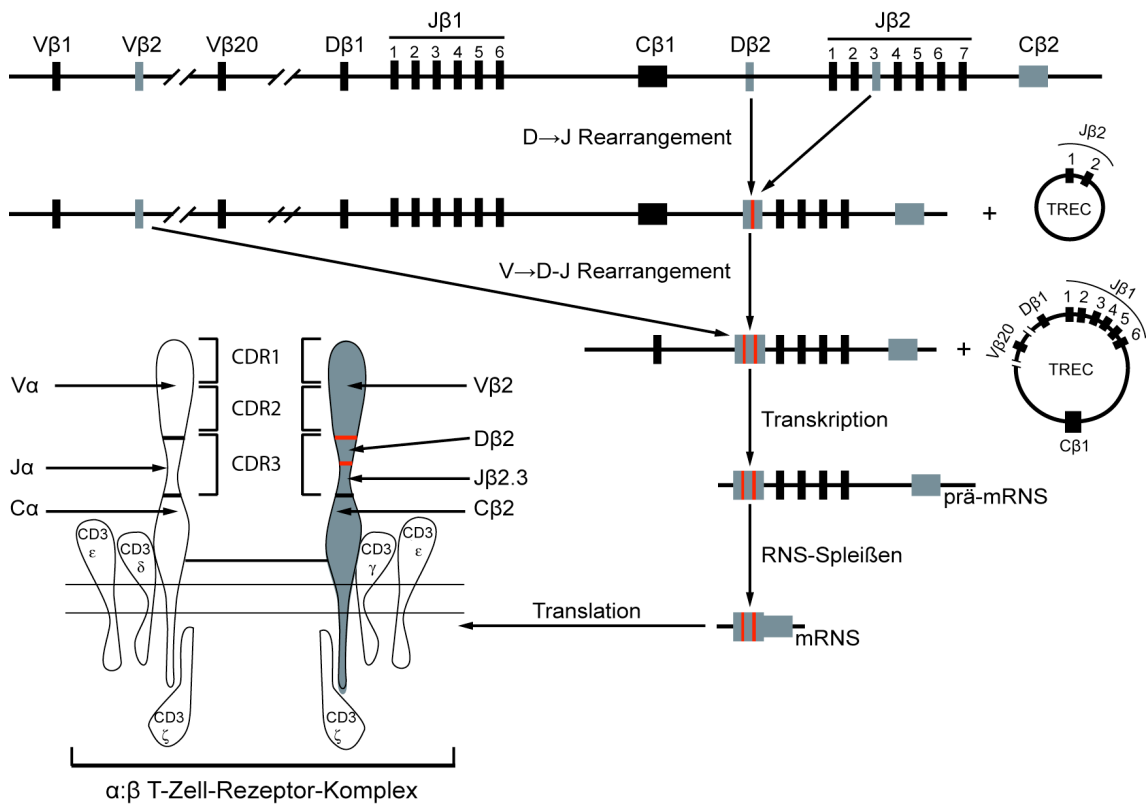


Abb. 1 Schematische Darstellung von Genumlagerung und Expression der β -Kette des murinen T-Zell-Rezeptors

In der obersten Zeile ist der Genlocus der β -Kette des murinen T-Zell-Rezeptors mit seinen Gensegmenten im Zustand der Keimbahn dargestellt. Generell wird zunächst ein D- an ein J-Segment rekombiniert. In diesem Beispiel handelt es sich um $D\beta 2$ und $J\beta 2.3$. An der rot eingezeichneten Anbindungsstelle werden zufällig Nukleotide eingefügt und entfernt. In derselben Weise folgt das $V\beta 2$ -Segment der $D\beta 2$ - $J\beta 2.3$ -Umlagerung. Die Bereiche zwischen den rekombinierten Gensegmenten werden als ringförmige, extrachromosomale DNS-Moleküle (engl. *T cell receptor excision circle*; TREC) entfernt. Anschließend wird das Gen für die β -Kette in prä-mRNA transkribiert. Es folgt das Spleißen zur reifen mRNA, welche in das Protein translatiert wird. Die durch das V-Gensegment kodierten Domänen *complementarity determining regions* (CDR)1 sowie CDR2 binden die MHC-Komponente des Liganden. Die Variabilität dieser Domänen wird durch 20 mögliche V-Gensegmente erreicht. CDR3 interagiert hingegen mit dem für die T-Zelle präsentierten Peptid. Die zufällig eingefügten und entfernten Nukleotide der Anbindungsstellen tragen neben den Kombinationsmöglichkeiten der unterschiedlichen D- und J-Gensegmente entscheidend zur hohen Variabilität dieser Domäne bei. Im dargestellten T-Zell-Rezeptor-Komplex liegt die exprimierte β -Kette im Verbund mit einer α -Kette sowie dem CD3-Korezeptor vor. Abbildung modifiziert nach [67, 112, 168].

Die Genumlagerung in der frühen Thymozytenentwicklung erfolgt in einer hierarchischen Reihenfolge: zunächst werden die Gensegmente des TZR δ - und TZR γ -Genlocus rekombiniert [168]. Dies führt zur Expression eines γ : δ -TZR. Schließt sich ein TZR β - sowie TZR α -Umlagerung an, führt dies zur Deletion des funktionellen TZR δ -Gens mit folgender Expression eines α : β -TZR [168].

Die vielen verschiedenen V-, D- und J-Gensegmente bilden zusammen das kombinatorische Repertoire, das auf $3,0 \times 10^6$ für α : β -TZR und $5,0 \times 10^3$ für γ : δ -TZR geschätzt wird [168]. Die zufällig eingefügten Nukleotide der Anbindungsstellen erhöhen das Gesamtrepertoire für TZR-Moleküle auf über $10,0 \times 10^{12}$ [168].

3.2.1.1 Genumlagerung des T-Zell-Rezeptors in lymphoiden Malignomen

Das Muster der TZR-Genumlagerung in lymphoiden Malignomen spiegelt generell die hierarchische Reihenfolge des physiologischen Rekombinationsprozesses wider: Der TZR β - ist selten ohne den TZR γ -Genlocus rekombiniert sowie TZR γ - selten ohne den TZR δ -Genlocus [168]. Letzterer ist in den meisten Malignomen der T-Zell-Reihe nach erfolgter TCR α -Genumlagerung deletiert [170]. Und dennoch kommt es in manchen malignen lymphoiden Erkrankungen auch zu ungewöhnlichen Rekombinationen, was detailliert für T-ALL beschrieben wurde [160, 168]. Es wird angenommen, dass die anhaltende Aktivität der V-(D)-J-Rekombinase in malignen Zellen zu unphysiologischen Rekombinationen in zugänglichen DNS-Abschnitten führen kann [160]. So finden sich neben funktionellen Genumlagerungen (mit V-D-J Gensegment) auch inkomplette Umlagerungen mit fehlender V-Region, die zusätzlich in einem bereits rekombinierten Allel auftreten können (z.B. V β 1-D β 1-J β 1 zusammen mit D β 2-J β 2) [168, 170]. Auch inkomplette Rekombinationen mit fehlender J-Region und biallelische Rekombinationen wurden beobachtet [7, 95]. Ebenso findet sich in Malignomen des γ : δ -Phänotyps häufig ein rekombinierter TZR β -Genlocus sowie in T-Zell-Malignomen allgemein ein rekombinierter Genlocus der schweren Immunglobulinkette (IgH) [168]. Aus diesem Grund lässt sich aus der Analyse der TZR- und IgH-Genloci auch keine Aussage über den Phänotyp der malignen Zellen treffen [168].

3.2.2 Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptor-Komplexes

„Fast alle Aspekte des Zelllebens werden durch reversible Phosphorylierung von Proteinen kontrolliert [...]“ [36]. So stellt die Aktivierung von Tyrosin- und Serin-Threonin-Kinasen auch ein wichtiges Prinzip in der Signaltransduktion des TZR dar [153]. Diese phosphorylieren multiple intrazelluläre Zielstrukturen wie Adapterproteine oder Transkriptionsfaktoren. In der Folge kommt es zur Veränderung des

Zytoskeletts und zur Expression von zahlreichen Genen, die eine spezifische Immunantwort ermöglichen [112]. Hierzu gehören Gene für Zytokinsekretion, Proliferation, Überleben und Differenzierung der Zellen [153].

Nach Ligandenbindung des TZR kommt es zur Aktivierung von Proteintyrosinkinasen (PTK) der *sarcomavirus tyrosinkinase* Familie (Src) [153]. Insbesondere *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck), die konstitutiv assoziiert mit dem Korezeptor CD4 oder CD8 vorliegt, spielt in der weiteren Signalkaskade eine wichtige Rolle [14]. Der Mechanismus dieser Aktivierung ist jedoch noch nicht ganz verstanden. Es scheint neben einer Konformationsänderung [8, 71] und Aggregation des TZR-Komplexes [91, 108] auch die Ausbildung einer immunologischen Synapse von Bedeutung zu sein [118, 148]. Bei jener handelt es sich um die Kontaktzone zwischen T-Zelle und APZ, die auch *supramolecular activation complex* (SMAC) genannt wird [153]. Hier finden sich vermehrt Membranbereiche mit hohem Gehalt an Cholesterin und Glycosphingolipiden, die als „*lipid rafts*“ bezeichnet werden [130]. Es wird angenommen, dass hier die Signaltransduktion des TZR initiiert wird [53].

Nach Aktivierung von Lck phosphoryliert diese PTK die *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) der ζ -Kette von CD3 [153]. Die ITAMs dienen so als Bindungsstelle für die *zeta-chain associated protein kinase 70* (Zap-70), einer PTK der *Spleen tyrosine kinase* Familie (SYK) [29]. Nach Rekrutierung wird Zap-70 durch Lck phosphoryliert und somit aktiviert [153]. Auch Autophosphorylierung trägt zur Aktivierung des Moleküls bei [12]. Aktives Zap-70 phosphoryliert Adaptermoleküle, die der konsekutiven Signaltransduktion dienen [153].

Untersuchungen zeigen, dass neben Zap-70 auch die strukturell homologe Kinase SYK an der Signaltransduktion von reifen T-Zellen beteiligt ist [90]. Aufgrund eines differenziellen Expressionsmusters der beiden Kinasen ging man lange Zeit von einer dominanten Rolle von SYK in B-Zellen sowie Zap-70 in peripheren T-Zellen aus [29, 30]. Eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien weisen jedoch auf eine nicht-redundante Funktion von SYK neben Zap-70 in der Signaltransduktion des muren TZR hin [30, 35, 89, 90, 96, 147]. Ein besonderes Beispiel hierfür ist der Nachweis einer gesteigerten Expression von SYK nach Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen [90]. Auch die Erkenntnis über die Fähigkeit von SYK die Kinase Lck direkt binden und phosphorylieren zu können ist erwähnenswert [96]. Eine distinkte Rolle von SYK und Zap-70 in der Signaltransduktion des prä-TZR und somit in der frühen Entwicklung von Thymozyten ist ebenfalls bekannt [119].

Zu den Zielstrukturen von SYK / Zap-70 zählen die kooperierenden Proteine *linker for activation of T cells* (LAT) und *Src homology 2 domain containing leukocyte protein of*

76 kD (SLP-76) [147, 153]. Diese stehen über *Grb2-related adapter downstream of Shc* (Gads) in Verbindung [21]. Zusammen bilden sie das Rückgrat des in Abb. 2 (s. Seite 19) gezeigten proximalen Signalkomplexes [153]. Neben weiteren Adapterproteinen wie *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) rekrutiert und aktiviert dieser auch Effektormoleküle wie Vav1, *IL-2-induced tyrosine kinase* (ITK) und Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) [153]. ITK und Vav1 tragen hierbei neben ihrer katalytischen Aktivität zur Stabilität des Signalkomplexes bei [47, 134].

Das zur Familie der *tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma* (Tec) gehörende ITK benötigt für die volle enzymatische Aktivität neben der Bindung an den proximalen Signalkomplex auch eine Phosphorylierung durch Lck [19]. Hierfür wird ITK über seine *pleckstrin homology* (PH-)Domäne, welche Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) erkennt, an die Zellmembran rekrutiert. Das PIP₃ entsteht durch Lck-induzierte, lokale Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) [153]. ITK kann daraufhin PLC- γ 1 phosphorylieren und somit aktivieren [19]. PLC- γ 1 hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) der Zellmembran zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) [61]. Bei diesen handelt es sich um wichtige sekundäre Botenstoffe (engl. *second messenger*), die Signalwege hin zu den Transkriptionsfaktoren *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) anschalten [153]. Ein weiterer Signalweg distal des konstitutiv an GRB2 gebundenen GTP-Austauschfaktors *Son of sevenless* (SOS) verläuft über das kleine *G-Protein rat sarcoma* (Ras) zu dem Transkriptionsfaktor *activator protein 1* (AP-1) [61]. In T-Zellen ist eine wichtige Aufgabe von NFAT, NF κ B und AP-1 zusammen die Expression von Interleukin-2 (IL-2) zu stimulieren, welches essenziell für Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen ist [112].

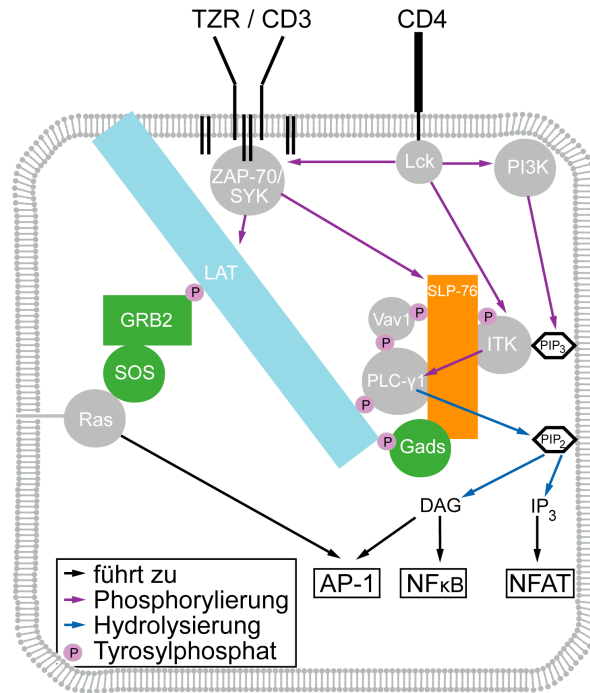


Abb. 2 Proximaler Signalkomplex des T-Zell-Rezeptors

Die Ligation des T-Zell-Rezeptors bewirkt als Ergebnis die Aktivierung von Proteintyrosinkinassen der Src, Syk und Tec Familie mit folgender Aktivierung von Ras- sowie PLC-γ1-abhängigen Signalwegen hin zu AP-1, NFAT und NFκB. Für Einzelheiten und Abkürzungen siehe Text. Abbildung modifiziert nach [153].

3.2.2.1 Der Signalweg zur Aktivierung von AP-1

Das durch PLC-γ1 generierte Molekül DAG diffundiert in der Zellmembran, wo es neben Proteinkinase C θ (PKCθ) auch das Protein *Ras guanyl nucleotide-releasing protein* (RasGRP) bindet [54, 140]. Die so aktivierte PKCθ phosphoryliert RasGRP und steigert so dessen enzymatische Aktivität [140]. RasGRP ist ein GTP-Austauschfaktor, der spezifisch Ras aktiviert [54]. Wie unter 3.2.2 beschrieben, wird der Ras-Signalweg auch über SOS aktiviert. Neuere Untersuchungen zeigen, dass es sich hierbei in T-Zellen lediglich um eine Verstärkerschleife handelt und die initiale Produktion von aktivem Ras die Funktion von RasGRP voraussetzt [141].

Von Ras führt der Signalweg über die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK-) Kaskade zu dem Transkriptionsfaktor AP-1 [98]. Diese Kaskade besteht aus konsekutiv aktivierten Proteinkinassen und führt von *rat fibrosarcoma* (Raf) über *MAP/Erk kinase* (Mek) zu *extracellular signal regulated kinase* (Erk) [142]. Letztere gelangt schließlich in den Zellkern, wo sie eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktiviert, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren [142]. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist AP-1, der durch die Kooperation von Erk mit *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) aktiviert wird [112]. Wie JNK in T-Zellen reguliert wird,

ist noch nicht ganz verstanden [153]. Zytokine (z.B. TNF α) und Stressfaktoren wie UV-Licht oder osmotischer Stress spielen eine Rolle [143]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass bei der Aktivierung von JNK auch *caspase recruitment domain membrane associated guanylate kinase 1* (Carma1; vgl. 3.2.2.2) beteiligt ist [22]. Eine weitere MAP-Kinase, die durch Stressfaktoren, Zytokine und den TZR aktiviert wird, ist p38. Diese ist für Zellwachstum und Apoptose von Bedeutung [3, 49, 161]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass p38 direkt das Signal durch den TZR zu beeinflussen vermag [172].

3.2.2.2 Der Signalweg zur Aktivierung von NF κ B

Ein weiterer durch PKC θ angeschalteter Signalweg führt zur Aktivierung von NF κ B [153]. Dieser Transkriptionsfaktor ist unter anderem in T-Zellen bedeutend für Aktivierung, Proliferation, Überleben und Effektorfunktionen [146].

Die NF κ B-Proteinfamilie setzt sich aus fünf Mitgliedern zusammen: NF κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105), NF κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100), RelA (p65), RelB und c-Rel [70]. Die Proteine bilden Homo- sowie Heterodimere, wobei eine gemeinsame N-terminale *Rel-homology domain* (RHD) die Dimerisierung vermittelt [167]. Die RHD erkennt außerdem spezielle DNS-Abschnitte (κ B-Bindungsstellen) und interagiert mit dem *inhibitor of κ B* (I κ B) [167]. Letzterer bindet NF κ B im Zytosol und verhindert so den Übertritt in den Zellkern. RelA, RelB und c-Rel besitzen zudem eine Transaktivierungsdomäne (TAD), mit der die Transkription spezifischer Zielgene gefördert wird [70].

Die aktivierte PKC θ phosphoryliert das Adapterprotein Carma1 [153]. Dies setzt die Formierung eines trimolekularen Komplexes in Gang, der aus Carma1 sowie dem Adapterprotein *B-cell lymphoma 10* (Bcl10) und der Paracaspase *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1* (MALT1) besteht [167]. Dieser sog. CBM-Komplex (CARMA1-Bcl10-MALT1) wird auch als Signalosom bezeichnet und leitet die Aktivierung der *I κ B Kinase* (IKK) ein [167]. Ein wichtiger Mechanismus führt hierbei über MALT1, das an Bcl10 bindet und die E3 Ubiquitinligase *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6) aktiviert [158]. In der Folge wird I κ B durch die katalytische Untereinheit der IKK phosphoryliert und so für die Ubiquitylierung markiert. Der konsekutive proteasomale Abbau von I κ B führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, der nun die Kernmembran überwinden und an entsprechende DNS-Abschnitte (s.o.) binden kann [167]. Kürzlich wurde gezeigt, dass MALT1 mit seiner proteolytischen Aktivität das NF κ B-Signal steigern kann [133].

Dies geschieht durch Spaltung von A20, welches als deubiquitylierendes Enzym ein Negativregulator von NFκB ist [37].

3.2.2.3 Der Signalweg zur Aktivierung von NFAT

Das durch PLC-γ1 generierte Molekül IP₃ öffnet Ionenkanäle am endoplasmatischen Retikulum [153]. Hier herrscht eine hohe Konzentration an Kalziumionen (Ca²⁺) [116]. Folglich erhöht sich die Konzentration an Ca²⁺ im Zytosol, was kalziumabhängige Kalziumkanäle der Zellmembran (engl. *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels*; CRACs) öffnet und zu einem Kalziuminflux in die Zelle führt. Die Kalziumionen binden an Calmodulin, worauf dieses eine Vielzahl an Enzymen regulatorisch beeinflusst [116]. Eines davon ist die zytosolische Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin. Nach Aktivierung durch Bindung von Ca²⁺-Calmodulin dephosphoryliert Calcineurin den im Zytosol befindlichen Transkriptionsfaktor NFAT [102]. Dessen konstitutive Phosphorylierung erfolgt durch Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) und Casein Kinase 1 (CK1) [116]. Durch Dephosphorylierung wird die Kernlokalisierungssequenz demaskiert und NFAT kann im Nukleus die Expression einer Vielzahl von Genen für die T-Zell-Aktivierung regulieren [116]. Hierfür kooperiert er mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1 zur Produktion von IL-2 [102].

3.2.3 Signaltransduktion des CD28-Korezeptors

Das Signal durch den T-Zell-Rezeptor ist alleine nicht ausreichend, um naive T-Zellen zu aktivieren [137]. Zusätzlich bedarf es kostimulatorischer Moleküle wie CD2, CD5 oder CD28, wobei letzteres dazu den wichtigsten Beitrag zu leisten scheint [2].

Nach Bindung des CD28-Korezeptors auf der Oberfläche von T-Zellen an seinen Liganden B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) auf APZ, kommt es auf der zytosolischen Seite von CD28 zu Tyrosinphosphorylierung durch Lck [137]. Hierdurch wird das Enzym PI3K rekrutiert [2]. PI3K kann durch Lck sowie SYK phosphoryliert werden, worauf es mit PIP₃ eine Bindungsstelle für *phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK1) und dessen Ziel Proteinkinase B (Akt) schafft [2, 147]. Die Rekrutierung zur Zellmembran führt zur Aktivierung der beiden Enzyme. Akt phosphoryliert daraufhin multiple Proteine, was zu Zellüberleben, Proliferation und gesteigertem Zellmetabolismus führt (s. Abb. 3 auf Seite 22). Ein wichtiger Schritt in der Aktivierung von Akt besteht in der Serinphosphorylierung durch *mammalian target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) [184]. Die Funktion von mTORC1 und mTORC2 wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. So können Informationen zu Energiestatus, Hypoxie, DNS-Schaden, Wachstumsfaktoren durch mTORC1 und

mTORC2 integriert werden [184]. Mittels Phosphorylierung von *eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1* (4E-BP1) und *protein S6 kinase 1* (S6K1) kann mTORC1 unmittelbar die Proteinsynthese stimulieren [184]. Insbesondere letztere Funktion wird durch Rapamycin inhibiert [184].

Der aktivierte CD28-Korezeptor kann auch direkt das Signal durch den TZR steigern. Hierfür binden sowohl Lck, ITK als auch Grb2 (s. 3.2.2) an die zytoplasmatische Seite von CD28, was u.a. zu einer gesteigerten Sekretion von IL-2 führt [137].

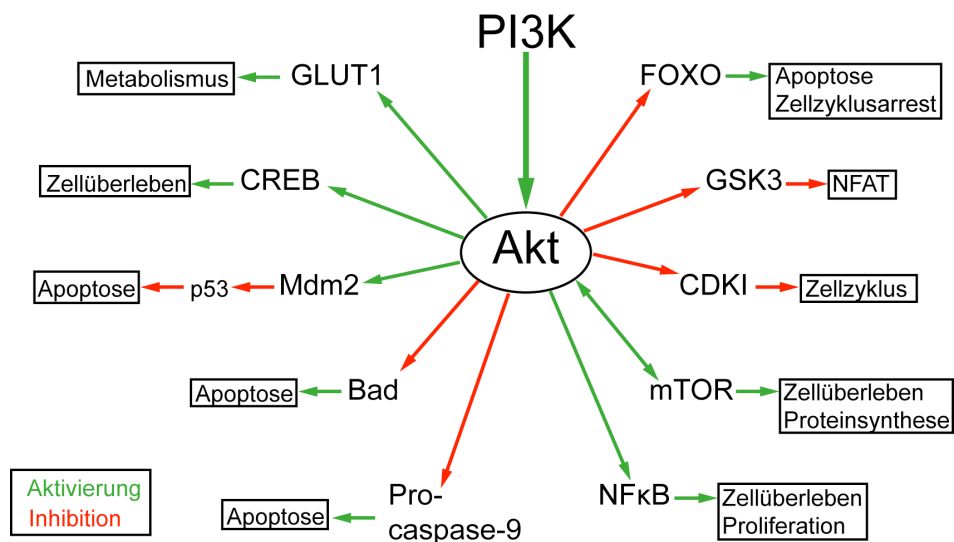


Abb. 3 Zielstrukturen von Akt

Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) führt zu Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) durch *phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK1). Akt wiederum aktiviert und inhibiert eine Vielzahl von Proteinen, was zu Zellüberleben, Proliferation, erhöhtem Zellmetabolismus und gesteigerter Proteinsynthese führt: *Glucose transporter 1* (GLUT1), *cyclic adenosine monophosphate response element-binding* (CREB), *mouse double minute 2* (Mdm2), *Bcl-2-associated death promoter* (Bad), *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB), *mammalian target of rapamycin* (mTOR), *cyclin-dependent kinase inhibitor* (CDKI), *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3), *Forkhead box protein O* (FOXO), *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT). Abbildung modifiziert nach [18].

3.2.4 Signaltransduktion des IL-2-Rezeptors

IL-2, das auch als T-Zell-Wachstumsfaktor (engl. *T-cell growth factor*; TCGF) bezeichnet wird, spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung von T-Zellen [117]. Nach Sekretion durch aktivierte T-Zellen wirkt dieses Zytokin auto- und parakrin über den IL-2-Rezeptor auf der Zelloberfläche [100]. Der Rezeptor besteht aus zwei Ketten (β und γ), von denen die Signaltransduktion ihren Ursprung

nimmt [117]. Die biologische Aktivität sowie Affinität des Rezeptors zu IL-2 kann durch die induzierbare α -Kette (auch CD25 genannt) gesteigert werden [139].

Nach Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor werden Tyrosinkinase der *Janus kinase* (JAK-)Familie durch Auto- und Transphosphorylierung aktiviert (JAK1 und JAK2) [17]. Diese sind nicht-kovalent an den Rezeptor gebunden. Ein weiteres Substrat der Kinasen befindet sich an den zytoplasmatischen Abschnitten der β - und γ -Kette [117]. Diese fungieren als Bindungsstellen für *signal transducers and activators of transcription* (STATs) [117]. Nach Rekrutierung an den IL-2-Rezeptor werden STATs durch JAK phosphoryliert. Dadurch lagern sie sich als Dimere zusammen und dienen im Nukleus als Transkriptionsfaktoren [17]. Im Falle des IL-2 Rezeptors handelt es sich bei diesen um STAT3 und STAT5.

Neben STAT bindet auch *Src homology 2 domain containing transforming protein 1* (Shc1) an die Tyrosylphosphate des IL-2-Rezeptors [17]. Shc1 ist eine Adapterprotein, das Grb2 bindet und so zur Aktivierung des Signalweges über SOS/Ras/MEK/Erk führt (s. 3.2.2.1). Neben SOS kann auch *GRB2-associated-binding protein 2* (Gab2) an Grb2 anlagern, was zur Aktivierung des PI3K-Signalweges führt (s. 3.2.3) [117]. Mehrere Untersuchungen weisen zudem auf eine Beteiligung von SYK an der Signaltransduktion des IL-2-Rezeptors hin [82, 107, 117, 183].

3.3 ITK-SYK im unspezifizierten peripheren T-Zell-Lymphom

Streubel *et al.* gelang in einer Subgruppe follikulärer uPTZL die Translokation t(5;9)(q33;q22) als wiederkehrendes Ereignis zu identifizieren [157]. Die Translokation verbindet Genabschnitte der Tyrosinkinase ITK auf Chromosom 5 und SYK auf Chromosom 9 (s. Abb. 4 auf Seite 24). Beide Tyrosinkinase spielen in der Signaltransduktion von Antigenrezeptoren eine essentielle Rolle. Im vorangegangenen Kapitel wurde dies für den T-Zell-Rezeptor-Komplex dargestellt. Eine Beteiligung von SYK an der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren wurde am Beispiel des IL-2-Rezeptors aufgezeigt.

Die Expression des Fusionsgenes ITK-SYK wird durch den in T-Zellen aktiven Promotor von ITK reguliert [157]. Erwartungsgemäß konnte durch Streubel *et al.* neben der genomischen Translokation auch das Fusionsprotein in den untersuchten Tumorzellen nachgewiesen werden.

In ITK-SYK finden sich N-terminal die *Tec homology* (TH-) und die PH-Domäne von ITK [157]. Letztere bindet an PIP₃ und dient so zur Rekrutierung von ITK an die Zellmembran, wo diese aktiviert wird [84]. Die Funktion der Prolin-reichen TH-Domäne

ist bisher schlecht verstanden [111]. Sie scheint zusammen mit der *Src homology 3* (SH3-) und *Src homology 2*(SH2-) Domäne wichtig für die Autoinhibition von ITK zu sein [84, 111]. Der Verlust der SH2- und SH3-Domäne in ITK-SYK legt eine beeinträchtigte allosterische Inhibition der PH-Domäne nahe. In der Folge könnte diese konstitutiv an PIP₃ binden [111].

Eine fehlende Autoinhibition der Proteintyrosinkinase (PTK-)Domäne von SYK im Fusionsprotein ist ebenfalls anzunehmen. Sie wird im SYK-Molekül durch die Interdomäne A bewirkt, die sich zwischen den Tandem-SH2-Domänen befindet und im Fusionsprotein fehlt [10, 157]. Die Tandem-SH2-Domänen von SYK sind wichtig für die kooperative Interaktion mit phosphorylierten ITAMs auf Immunrezeptoren [10]. In der Interdomäne B von SYK befinden sich die meisten Andockstellen für Interaktionspartner [147]. Der Großteil dieser Domäne ist in ITK-SYK vorhanden [157].

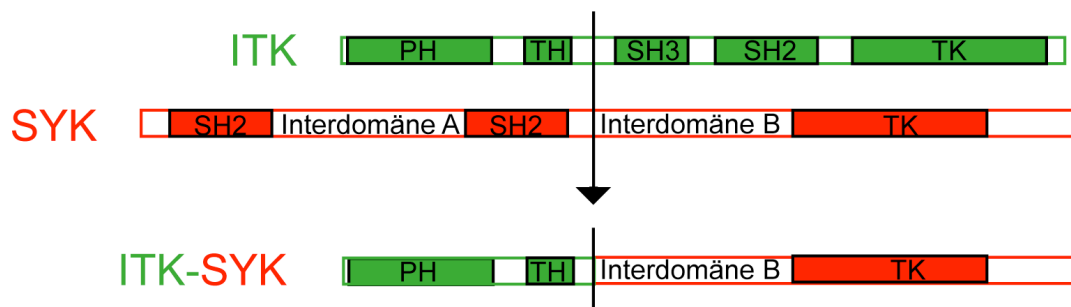


Abb. 4 Aufbau der Fusionstyrosinkinase ITK-SYK

N-terminal der Fusionstyrosinkinase ITK-SYK finden sich die *pleckstrin homology* (PH-) sowie die *Tec homology* (TH-) Domäne aus ITK. Die Tyrosinkinase (TK-) Domäne und ein Großteil der Interdomäne B des SYK-Moleküls stellen den C-terminalen Abschnitt von ITK-SYK dar. Im Fusionsprotein fehlen die *Src homology 3* (SH3-), *Src homology 2* (SH2-) sowie die TK-Domäne aus ITK. Ferner fehlen die Tandem-SH2-Domänen und die Interdomäne A aus SYK. Für Einzelheiten siehe Text. Abbildung modifiziert nach [157].

4 Fragestellung und Vorgehensweise

4.1 Untersuchung zur Zelltransformation durch ITK-SYK im Mausmodell

Das unspezifizierte periphere T-Zell-Lymphom stellt ein aggressives Malignom mit schlechter Prognose dar [51, 113]. Die molekulare Pathogenese ist kaum verstanden und es fehlt an Kleintiermodellen, um dringend benötigte, zielgerichtete Therapiestrategien zu etablieren [5, 123].

Die Translokation t(5;9)(q33;q22) mit Expression des Fusionsproteins ITK-SYK konnte für eine Untergruppe von uPTZL als wiederkehrendes Ereignis identifiziert werden [157]. Ein vergleichbares histologisches Muster sowie ein gleicher Immunphänotyp dieser Subgruppe lässt eine Beteiligung der Mutation an der Lymphomentstehung vermuten. Um diese Hypothese zu testen, wurden von Pechloff *et al.* zwei Mausmodelle mit konditionaler Expression von ITK-SYK generiert [123]:

Unter dem CD4- oder CD19-Promotor wird in diesen Modellen jeweils eine Cre-Rekombinase exprimiert. Dieses Enzym entfernt hier ein entsprechend markiertes, transkriptionelles Stoppsignal vor dem ebenfalls artifiziell eingebrachten ITK-SYK-Gen im ROSA26-Locus. Für das Mausmodell mit Expression der Cre-Rekombinase unter dem CD4-Promotor wird so eine T-Zell-spezifische Expression von ITK-SYK erreicht. Im Falle des CD19-Promotors wird eine B-Zell-spezifische Expression angestrebt. Jedoch ist hier zusätzlich von einer seltenen und atypischen Expression des Fusionsproteins in der T-Zelllinie auszugehen, da in beiden Mausmodellen eine lymphoproliferative Erkrankung durch ITK-SYK exprimierende T-Zellen zu beobachten ist. Diese Erkrankung ähnelt klinisch, immunhistologisch und immunphänotypisch dem humanen Krankheitsbild [123]. Um die sichere Diagnose eines PTZLs stellen zu können, bedarf es zusätzlich des Nachweises von Klonalität [5]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hierfür eine molekularbiologische Methode auf Grundlage der Polymerasekettenreaktion etabliert, die eine Typisierung des TZR-Spektrums ermöglicht (Spektratypisierung). Die Erkenntnisse fanden Einzug in die Publikation von Pechloff *et al.* [123].

4.2 Analyse der Signaltransduktion von ITK-SYK sowie der zellulären Folgen der ITK-SYK-Expression

Das Fehlen dringend benötigter, zielgerichteter Therapiestrategien für uPTZL hängt mit der kaum verstandenen molekularen Pathogenese dieser Erkrankung zusammen [5]. Anhand der in einer Subgruppe von uPTZL auftretenden Fusionstyrosinkinase ITK-SYK ergab sich die Möglichkeit, molekulare Zusammenhänge der Pathogenese zu beleuchten [157]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es, die durch ITK-SYK aktivierten Signalwege sowie die zellulären Folgen der ITK-SYK-Expression zu analysieren. Der Fokus lag auf der Charakterisierung der Signaltransduktion, um so potentielle Strukturen für zielgerichtete Therapiestrategien identifizieren zu können.

Der Aufbau des ITK-SYK-Moleküls mit fehlenden Domänen der Autoinhibition ließ uns von einer konstitutiv aktiven Form von SYK ausgehen (vgl. 3.3). Entsprechend suchten wir in der Literatur nach physiologischen Zielstrukturen von SYK in peripheren T-Zellen (s. 3.2.2 bis 3.2.4). Aus diesen Erkenntnissen entwickelten wir die Hypothese, dass ITK-SYK antigen- und zytokinunabhängig aktivierende Signalwege der T-Zelle anzuschalten vermag. Die Tatsache, dass das Genexpressionsprofil von uPTZL mit jenem von aktivierten T-Zellen vergleichbar ist, unterstützt dieses Vorgehen ebenfalls [127]. Um unsere Hypothese zu testen, kamen transgene Jurkat-Zellen zur Anwendung, mit welchen ein leicht zu handhabendes sowie für die Fragestellung etabliertes Modellsystem zur Verfügung stand [1, 77]. Hierbei kamen sich ergänzende Methoden zum Einsatz, wie die Analyse intrazellulärer Phosphorylierung von Signalproteinen oder die Inhibition wichtiger Moleküle innerhalb aktivierender Signalwege der T-Zelle. Alternativ zur immortalisierten Zelllinie untersuchten wir, ob ITK-SYK auch in murinen CD4-positiven T-Zellen zur Aktivierung führen kann. Die Wahl fiel auf diesen Zelltyp, da humane uPTZL mit nachgewiesener $t(5;9)(q33;q22)$ vorrangig CD4 exprimieren [157]. Zum Einsatz kam hierbei die Technik der Proteintransduktion *in vitro*.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit über die Funktionsweise der Fusions-tyrosinkinase ITK-SYK fanden überwiegend Einzug in die Publikation von Pechloff *et al.* [123]. Anzumerken sei, dass die Generierung sowie die histopathologische und durchflusszytometrische Analyse der Mausmodelle nicht Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit ist.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	BioRad, München
Agarosegelkammer und -kämme	BioRad, München
Durchflusszytometer FACSCalibur™	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCantoll™	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Einfrierbox Nalgene® Mr Frosty™	Fisher Scientific, Schwerte
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
ELISA-Reader Sunrise™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Gefrierschrank (-20°C)	Siemens, Berlin
Gefrierschrank (-80°C)	SanyoBiomedical, Wood Dale, USA
Kühlschrank (-4°C)	Siemens, Berlin
Kühlzentrifuge Rotina 420 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührgerät	Ika GmbH&Co, Staufen
Mikrowelle Bomann MW 1226 CB	Clatronic, Kempen
Neubauer Zählkammer	Reichert, New York, USA
Rollmischer CAT RM 5	Labortechnik Fröbel, Lindau
Schüttelinkubator innova 4000	Eppendorf, Hamburg
Sequenzierautomat ABI Prism® 3700	Applied Biosystems, Darmstadt
Spektralphotometer Nanodrop™	Peqlab, Erlangen
Sterile Werkbank Typ KS18	Thermo Scientific, Langenselbold
Stickstofftank LS 4800 (-196°C)	tec-lab, Königstein
Stromgenerator Powerpack™	BioRad, München
Thermocycler	BioRad, München
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
UV-Detektionsgerät Gel Doc 2000	BioRad, München

5.1.2 Chemikalien und biogene Substanzen

7-Amino-Actinomycin D	BD Pharmingen, Heidelberg
Agarose	Cambrex, Baltimore MD, USA
Aqua ad iniectabilia	Diaco Biomedical, Trieste, Italien
Aqua destillata	Delta Select, Pfullingen
Chloroquin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix 25mM	Bioline, Luckenwalde
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (0,7mg/ml)	Eurobio, Les Ulis, Frankreich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ionomycin (Iono)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ; 25mM)	Applied Biosystems, Darmstadt

Methanol	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Millipore, Billerica, USA
POP-7 Polymer [®]	Applied Biosystems, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzidine	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Tween20 [®]	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

5.1.3 Standardlösungen und Puffer

Coating Puffer für ELISA	Beckton-Dickinson, Heidelberg
DNS-Probenpuffer (10x)	TAE-Puffer Glycerol (Volumenanteil 50%) Xylencyanol (Volumenanteil 0,05%)
Erythrozyten-Lysepuffer	eBioscience, San Diego, USA
FACS-Puffer	PBS mit FCS (Volumenanteil 3,0%)
HBS-Puffer	Aqua destillata NaCl (c _{final} =40,0mM) Na ₂ HPO ₄ (c _{final} =0,75mM) HEPES (c _{final} =25mM)
HEPES-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS (1x)	Roth, Karlsruhe
PCR-Puffer (10x)	Amersham Biosciences, Freiburg
PCR-Puffer (10x)	Applied Biosystems
TAE-Puffer (50x)	Aqua destillata Essigsäure (Volumenanteil 1,1%) EDTA (c _{final} =10,0mM) TRIS-Base (c _{final} =4,0M)

5.1.4 Molekulargewichtsmarker für DNS

GeneScan [®] ROX-500HD Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker 100bp	Peqlab, Erlangen

5.1.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	5'-FAM TM (Fluoreszenz- Markierung)	Referenz
ITK-SYK-Vorwärts	GATGGATGGGAAGTGGAGGTG	nein	-
ITK-SYK-Rückwärts	GGACCAAGTT CTGCCATCTC	nein	-
CD4-Cre-Vorwärts	ACCAGCCAGCTATCAACTCG	nein	-
CD4-Cre-Rückwärts	TTACATTGGTCCAGCCACC	nein	-
CD19-Cre-Vorwärts (1)	TCAGCTACACCAGAGACGG	nein	-
CD19-Cre-Vorwärts (2)	AACCATTCA ACACCCTTCC	nein	-
CD19-Cre-Rückwärts	CCAGACTAGATACAGACCAG	nein	-
TZRβ-Vβ1	AAATGAGACGGTGCCAGTCGTT	nein	[67]
TZRβ-Vβ2	TCCTGGGGACAAAGAGGTCAAATC	nein	[67]
TZRβ-Vβ3	GAAAAACGATTCTCTGCTGAGTGTCC	nein	[67]
TZRβ-Vβ4	AGCTATCAAAAACCTTATGGACAATCAG	nein	[67]
TZRβ-Vβ5	CAGCAGATTCTCAGTCCAACAGTTT	nein	[67]
TZRβ-Vβ6	AAGGCGATCTATCTGAAGGCTATGA	nein	[67]
TZRβ-Vβ7	AGCTGATTTATATCTCATACGATGTTG	nein	[67]
TZRβ-Vβ8	TATATGTAAGGATCGGCAGGACA	nein	[67]
TZRβ-Vβ9	TTCCAATCCAGTCGGCCTAACAAT	nein	[67]
TZRβ-Vβ10	GCGCTTCTCACCTCAGTCTTCAG	nein	[67]
TZRβ-Vβ11	TTCTCAGCTCAGATGCCCAATCAG	nein	[67]
TZRβ-Vβ12	AGCTGAGATGCTAAATTCATCCTTC	nein	[67]
TZRβ-Vβ13	CTGCTGTGAGGCCTAAAGGAATAA	nein	[67]
TZRβ-Vβ14	AGAGTCGGTGGTGAACCTGAACCT	nein	[6]
TZRβ-Vβ15	CCCATCAGTCATCCCAACTTATCC	nein	[6]
TZRβ-Vβ16	GATTTTAGGACAGCAGATGGAGTTTC	nein	[67]
TZRβ-Vβ17	TCGAAATGAAGAAATTATGGAACAAAC	nein	[67]
TZRβ-Vβ18	CCGGCCAAACCTAACATTCTCAAC	nein	[67]
TZRβ-Vβ19	CTACAAGAAACCGGGAGAAGAACTC	nein	[67]
TZRβ-Vβ20	CTGGTATCAACAAAAGCAGAGCAAA	nein	[67]
TZRβ-Dβ1	GAGGAGCAGCTTATCTGGTGGTTT	nein	[67]
TZRβ-Dβ2	GTAGGCACCTGTGGGAAGAAACT	nein	[6]
TZRβ-Jβ1	CACAACCCCTCCAGTCAGAAATG	ja	[67]
TZRβ-Jβ2	TGAGAGCTGTCTCCTACTATCGATT	ja	[6]
TZRγ-Vγ4	AGTGTTCAAGCCCGATGCA	nein	[86]
TZRγ-Jγ1	AGAGGGAATTACTATGAGCT	ja	[86]

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Primer

Anmerkung:

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

5.1.6 Antikörper

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Verw. Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen Antikörper:				
Esel anti-Kaninchen IgG	-	PE	1:10	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus Antikörper:				
anti-Maus CD4	GK 1.5	PE	1:250	eBioscience, San Diego, USA
anti-Maus CD4	GK 1.5	APC	1:200	eBioscience, San Diego, USA
anti-Maus CD8	53-6.7	Pe-Cy5	1:250	eBioscience, San Diego, USA
anti-Maus CD11b	M1/70	-	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus CD25	PC61	PE	1:250	eBioscience, San Diego, USA
anti-Maus CD44	IM7	Pe-Cy5	1:250	eBioscience, San Diego, USA
anti-Maus CD62L	MEK14	PE	1:200	eBioscience, San Diego, USA
anti-Maus CD69	H1.2F3	Pe-Cy5	1:100	eBioscience, San Diego, USA
Dynabeads® Mouse panB	-	-	1:42	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dynabeads® Mouse CD8	-	-	1:70	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dynabeads® Schaf-anti-Ratte-IgG	M-450	-	1:70	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ziege anti-Maus IgG	-	-	s. 5.2.3.7	Jackson Immuno Research, Soham, UK
anti-Human Antikörper:				
anti-Human CD3ε	HIT3a	-	s. 5.2.3.7	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human CD28	CD28.2	-	s. 5.2.3.7	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human CD69	FN50	Pe	1:25	eBioscience, San Diego, USA
anti-Human pAkt (pS473)	M89-61	AF647	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pCD3ζ (pY142)	K25-407.69	AF647	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pErk1/2 (ppT202/pY204)	20A	Pe	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pJNK (pY171)	-	-	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pLAT (pY171)	I58-1169	Pe	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pLck (pY505)	4/Lck-Y505	AF647	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pp38 (pT180/pY182)	36/p38	AF647	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pPLCγ1 (pY783)	27/PL	AF647	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pSLP-76 (pY128)	J141-668.36.58	Pe	1:10	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Human pSTAT5 (pY694)	47	AF647	1:10	BD Bioscience, Heidelberg

Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Antikörper

5.1.7 Rekombinante Proteine

His-TAT-NLS-Cre (HTNC)

Herr Professor Dr. Frank Edenhofer
Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
Universität Köln

5.1.8 Enzyme

Amplitaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq-DNS-Polymerase (5U/ μ l)	Amersham Biosciences, Freiburg
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.1.9 Inhibitoren

AEB071	Novartis, Basel, Schweiz
BMS-345541	Calbiochem, Darmstadt
Bortezomib	Janssen-Cilag, Neuss
Curcumin	Sigma-Aldrich Biochemie, Hamburg
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich Biochemie, Hamburg
Helenalin	Calbiochem, Darmstadt
Ly294002	Calbiochem, Darmstadt
PD98059	Calbiochem, Darmstadt
R406	Rigel, South San Francisco, USA
Rapamycin	Sigma-Aldrich Biochemie, Hamburg
SB203580	Calbiochem, Darmstadt
SP600125	Calbiochem, Darmstadt
z-VRPR-fmk	Alexis Biochemicals, Grünberg

5.1.10 Zellkulturmedien und Medienzusätze

DMEM ¹⁰⁺ -Medium	Gibco [®] DMEM FCS (Volumenanteil 10%) L-Glutamin ($c_{\text{final}}=2,0\text{mM}$) Penicillin/Streptomycin ($c_{\text{final}}=1,0\text{u/ml}$) β -Mercaptoethanol ($c_{\text{final}}=50\mu\text{M}$)
Einfriermedium	Gibco [®] RPMI 1640 FCS (Volumenanteil 20%) DMSO (Volumenanteil 20%)
LB-Medium	Aqua destillata Hefeextrakt ($c_{\text{final}}=5,0\text{g/l}$) Trypton ($c_{\text{final}}=10\text{g/l}$) Natriumchlorid ($c_{\text{final}}=0,6\text{g/l}$)
RPMI ⁵⁺ -Medium	Gibco [®] RPMI 1640 FCS (Volumenanteil 5,0%) L-Glutamin ($c_{\text{final}}=2,0\text{mM}$) Penicillin/Streptomycin ($c_{\text{final}}=1,0\text{u/ml}$) β -Mercaptoethanol ($c_{\text{final}}=50\mu\text{M}$)
RPMI ¹⁰⁺ -Medium	Gibco [®] RPMI 1640 FCS (Volumenanteil 10%) L-Glutamin ($c_{\text{final}}=2,0\text{mM}$) Penicillin/Streptomycin ($c_{\text{final}}=1,0\text{u/ml}$) β -Mercaptoethanol ($c_{\text{final}}=50\mu\text{M}$)
Stimulationsmedium	Gibco [®] RPMI 1640 FCS (Volumenanteil 1,0%) β -Mercaptoethanol ($c_{\text{final}}=50\mu\text{M}$)

Transfektionsmedium	Gibco® DMEM FCS (Volumenanteil 1,0%) Penicillin/Streptomycin ($c_{\text{final}}=1,0\text{u/ml}$)
Fötale Kälberserum (FCS)	Perbio Science Deutschland, Bonn
Gibco® RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100u/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
S.O.C. Medium	New England Biolabs, Ipswich, USA
β -Mercaptoethanol (50mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.1.11 Reagenziensätze

GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Hamburg
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Kit	Machery-Nagel, Düren
OptEIA™ Human IL-2 ELISA Set	BD, Heidelberg
Wizard® SC Genomic DNA	Promega, Mannheim

5.1.12 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen –groß–	Beckton-Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen –klein–	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Falcon™ 50ml-Röhrchen	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Falcon™ ELISA 96-Loch-Platte	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Falcon™ Zellkultur 96-Loch-Platte (Flachboden)	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Falcon™ Zellsieb (100 μm , 75 μm)	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
PCR-Röhrchen	Brand, Mannheim
Pipettenspitzen gestopft (10 μl , 20 μl , 100 μl , 200 μl , 1000 μl)	Molecular BioProducts, San Diego,
Pipettenspitzen ungestopft (10 μl , 20 μl , 100 μl , 200 μl , 1000 μl)	Hartenstein, Würzburg
Reaktionsgefäß (500 μl , 1500 μl , 2500 μl)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter Millex® GV 0,22 μm	Millipore, Billerica, USA
Sterilfilter Millex® GV 0,45 μm	Millipore, Billerica, USA
Zellkultur 15ml-Röhrchen	TPP, Trasadingen
Zellkultur 24-Loch-Platte	TPP, Trasadingen
Zellkultur 6-Loch-Platte	TPP, Trasadingen
Zellkultur 96-Loch-Platte (Rundboden)	TPP, Trasadingen
Zellkultur 96-Loch-Platte (Spitzboden)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturflasche (25cm ² , 75cm ² , 150cm ²)	TPP, Trasadingen
Zellkulturplatte-Petrischale (10cm, 15cm)	TPP, Trasadingen

5.1.13 Verwendete retrovirale Expressionsvektoren

- MSCV-IRES-eGFP (Mig):
Mithilfe von regulatorischen LTR-Elementen („*Long Terminal Repeats*“) des murinen Stammzellvirus (MSCV) wird eine hohe Expression des eingefügten Gens in den Zielzellen erreicht [121]. Außerdem beinhaltet der hier verwendete Vektor das Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP), dessen Expression unter der Regulation einer „Internen Ribosomen-Eintrittsstelle“ (IRES) steht [72]. Mittels des eGFP lässt sich die Infektionseffizienz überprüfen und es können die infizierten Zellen gezielt verfolgt werden [20].
- ITK-SYK:
Mig-Vektor mit eingefügter *cDNA* von ITK-SYK [123].
- ITK-SYK^{KD}:
Mig-Vektor mit eingefügter, modifizierter *cDNA* von ITK-SYK. Durch Aminosäureaustausch von Lysin zu Arginin an Position 262 des Proteins (K262R) wurde die ATP-Bindungsstelle der Kinasedomäne inaktiviert (engl. ITK-SYK *kinase dead*; ITK-SYK^{KD}) [123].

Die verwendeten Plasmide wurden wie beschrieben hergestellt [123] und waren im Labor der Arbeitsgruppe Ruland vorhanden.

5.1.14 Verwendete Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5 α Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.1.15 Verwendete Zelllinie

- 3T3-Zellen:
Murine Fibroblasten-Zelllinie [164].
- Phoenix-Zellen:
Humane embryonale Nierenzelllinie, die Retroviren auf Basis des murinen Stammzellvirus produziert. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Phoenix-Zellen verwendet, deren Viren ausschließlich Zielzellen infizieren, die mCAT-1 exprimieren (ecotrope Viren) [72, 114].
- Jurkat-Zellen:
Humane T-ALL-Zelllinie. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Zellen verwendet, die mit mCAT-1 den Rezeptor für ecotrope murine Retroviren exprimieren [77].

Die verwendeten Phoenix- und Jurkat-Zellen wurden uns freundlicherweise von G.P. Nolan (Stanford University, Kalifornien) zur Verfügung gestellt. 3T3-Zellen bezogen wir von Ontario Cancer Institute in Toronto.

5.1.16 Verwendete Mäuse

- CD4-Cre:
Gentechnisch veränderte Maus, bei der unter Kontrolle des CD4-Promotors eine Cre-Rekombinase in T-Zellen exprimiert wird [97].
- CD19-Cre:
Gentechnisch veränderte Maus, bei der unter Kontrolle des CD19-Promotors eine Cre-Rekombinase in B-Zellen exprimiert wird [135].
- Rosa26^{loxSTOPllox-ITK-SYK}:
Gentechnisch veränderte Maus mit eingefügtem ITK-SYK-Gen in einem Allel des ubiquitär exprimierten Rosa26-Genlocus. Aufgrund eines vorangehenden, transkriptionellen Stopp-Signals wird ITK-SYK nicht exprimiert. Dieses Signal wird von zwei Markierungen flankiert (loxP), welches die Entfernung durch eine Cre-Rekombinase mit folgender Expression von ITK-SYK erlaubt. 5' des ITK-SYK-Gens wurde die kodierende Sequenz von eGFP eingebracht [123].
- ITK-SYK^{CD4-Cre}:
In dieser Mauslinie wird unter Kontrolle des CD4-Promotors eine transgene Cre-Rekombinase spezifisch in T-Zellen exprimiert. Folglich wird in diesen Zellen die entsprechend markierte Stopp-Kassette vor dem ebenfalls artifiziell eingebrachten ITK-SYK-Gen deletiert (s.o.). Die Folge ist eine T-Zell spezifische Expression von ITK-SYK und eGFP [123].
- ITK-SYK^{CD19-Cre}:
In dieser Mauslinie wird unter Kontrolle des CD19-Promotors eine transgene Cre-Rekombinase spezifisch in B-Zellen exprimiert. Folglich wird in diesen Zellen die entsprechend markierte Stopp-Kassette vor dem ebenfalls artifiziell eingebrachten ITK-SYK-Gen deletiert (s.o.). Die Folge ist eine B-Zell spezifische Expression von ITK-SYK und eGFP [123].
- C57/Bl6:
Inzucht-Stamm, auf dessen genetischen Hintergrund die Mausmodelle mit konditionaler Expression von ITK-SYK entstanden [123].

- OTII:

Gentechnisch veränderte Maus mit artifiziell eingebrachtem T-Zell-Rezeptor, der den MHC-II präsentierten Peptidabschnitt von Aminosäure 323 bis 339 von Ovalbumin erkennt [15].

Alle verwendeten Mäuse waren in der Zucht der Arbeitsgruppe Ruland vorhanden.

5.1.17 Verwendete Software

Adobe IllustratorCS Version 11.0.0	Adobe Systems, San Jose, USA
Adobe PhotoshopCS Version 8.0.1	Adobe Systems, San Jose, USA
BD FACSDiva Software Version 6.1.2	Beckton-Dickinson, Heidelberg
CellQuest Pro Software	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Endnote Version X4	Thomson Reuters, New York, USA
FlowJo Software Version 8.8.2 für Mac	Tree Star Inc., Ashland OR, USA
GenMapper® Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
Microsoft Office 2004 für Mac	Microsoft, Redmond, USA

5.2 Methoden

5.2.1 Arbeiten mit Mäusen

5.2.1.1 Haltung

Die zu untersuchenden Mäuse wurden unter Standardbedingungen frei von spezifischen Pathogenen gemäß institutioneller sowie gesetzlicher Richtlinien der Regierung von Oberbayern gehalten.

5.2.1.2 Genotypisierung der verwendeten Mäuse

Die Genotypisierung der verwendeten Mäuse erfolgte für ITK-SYK, CD4-Cre und CD19-Cre über eine jeweils spezifische Polymerasekettenreaktion (engl. PCR). Zunächst wurde mithilfe eines Kitsystems (Promega, Mannheim) aus einem 0,5cm langen Stück Mausschwanz die DNS entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Anschließend wurde die DNS in einem PCR-Röhrchen mit den für die Reaktion benötigten Substanzen versetzt. Für einen Ansatz von 25µl wurden eingesetzt:

• 10x PCR-Puffer (Amersham)	2,5µl	
• dNTP-Mix (2,5 mM)	2,0µl	
• Extrahierte DNS	1,0µl	
• Entsprechende(r) Vorwärtsprimer* (10µM)	0,5µl (pro Primer)	
• Entsprechender Rückwärtsprimer* (10µM)	0,5µl	*s. 5.1.5
• Taq Polymerase (Amersham)	0,2µl	
• Aqua ad iniectabilia	ad 25 µl	

Zur Amplifikation wurden die in Tabelle 3 (S. 36) aufgeführten Programme eingestellt.

ITK-SYK:			
Zyklus:	Denaturierung:	Anlagerung:	Elongation:
0	5min; 95°C	-	-
1-30	30sec; 95°C	30sec; 58°C	34sec; 72°C
31	-	-	10min; 72°C
CD4-Cre:			
Zyklus:	Denaturierung:	Anlagerung:	Elongation:
0	2min; 95°C	-	-
1-15	30sec; 95°C	30sec; 64°C	30sec; 72°C
16-35	30sec; 95°C	30sec; 58°C	30sec; 72°C
36	-	-	10min; 72°C
CD19-Cre:			
Zyklus:	Denaturierung:	Anlagerung:	Elongation:
0	2min; 95°C	-	-
1-30	45sec; 95°C	45sec; 57°C	50sec; 72°C
31	-	-	10min; 72°C

Tabelle 3 PCR-Zyklusprotokolle für die Genotypisierung der verwendeten Mäuse

Auftrennung und Nachweis der PCR-Produkte erfolgte wie unter 5.2.5.3 beschrieben, wobei folgende Größen zu erwarten sind:

ITK-SYK 569bp
 CD4-Cre 200bp
 CD19-Cre 492bp (Wildtyp-Allel) und 715bp (CD19-Cre)

5.2.2 Allgemeine Arbeiten mit Zellen

5.2.2.1 Allgemeine Bedingungen für die Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten wurden an Sterilwerkbänken mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden nur sterile Zellkulturmaterialien, sterile Lösungen sowie autoklavierte Pipetten verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem Volumenanteil von 5,0% CO₂ (Standardkulturbedingungen).

5.2.2.2 Zentrifugation

Soweit nicht anders beschrieben, wurden Zellen stets mit 350g für 5min bei 4°C zentrifugiert.

5.2.2.3 Bestimmung von Zahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Konzentration lebender Zellen wurden 10µl einer Zellsuspension mit Trypanblau von 1:2 bis 1:20 verdünnt und anschließend mittels einer Neubauer-Zählkammer nach Herstellerangaben ausgezählt. Hierbei färbt Trypanblau wegen seiner negativen Ladung nur absterbende und tote Zellen, deren Membran es

überwinden kann [163]. Pro Zellsuspension wurde die Zellzahl als Mittelwert aus mindestens drei Zählungen ermittelt.

5.2.3 Arbeiten mit Zelllinien

5.2.3.1 Kultivierung

Jurkat-Zellen wurden in RPMI¹⁰⁺-Medium in einer Konzentration von $0,1 \times 10^6/\text{ml}$ bis $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ bei Standardbedingungen in Kultur gehalten.

Phoenix-Zellen wurden in DMEM¹⁰⁺-Medium in einer Dichte von $6,0 \times 10^3/\text{cm}^2$ bis $30,0 \times 10^3/\text{cm}^2$ bei Standardbedingungen in Kultur gehalten.

3T3-Zellen wurden in DMEM¹⁰⁺-Medium in einer Dichte von $1,0 \times 10^3/\text{cm}^2$ bis $5,0 \times 10^3/\text{cm}^2$ bei Standardbedingungen in Kultur gehalten.

5.2.3.2 Passagieren von adhärennten Zellen

Zur Vermeidung eines Wachstumsarrests aufgrund von Kontaktinhibition wurden adhärennte Zellen regelmäßig neu ausplattiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit sterilem PBS gewaschen. Durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C von der Kulturschale abgelöst. Anschließend wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS in DMEM¹⁰⁺-Medium resuspendiert und in entsprechender Konzentration auf neue Kulturschalen gebracht.

5.2.3.3 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden zunächst $5,0 \times 10^6$ Suspensionszellen oder $1,0 \times 10^6$ adhärennte Zellen in 500µl reinem RPMI 1640 Medium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach Zugabe von 500µl Einfriermedium wurden die Zellen dann in einer mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox für 24h bei -80°C langsam abgekühlt, um sie schließlich bei minus 196°C in flüssigem Stickstoff zu lagern. Das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie das langsame Abkühlen mithilfe des Isopropanols in der Einfrierbox reduzieren die Bildung von zytopathischen Eiskristallen [124].

Für das Auftauen wurden die Zellen nach Entnahme aus dem Flüssigstickstoff für zwei Minuten bei Raumtemperatur angewärmt und schließlich in entsprechendes Kulturmedium mit 37°C überführt. Vor Inkulturnahme folgten zwei Waschschriffe mit Medium, um das zytotoxische DMSO zu entfernen.

5.2.3.4 Kalzium-Phosphat-Transfektion

Um ITK-SYK in Jurkat-Zellen zu exprimieren und folglich dessen Signaltransduktion untersuchen zu können, wurde die Technik des retroviralen Gentransfers angewandt. Hierbei wird eine virale einsträngige RNS mithilfe der reversen Transkriptase in DNS umgeschrieben [106]. Diese wird dann mit dem Enzym Integrase in das Genom der Zielzelle eingefügt.

Zur Herstellung der Retroviren wurden Phoenix-Zellen mit retroviralen Expressionsvektoren auf Basis des MSCV-IRES-eGFP- (Mig-)Vektors (s. 5.2.3.4) transient transfiziert [72]. Die einzuschleusende DNS bindet hierbei an Kalzium-Phosphat-Kristalle und wird endozytotisch von den Zellen aufgenommen [32]. Anschließend wird sie transkribiert und die so entstandene RNS in infektiöse Viruspartikel verpackt. Die hierfür benötigten Gene für Struktur- und Hüllproteine (gag und env) sowie für die Enzyme reverse Transkriptase und Integrase (pol) werden von den Phoenix-Zellen zur Verfügung gestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Phoenix-Zellen verwendet, die replikationsdefekte ecotrope Viruspartikel produzieren. Diese Retroviren infizieren effizient und sehr spezifisch nur Zielzellen mit ecotropen Rezeptor [9, 72, 114]. Bei diesem Membranprotein handelt es um einen kationischen Aminosäuretransporter (mCAT-1), der sich natürlicherweise auf Zellen der Maus befindet [174]. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich genetisch modifizierte humane Jurkat-Zellen verwendet, die ebenfalls diesen Rezeptor exprimieren [77]. Aufgrund der Spezifität der viralen Partikel konnten Transfektion und Infektion in S1-Laboren gemäß GenTSV durchgeführt werden.

Am Tag vor der Transfektion wurden pro 15cm-Zellkultur-Petrischale $6,75 \times 10^6$ Phoenix-Zellen in 22,5ml Transfektionsmedium ausgelegt. Nach 12h folgte bei einer Konfluenz von 50 – 80% eine Vorbehandlung für 30min mit Chloroquin ($c_{\text{final}}=38,0\mu\text{M}$), das lysosomale DNasen hemmt und so die Transfektionseffizienz erhöht [122]. Während dieser Inkubation im Begasungsbrutschrank wurden die Expressionsvektoren vorbereitet. 22,5 μg des gewünschten Plasmids wurden in 50 μl Aqua ad iniectabilia gelöst. Es folgte die Zugabe von 112,5 μl Kalziumchlorid ($c_{\text{stock}}=25\text{mM}$) sowie 1125 μl HBS-Puffer (pH 6,93). Nach vorsichtigem Mischen wurde die Suspension 15min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die vorbehandelten Phoenix-Zellen aufgebracht. 6h und 24h nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, bevor nach 48h und 72h der Virusüberstand geerntet und steril filtriert wurde (Porengröße des Filters: 0,45 μm).

5.2.3.5 Titration des Virusüberstandes

Um zwischen den Experimenten eine möglichst gleichbleibende Qualität des Virusüberstandes zu gewährleisten, wurde dessen Multiplizität der Infektion (MOI) bestimmt. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis infektiöser Partikel zu deren Zielzellen. Es wurden hierfür 3T3-Zellen benutzt [164].

Zunächst wurden $5,0 \times 10^4$ Zellen in 2ml DMEM¹⁰⁺-Medium pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgelegt. Nach 24h wurde das Medium durch 3ml Virusüberstand in mehreren Verdünnungsstufen ersetzt (1:0, 1:1, 1:20, 1:100 - Verdünnung jeweils mit DMEM¹⁰⁺-Medium). Zusätzlich wurde zur Erleichterung der Infektion Polybren (Hexadimethrinbromid) in einer Konzentration von 4µg/ml eingesetzt [40]. Es wird vermutet, dass das kationische Polymer die Abstoßung aufgrund gleicher Ladung zwischen Viruspartikel und Zelloberfläche reduziert [32]. Am dritten Tag wurden die Zellen mithilfe von Trypsin-EDTA geerntet und der Anteil infizierter Zellen bestimmt. Aufgrund der eGFP-Expression der infizierten Zellen (s. 5.2.3.6) konnte dies mittels Durchflusszytometrie auf eGFP-positive Zellen erfolgen. Anhand der Zellzahl pro Loch konnte so die Menge eingesetzter infektiöser Partikel und entsprechend die MOI berechnet werden.

5.2.3.6 Retrovirale Infektion

Um ITK-SYK bzw. IKT-SYK^{KD} in Jurkat-Zellen zu exprimieren, wurden diese mit entsprechenden Retroviren (s. 5.2.3.4) infiziert. Als Kontrolle dienten Retroviren auf der Basis des unveränderten Mig-Vektors, die in den Zielzellen nur zu eGFP-Expression führen. Bei den verwendeten Vektoren wird mittels regulatorischer LTR-Elementen („*Long Terminal Repeats*“) des murinen Stammzellvirus (MSCV) eine hohe Expression des eingefügten Gens in den Zielzellen erreicht. Außerdem beinhaltet der Vektor das Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP), dessen Expression unter der Regulation einer „Internen Ribosomen-Eintrittsstelle“ (IRES) steht [121]. Mithilfe des eGFP lässt sich die Infektionseffizienz überprüfen. Die Infektionsrate der vorliegenden Experimente lag abhängig vom Zeitpunkt nach Infektion bei ca. 25% (t=24h) sowie ca. 70% (t=48h). Ebenfalls können mithilfe von eGFP die infizierten Zellen gezielt verfolgt werden [20].

Für die Untersuchung der Signaltransduktion von ITK-SYK in T-Zellen fiel die Wahl auf Jurkat-Zellen, da mit diesen ein etabliertes Modellsystem für die Fragestellung zur Verfügung stand [1].

Zunächst wurde die benötigte Anzahl an Jurkat-Zellen abzentrifugiert und in Virusüberstand in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ /ml resuspendiert. Dem Virusüberstand

wurden zuvor zugesetzt: β -Mercaptoethanol ($c_{\text{final}}=50\mu\text{M}$), L-Glutamin ($c_{\text{final}}=2,0\text{mM}$), Polybren ($c_{\text{final}}=4\mu\text{g/ml}$), HEPES-Puffer ($c_{\text{final}}=24\text{mM}$). Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine 6-Loch-Platte mit 4,0ml pro Loch ausgebracht. Um die Infektionsrate zu erhöhen, wurden die Zellen für 90min bei 30°C mit 2400UpM zentrifugiert („*Spin-infection*“). Es folgten zwei Waschschriffe in RPMI¹⁰⁺-Medium. Vor weiterer Verwendung wurden die Zellen für 12h in einer Konzentration von $0,1 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI¹⁰⁺-Medium gehalten. Nach dieser Zeit konnte erstmalig das retrovirale eGFP via Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Für weitere Experimente wurde dieser Zeitpunkt als $t=0\text{h}$ definiert. Für Experimente zur Analyse der intrazellulären Proteinphosphorylierung (s. 6.3.1), die sehr hohe Zellzahlen benötigen, wurden die Zellen nach retroviraler Infektion in einer Konzentration von $5,0 \times 10^6/\text{ml}$ gehalten. Dieser erhöhten Zelldichte ist mit zweimaligem Mediumwechsel 12h und 24h nach Infektion Rechnung getragen worden.

5.2.3.7 Stimulationsexperimente

Um in Jurkat-Zellen die Folgen der ITK-SYK-Expression mit denen herkömmlicher T-Zell-Stimulationen zu vergleichen, wurden die mit dem unveränderten Mig-Vektor infizierten Zellen auf zwei unterschiedliche Arten stimuliert:

- a) Für eine möglichst physiologische Stimulation von Jurkat-Zellen wurde der T-Zell-Rezeptor (CD3 ϵ -Untereinheit) und der CD28-Kostimulationsrezeptor unter Verwendung spezifischer Antikörper vernetzt [38]. Auf diese Weise wird der Kontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle mit folgender Rezeptoraggregation simuliert (s.3.2.2). Dies führt zur Aktivierung intrazellulärer, Antigenrezeptor-spezifischer Signalkaskaden [38].
- b) Für eine starke Stimulation wurden PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) und Ionomycin verwendet [33]. PMA, ein Phorbol-ester mit struktureller Ähnlichkeit zu Diacylglycerin (DAG), fungiert in T-Zellen als ein potenter Aktivator von Protein-kinase C θ (PKC θ) und damit auch von Transkriptionsfaktor NF- κ B. Ionomycin hingegen induziert wie Inositoltrisphosphat (IP₃) den Kalzium-Influx und nimmt hauptsächlich Einfluss auf die Aktivierung von NFAT [33].

zu a)

Für lange Stimulationszeiten (s. 6.2.1) wurde mit plattengebundenem anti-CD3 ϵ und löslichem anti-CD28 Antikörper stimuliert. Zunächst wurde der Boden der Vertiefungen einer FalconTM 96-Loch-Platte mit in PBS verdünntem anti-Maus IgG Antikörper ($c_{\text{final}}=10\mu\text{g/ml}$) beschichtet. Dies geschah in einem Volumen von 50 μl pro Loch für 12h bei 4°C. Der Antikörper wird hierbei durch hydrophobe Wechselwirkungen an dem Material der 96-Loch-Platte adsorbiert. Nach einem Waschschrift mit reinem PBS wurde in PBS verdünnter anti-CD3 ϵ Antikörper ($c_{\text{final}}=10\mu\text{g/ml}$) für 1h bei 37°C hinzugegeben. Dessen F_c-Teil wird von dem plattengebundenem anti-Maus IgG Antikörper erkannt. Nach einem weiteren Waschschrift folgten pro Loch 2,0x10⁵ Jurkat-Zellen in 100 μl RPMI¹⁰⁺-Medium. Nach Zugabe von 100 μl RPMI¹⁰⁺-Medium pro Loch mit anti-CD28 Antikörper ($c_{\text{final}}=2\mu\text{g/ml}$) wurden die Zellen zentrifugiert und so in Kontakt mit dem anti-CD3 Antikörper gebracht.

Für kurze Stimulationszeiten (s. 6.3.1.2) wurden mit löslichen anti-CD3 ϵ und anti-CD28 Antikörper stimuliert. Zunächst wurden die mit dem unveränderten Mig-Vektor infizierten Jurkat-Zellen in einer Konzentration von 5,0x10⁶/ml für 30min bei 4°C im Stimulationsmedium ruhen gelassen. Anschließend wurden die Antikörper anti-CD3 ϵ ($c_{\text{final}}=3\mu\text{g/ml}$) und anti-CD28 ($c_{\text{final}}=1\mu\text{g/ml}$) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30min bei 4°C auf dem Rollmischer. Hierauf wurden die Zellen bei 425g für 3min abzentrifugiert, um sie im selben Volumen mit 37°C warmen Stimulationsmedium zusammen mit anti-Maus IgG Antikörper ($c_{\text{final}}=1\mu\text{g/ml}$) zu resuspendieren. Dieser erkennt den F_c-Teil der zuvor verwendeten Antikörper und führt so zur Vernetzung der Epitope mit folgender Stimulation. Die Stimulation wurde durch Zugabe von kaltem PBS und anschließender Fixierung mit Paraformaldehyd (finaler Volumenanteil 2,0 %) beendet.

zu b)

Für die Stimulation mit PMA/Ionomycin wurden 2,0x10⁵ Zellen in 100 μl RPMI¹⁰⁺-Medium pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgelegt. Pro Loch wurden dann 100 μl RPMI¹⁰⁺-Medium mit PMA ($c_{\text{final}}=50\text{nM}$) und Ionomycin ($c_{\text{final}}=50\text{nM}$) hinzugefügt.

5.2.3.8 Inhibitionsexperimente

Um wichtige Zielstrukturen der Signaltransduktion von ITK-SYK zu identifizieren, wurden ITK-SYK exprimierende Jurkat-Zellen mit Inhibitoren inkubiert. Danach wurde der Einfluss der Inhibition auf die Aktivierung durch ITK-SYK untersucht. Dies geschah über Bestimmung der IL-2-Sekretion (s. 5.2.3.9) im Vergleich zu ITK-SYK exprimierenden Jurkat-Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel des jeweiligen Inhibitors

inkubiert wurden. In Abb. 5 sind die Zielstrukturen der verwendeten Inhibitoren im Kontext aktivierender Signalwege der T-Zelle dargestellt.

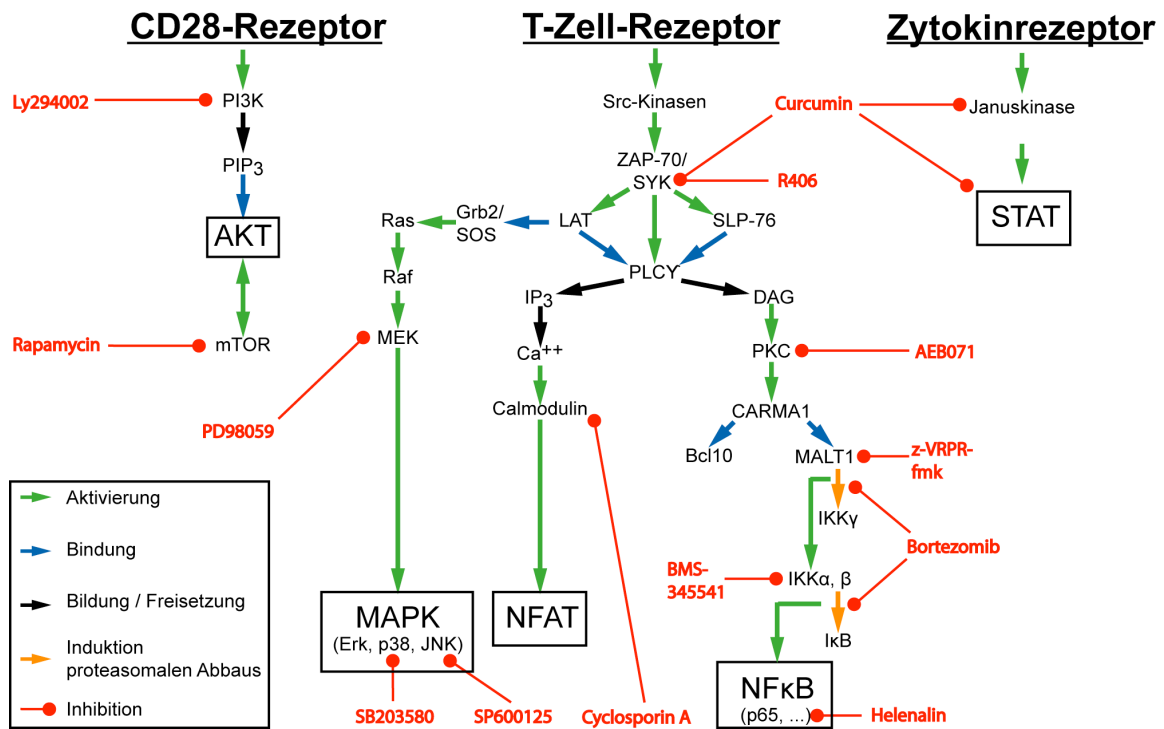


Abb. 5 Zielstrukturen der verwendeten Inhibitoren im Kontext aktivierender Signalwege der T-Zelle

Die rot dargestellten Inhibitoren wurden so ausgewählt, dass ein Großteil der aktivierenden Signalwege in T-Zellen berücksichtigt wird. Die abgebildeten Signalwege sind vereinfacht wiedergegeben. Für eine detaillierte Darstellung s. 3.2.2 bis 3.2.4.

Die Inhibitoren wurden in dem entsprechenden Lösungsmittel gelöst und gemäß Herstellerangaben gelagert. Zunächst wurde mithilfe mehrerer Verdünnungsreihen für jeden Inhibitor die optimale Arbeitskonzentration ermittelt (Experimente nicht gezeigt). Als Kriterium galt die bestmögliche Inhibition von CD69-Expression sowie IL-2-Sekretion bei tolerierbarem Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Letztere Bedingung galt als erfüllt, wenn im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach der Inkubationszeit mehr als 80% der Zellen gemäß 7-AAD-Färbung als lebendig identifiziert wurden (s. 5.2.6.4). Als Orientierung dienten Konzentrationswerte aus der Literatur mit möglichst vergleichbaren Rahmenbedingungen (s. Tabelle 4 auf Seite 43).

<u>Inhibitor</u>	<u>Zielstruktur</u>	<u>Lösungs- mittel</u>	<u>verwendete Endkonzentration</u>	<u>mittlere Endkonzentration in Literatur</u>
AEB071	PKC	DMSO	1,0µM	0,5 µM [58]
BMS-345541	IKKβ	DMSO	10µM	1µM [4]
Bortezomib	Proteasom	H ₂ O	6,25nM	50nM [101]
Curcumin	Syk, JAK, ...	DMSO	5,0µM	20,0µM [52, 132]
Cyclosporin A	Calcineurin	DMSO	1µg/ml	1µg/ml [104]
Helenalin	p65	DMSO	1,0µM	10µM [69]
Ly294002	PI3K	DMSO	50µM	50µM [62]
PD98059	MEK	DMSO	25µM	30µM [59]
R406	SYK	DMSO	2,0µM	8,0µM [177]
Rapamycin	mTORC1	DMSO	10nM	20nM [64]
SB203580	p38	DMSO	50µM	20µM [25]
SP600125	JNK	DMSO	10µM	10µM [66]
z-VRPR-fmk	Malt1 (Protease- aktivität)	H ₂ O	75µM	75µM [133]

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Inhibitoren

Im Anschluss an die retrovirale Infektion (s. 5.2.3.6) wurden $2,0 \times 10^5$ Jurkat-Zellen in 100µl RPMI¹⁰⁺-Medium pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgelegt. Pro Loch wurden dann 100µl des in RPMI¹⁰⁺-Medium verdünnten Inhibitors in zweifacher Konzentration hinzugefügt. Unbehandelte Zellen wurden vergleichbaren Konzentrationen des jeweiligen Lösungsmittels ausgesetzt. Der Volumenanteil von DMSO lag stets unter 1,0%. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Überstände zur Bestimmung der IL-2-Konzentration abgenommen, 5min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und zellfrei in ein frisches Gefäß überführt. Bis zur Analyse (s. 5.2.3.9) lagerten die Proben bei -80°C.

5.2.3.9 Analyse der Zytokinsekretion

Die Konzentrationsbestimmung von IL-2 wurde mithilfe der ELISA-Methode (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) bestimmt [57] und dazu ein ELISA-Kit (s. 5.1.11) nach Herstellerangaben verwendet. Die nicht enthaltenen Materialien sind größtenteils entsprechend der Herstellerempfehlungen bezogen worden.

Das Testprinzip besteht darin, dass die im abgenommenen Überstand gelösten Zytokine an spezifische Antikörper binden, mit denen der Boden der Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte beschichtet wird. Im nächsten Schritt bindet ein Biotin-gekoppelter Antikörper ein weiteres Epitop des Zytokins. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten werden die Vertiefungen mehrmals mit einem Waschpuffer gespült. Im dritten Schritt wird mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat inkubiert,

wobei die Streptavidin-Moleküle eine feste Bindung mit den Biotin-Molekülen eingehen. Die Meerrettichperoxidase katalysiert nach weiteren Waschschritten eine quantifizierbare Reaktion mit einem zugegebenen Farbstoff (Tetramethylbenzidin) unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, die der Menge des in der Probe vorhandenen Zytokins proportional ist. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure ($c_{\text{stock}}=2,0\text{M}$) wird dieser Farbumschlag mithilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich mit einer in Doppelwerten angefertigten Standardkurve mit 12 Konzentrationschritten.

Die verwendeten Reagenzien wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

Plattengebundene anti-human IL-2 Antikörper	1:250
Biotin-gekoppelter anti-human IL-2 Antikörper	1:250
Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat	1:250

5.2.4 Arbeiten mit murinen Zellen

5.2.4.1 Präparation

An der Sterilwerkbank wurde unter möglichst keimfreien Bedingungen die zu untersuchende Maus mit Sezierbesteck eröffnet, um Milz und Lymphknoten zu entnehmen. Die Organe wurden bis zur weiteren Verwendung in einem 15ml-Röhrchen (Lymphknoten) bzw. in einer 6-Loch-Platte (Milz) mit RPMI⁵⁺-Medium bei 4°C aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Zellen mittels zweier konsekutiv angewandter Zellsiebe (Porengröße 100µm und 75µm) vereinzelt. Es folgte eine Behandlung mit osmotisch wirksamen Erythrozyten-Lysepuffer gemäß Herstellerangaben, um eine Zellsuspension möglichst frei von roten Blutkörperchen zu erhalten. Anschließend wurde die Konzentration lebender weißer Blutzellen in RPMI⁵⁺-Medium ermittelt und entsprechend der weiteren Verwendung eingestellt.

5.2.4.2 Aufreinigung muriner CD4-positiver T-Zellen

Zur Aufreinigung muriner CD4-positiver T-Zellen wurden CD11b-positive myeloide Zellen, CD8-positiver T-Zellen sowie B220 exprimierende B-Zellen depletiert. Dies geschah durch so genannte „Dynabeads[®]“ (supramagnetische Polymerpartikel mit gebundenen Antikörpern), die an entsprechende Oberflächenantigene binden und mithilfe eines starken Magnetfeldes die unerwünschten Zellen entfernen können.

Zunächst wurde die Zellsuspension der Organe einer Maus (zur Herstellung s. 5.2.4.1) auf ein Volumen von 3ml eingestellt und mit 1:100 verdünnten anti-CD11b Antikörper für 30min bei 4°C auf einem Rollmischer inkubiert. Nach einem Waschschriff mit reinem RPMI-Medium folgte die Inkubation in einem Volumen von 7ml RPMI-Medium

mit 1:70 verdünnten supramagnetischen Polymerpartikeln, die den F_c-Teil des zuvor verwendeten Antikörpers binden (Dynabeads[®] Schaf-anti-Ratte IgG). Ebenso wurden zu diesem Zeitpunkt die direkt gegen B220 sowie CD8 gerichteten Dynabeads[®] in einer Verdünnung von 1:42 (anti-B220) sowie 1:70 (anti-CD8) der Zellsuspension zugesetzt. Nach weiteren 30min bei 4°C auf einem Rollmischer folgte die Depletion der gebundenen Zellen im magnetischen Feld. Die Auftrennung wurde zwei Mal durchgeführt, um eine hohe Reinheit zu erhalten. Vor Verwendung wurden die Dynabeads[®] selbst zwei Waschschritten mit RPMI-Medium unterzogen, um nicht Zielantigene mit ungebundenen Antikörpern zu belegen. Über Durchflusszytometrie wurde die Reinheit überprüft, die durchschnittlich bei 90-95% lag.

5.2.4.3 Expression von ITK-SYK in murinen CD4-positiven T-Zellen

Um zelluläre Folgen der ITK-SYK-Expression in einer definierten Zellpopulation von murinen CD4-positiven T-Zellen zu untersuchen, wurden 6-8 Wochen alte Rosa26^{loxSTOPllox-ITK-SYK} Mäuse zunächst gemäß 5.2.4.1 und 5.2.4.2 behandelt. Die Wahl fiel auf CD4-positive T-Zellen, da humane uPTZL mit nachgewiesener t(5;9)(q33;q22) überwiegend diesen Phänotyp zeigen [157].

Um die Stopp-Kassette vor dem eingebrachten ITK-SYK-Gen in den primären Zellen zu entfernen und so die Expression der Fusionstyrosinkinase *ex vivo* anzustoßen, wurde die Technik der Proteintransduktion angewandt. Hierbei wurde die modifizierte Cre-Rekombinase His-TAT-NLS-Cre (HTNC) benutzt. Diese ist in der Lage, die Zell- und Kernmembran zu überwinden, um im Zellkern die mit einer entsprechenden Sequenz (loxP) flankierte Stopp-Kassette herauszuschneiden [125]. HTNC wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Edenhofer, Institut für Rekonstruktive Neurobiologie der Universität Köln, zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde das HTNC-Protein mit reinem RPMI 1640 Medium auf eine Konzentration von 1,0µM eingestellt und steril filtriert (Porengröße des Filters: 0,22µm). Die zu inkubierenden Zellen wurden abzentrifugiert und mit einer Konzentration von 4,0x10⁶/ml in dieser Lösung resuspendiert und anschließend auf einer 24-Loch-Platte mit 1,0ml pro Loch ausplattiert. Kontroll-Zellen wurden entsprechend in reinem RPMI 1640 Medium ohne HTNC-Protein ausgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 4,5h bei Standardkulturbedingungen wurden die Zellen gewaschen und in RPMI⁵⁺-Medium mit einer Konzentration von 1,0x10⁶/ml resuspendiert sowie anschließend auf eine 96-Loch-Platte mit Rundboden in 200µl pro Loch ausgelegt. Nach 96h wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Aktivierung untersucht.

5.2.5 Molekularbiologische Methoden

5.2.5.1 Polymerasekettenreaktion

Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (engl. *PCR*) ermöglicht es, ein spezifisches DNS-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch (z.B. genomische DNS) zu amplifizieren [110]. Diese DNS-Matrize wird im Folgenden auch als *template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt meist mit einer thermostabilen DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden des *templates* homolog ist [81, 110]. Als Edukt der Polymerase werden Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) benötigt [110]. Außerdem müssen Magnesiumionen als wichtiger Kofaktor des Enzyms vorhanden sein, die im entsprechenden PCR-Puffer enthalten sind.

Die Reaktion durchläuft nach anfänglicher Hitzeaktivierung (in der vorliegenden Arbeit als 0. Zyklus definiert) in mehreren Zyklen jeweils drei Schritte:

- 1) Aufschmelzen der doppelsträngigen Matrizen-DNS (Denaturierung)
- 2) Spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNS (Anlagerung)
- 3) Von den Primern ausgehende DNS-Synthese (Elongation)

Die Reaktion findet im automatischen Thermocycler statt. Das so synthetisierte DNS-Fragment (Amplifikat) kann in der darauf folgenden Amplifikationsrunde selbst als Matrize dienen [110]. Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNS-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich. Im Anschluss an den letzten Zyklus folgt eine verlängerte Elongation, bevor die PCR-Produkte bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Werden anstelle eines Primerpaares mehrere verschiedene Primer in einem Ansatz benutzt, spricht man von einer Multiplex-PCR [28]. Einzelheiten der Reaktionen sind an entsprechender Stelle aufgeführt.

5.2.5.2 Polymerasekettenreaktion im *touch-down*-Verfahren

Eine Modifikation der PCR, die eine Fehlhybridisierung der Primer am Anfang der Reaktion verhindern kann, ist das so genannte *touch-down*-Verfahren [48]. Da sich Fehlhybridisierungen, die zu einem frühen Zyklus stattfinden, quantitativ besonders stark auf das Ergebnis einer PCR auswirken, kann eine höhere Spezifität in den ersten Zyklen von Vorteil sein [48]. Dies lässt sich durch eine höhere Primer-Anlagerungstemperatur in der ersten Hälfte der PCR erreichen. Im Verlauf der PCR wird diese Temperatur dann schrittweise bis zur optimalen thermischen Bedingung für das

Primer-Annealing reduziert. Somit kommt es zwar zu Beginn der Reaktion zu einer geringeren Amplifikation des *templates*, doch wird die Spezifität der PCR hierdurch deutlich verbessert [48]. In dieser Arbeit wurde für Reaktionen mit mehreren Primerpaaren diese Technik verwendet (s. 5.2.7).

5.2.5.3 Auftrennen und Nachweis der PCR-Produkte

Zum Auftrennen der PCR-Produkte diente das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese [110]. Dabei wandern die zu trennenden DNS-Fragmente unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Agarosegel. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür ein ionischer TRIS-Azetat-EDTA-Pufferlösung (TAE-Puffer) verwendet. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Zum anschließenden Nachweis der aufgetrennten Fragmente wird Ethidiumbromid verwendet [110]. Dieses interkaliert in Nukleinsäuren, wodurch die Fluoreszenz-Emission nach Anregung mit UV-Licht zunimmt [128].

Die Auftrennung erfolgte in einem Gel mit einem Masseanteil von 2,0% Agarose. Hierzu wurde TAE-Puffer mit entsprechender Menge Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen unter 55°C wurden je nach Gelgröße ein bis drei Tropfen Ethidiumbromid ($c_{\text{stock}}=0,7\text{mg/ml}$) hinzugefügt. Anschließend wurde das Gel zum Aushärten in eine Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Nach Erkalten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Nach Entfernen des Kammes folgte das Beladen mit 5,0µl des PCR-Produkts versetzt mit 0,5µl DNS-Probenpuffer (10x) pro Geltasche. Außerdem wurden 6,0µl Molekulargewichtsmarker (s. 5.1.4) zur Größenbestimmung der aufzutrennenden DNS-Amplifikate in eigener Geltasche auf das Gel aufgetragen.

Nach Anlegen einer Spannung von 130V wurden die DNS-Fragmente in ca. 45 min aufgetrennt, was durch den DNS-Probenpuffer kontrolliert wurde. Die fotografische Dokumentation fand anschließend in einem UV-Detektionsgerät statt.

5.2.5.4 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Zur Herstellung der retroviralen Expressionsvektoren wurden transformationskompetente Bakterien (E. coli DH5α von Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Diese wurden auf Eis aufgetaut und von dem gewünschten Plasmid 2µl zugegeben. Die Bakterien wurden dann für 30min auf Eis inkubiert und folgend 30sec bei 42°C hitzegeschockt, um anschließend wiederum 2min auf Eis inkubiert zu werden. Nach Zugabe von 250µl

S.O.C.-Medium wurde die Kultur für eine Stunde bei 37°C in einen Schüttelinkubator bei 200UpM eingebracht und anschließend in LB-Medium überführt.

5.2.5.5 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

Zunächst wurden 200ml einer E.coli-Übernachtskultur (s. 5.2.5.4) gemäß der Angaben des Herstellers für das Plasmid-Maxi Kit (NucleoBond® Xtra Midi/Maxi von Machery-Nagel, Düren) verarbeitet. Die sedimentierten Bakterien wurden in 12ml Resuspensionspuffer (beinhaltet RNase A) resuspendiert, mit Lysepuffer für 5min bei 20-25°C lysiert und die Reaktion mit Neutralisationspuffer abgestoppt. Nach Zentrifugation wurde der klare Überstand auf die gebrauchsfertige Anionenaustauschersäule gegeben und mit Waschpuffer gewaschen. Nach Elution mit entsprechendem Puffer wurde die DNS mit Isopropanol gefällt und mit wässriger Ethanollösung (Volumenanteil des Ethanol 70%) gewaschen. Das luftgetrocknete DNS-Pellet wurde in 200 - 400µl Aqua destillata aufgenommen und die Konzentration photometrisch (s. 5.2.5.7) bestimmt.

5.2.5.6 Isolierung von genomischer DNS aus Suspensionszellen

Zur Isolierung von genomischer DNS aus Suspensionszellen wurde ein molekularbiologisches Kitsystem (*GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* von Sigma Aldrich, Hamburg) nach Herstellerangaben benutzt. Hierbei wird nach Lyse der Zell- und Kernmembran die DNS an eine Silikatsäule gebunden und mit zweimaligem Waschen von Zellresten gereinigt. Anschließend wird die DNS mit entsprechendem Puffer eluiert. Ein Inkubationsschritt mit RNase degradiert vorhandene RNA.

5.2.5.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um Konzentration sowie Reinheit von Nukleinsäurelösungen zu messen, wurde ein Spektralphotometer benutzt. Dieses Gerät bestimmt gemäß Herstellerangaben mit monochromatischem Licht die Extinktion bzw. optische Dichte (OD) bei unterschiedlichen Wellenlängen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wird so die Konzentration durch die Extinktion bei 260nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) berechnet. Die Reinheit wird über den Vergleich mit Extinktionswerten bei 230nm (Absorptionsmaximum von Verunreinigungen, z.B. Phenol) sowie 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) beurteilt. Reine DNS in Lösung resultiert in einem OD_{260}/OD_{280} Verhältnis von 1,9 bis 2,1 und einem OD_{260}/OD_{230} Verhältnis von 1,8 bis 2,0.

5.2.6 Durchflusszytometrie

5.2.6.1 Einführung

Mithilfe der Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence-activated cell sorting*; FACS) können neben Größe und Granularität auch Antigene von Zellen dargestellt und quantifiziert werden [78, 99]. Für Letzteres werden die Zellen mit an Fluorochromen gebundenen Antikörpern gegen das zu messende Antigen markiert. Die Zellen werden anschließend in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch eine Messkammer geführt. Am Messpunkt rufen Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre Granula eine Lichtstreuung des einfallenden Laserstrahls hervor. Diese wird durch je einen Photodetektor in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einen im rechten Winkel dazu liegenden (Seitwärtsstreulicht) registriert und in elektrische Signale umgewandelt und amplifiziert. Die Intensität des Vorwärtsstreulichtes wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, die des Seitwärtsstreulichtes durch die intrazelluläre Granularität bestimmt.

Zur Darstellung und Quantifizierung der zu untersuchenden Antigene besitzt das Durchflusszytometer FACSCalibur™ (Beckton-Dickinson, Heidelberg) zwei unterschiedliche Laser, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittieren und somit die benutzten Fluorochrome zur Fluoreszenz anregen [78]. Ein luftgekühlter Argonlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 488nm und ein Diodenlaser ein solches der Wellenlänge 635nm. Die Lichtquanten der angeregten Fluorochrome werden über Linsen gesammelt. Anschließend trennen Filter das gesammelte Licht und lenken es den Wellenlängenbereichen entsprechend zu verschiedenen Photodetektoren, die die elektrischen Signale in unterschiedliche Fluoreszenzkanäle (FL) einspeisen. So können Signale verschiedener Wellenlänge voneinander getrennt aufgenommen und analysiert werden (Mehrfarbenanalyse). Die gemessene Intensität der Fluoreszenz (FI) ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das untersuchte Antigen.

Insbesondere bei Fluorochromen mit nahe beieinander liegenden Emissionsmaxima kann es vorkommen, dass die ausgesandten Lichtquanten auch von einem benachbarten Kanal detektiert werden (engl. *spill-over*) [99]. Um dieses Phänomen zu vermeiden, müssen die Kanäle entsprechend aufeinander abgestimmt werden. Man spricht hier von Kompensation. Dies geschieht mit Kontrollproben, die nur ein Fluorochrom gebunden haben (engl. *single stains*). Tabelle 5 (s. Seite 50) fasst die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome zusammen.

Fluorochrom	Anregungsmaximum	Anregung durch	Emissionsmaximum	Kanal am Durchflusszytometer
eGFP	488nm, 498nm	Argonlaser	508nm	FL1
7-AAD	488nm	Argonlaser	655nm	FL2
Pe	496nm, 546nm	Argonlaser	578nm	FL2
Pe-Cy5	496nm, 546nm	Argonlaser	667nm	FL3
APC	650nm	Diodenlaser	660nm	FL4
AF647	650nm	Diodenlaser	668nm	FL4

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Fluorochrome

5.2.6.2 Zelloberflächenfärbung

Zur Darstellung oberflächlicher Antigene wurden pro Antikörperkombination der Mehrfarbenanalyse (engl. *stain*) $0,2 \times 10^6$ Zellen in ein Loch einer 96-Loch-Platte mit Spitzboden gegeben. In dieser haften die Zellen nach Zentrifugation, sodass sie leicht mit Ausklopfen der Platte von der flüssigen Phase der Zellsuspension getrennt werden können. Nach Resuspension in 250µl FACS-Puffer pro Loch wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und somit von Mediumresten gereinigt. Es folgte die Inkubation mit der jeweiligen Antikörperkombination in einem Volumen von 50µl pro Loch. Die Antikörper wurden hierfür in FACS-Puffer verdünnt (für Verdünnungen s. Tabelle 2 auf Seite 30). Nach einer Inkubationszeit von 15min bei 4°C im Dunkeln folgten zwei weitere Waschschrte, bevor die Zellen in 100µl FACS-Puffer pro Loch resuspendiert und in entsprechende FACS-Röhrchen transferiert wurden. Bis zur folgenden Durchflusszytometrie wurden die Zellen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Bei der Durchflusszytometrie mit Zelloberflächenfärbung wurden 5000 bis 10.000 Zellen pro FACS-Röhrchen am Durchflusszytometer FACSCalibur™ (Beckton-Dickinson, Heidelberg) vermessen.

Um unspezifische Antikörperbindungen an die F_c-Rezeptoren muriner Lymphozyten zu verhindern, wurden diese in einem ersten Schritt mit anti-Maus CD16/32 Antikörper für 5min bei 4°C behandelt.

5.2.6.3 Untersuchung zur intrazellulären Proteinphosphorylierung (Phosflow™)

Zur Untersuchung der Signaltransduktion von ITK-SYK in Jurkat-Zellen wurde die Technik der intrazellulären, phosphorylierungsspezifischen Durchflusszytometrie (Phosflow™) angewendet [126]. Zum Einsatz kamen aktivierungsspezifische

Antikörper gegen phosphorylierte Moleküle aus Signalwegen der T-Zelle. Folglich konnte der Aktivierungszustand der untersuchten Signalmoleküle quantifiziert werden. Zunächst wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen in ein Loch einer 96-Loch-Platte mit Spitzboden gegeben und mit eiskaltem PBS gewaschen. Daraufhin folgte die Fixierung der Zellen je Loch in 200 μ l FACS-Puffer mit einem Volumenanteil von 2,0% Paraformaldehyd für 20min bei Raumtemperatur (RT). Folgend wurden die Zellen in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend je Loch mit 200 μ l wässriger Methanollösung (Volumenanteil des Methanols 70%) für 20 min bei RT permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten folgte die Inkubation mit der jeweiligen Antikörperkombination in einem Volumen von 50 μ l pro Loch. Die Antikörper wurden hierfür in FACS-Puffer verdünnt (s. Tabelle 2 auf Seite 30). Die Inkubationszeit betrug bei 4°C im Dunkeln 30-60min und wurde von zwei Waschschrritten gefolgt. Anschließend wurden die Zellen pro Loch in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und in entsprechende FACS-Röhrchen transferiert und bis zur folgenden Durchflusszytometrie bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Bei der Durchflusszytometrie mit intrazellulärer Färbung wurden mindestens 15.000 Zellen pro FACS-Röhrchen am Durchflusszytometer FACSCantoII™ (Beckton-Dickinson, Heidelberg) gemessen.

5.2.6.4 Unterscheidung lebender und toter Zellen

Lebende und tote Zellen können in der Durchflusszytometrie durch ihr Verhalten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht unterschieden werden [99]. Hierbei sind apoptotische oder nekrotische Zellen kleiner und granulärer als lebende Zellen [99]. Soweit nicht anders beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Unterscheidung derart getroffen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Färbung mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) [149]. Dieser Farbstoff kann die intakte Zell- und Kernmembran nicht überwinden. Bei toten Zellen interkaliert er in die nun zugängliche DNA, wobei seine Fluoreszenz-Emission ähnlich wie bei Ethidiumbromid zunimmt [128, 149]. Der Farbstoff wurde den zu untersuchenden Zellen kurz vor der Durchflusszytometrie in einer Verdünnung von 1:40 zugesetzt.

5.2.6.5 Auswertung und Darstellung der Daten

Zur Aufzeichnung der Daten am Durchflusszytometer wurde die Software CellQuest Pro (für FACSCalibur) bzw. FACSDiva (für FACSCanto II) verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software FlowJo. Bei der graphischen Darstellung einzelner Zellpopulationen bezüglich zweier Parameter werden für diese die gemessenen Fluoreszenzintensitäten logarithmisch illustriert. Bei der Darstellung von mehreren

Zellpopulationen bezüglich eines Parameters im Histogramm wird das so genannte *binning*-Verfahren angewandt. Hierbei wird der logarithmische Bereich der untersuchten Fluoreszenzintensität auf der Abszisse in 256 Untergruppen („Behälter“, engl. *bin*) eingeteilt. Für jede dieser Untergruppen wird anschließend die Anzahl der darin enthaltenen Zellen bestimmt. Im Histogramm wird dieser Wert im Bezug auf die mengenmäßig stärkste Untergruppe angegeben („% von MAX“).

Das *binning*-Verfahren wird eingesetzt, um beim Vergleich unterschiedlich großer Zellpopulationen zur Übersichtlichkeit eine Normalisierung der Werte auf der Ordinate zu erreichen.

5.2.7 Spektratypisierung muriner T-Zellen

Für den Nachweis einer klonalen Lymphoproliferation in der Maus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert, die auf der Typisierung des TZR-Spektrums (Spektratypisierung) beruht. Hierbei wird sich die Variabilität der CDR3-Region des TZR zu Gunsten gemacht wird (s. 3.2.1). Bei Betrachtung aller T-Zellen mit gleicher TZR-Genumlagerung (z.B. V β 3-D β 2-J β 2) ergibt sich wie in Abb. 6 gezeigt eine charakteristische Längenverteilung des rekombinierten Genabschnittes für den klonalen sowie polyklonalen Fall.

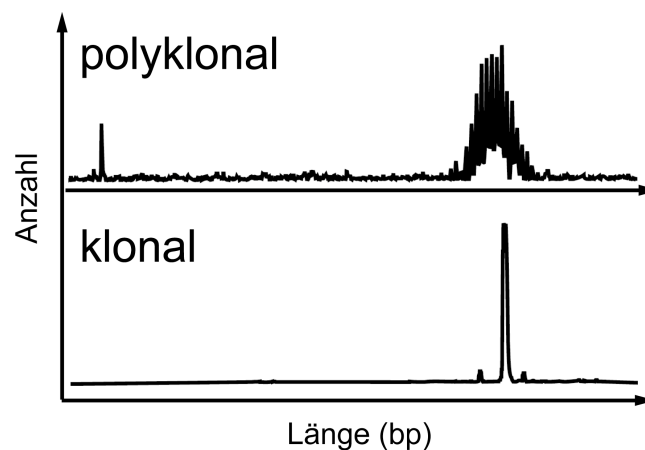


Abb. 6 Längenverteilung einer Genumlagerung des T-Zell-Rezeptors im polyklonalen sowie klonalen Fall

Bei der Betrachtung der Längenverteilung in Basenpaaren (bp) einer Genumlagerung auf genomischer Ebene von polyklonalen T-Zellen ergibt sich durch die zufällig eingefügten und entfernten Nukleotide der Anbindungsstellen zwischen den Gensegmenten eine Normalverteilung. Im Falle eines vorherrschenden T-Zell-Klons lässt sich nur mehr dessen spezifische CD3R-Konfiguration nachweisen (engl. „*peak*“). Abbildung modifiziert nach [168].

Ausgehend von einem Protokoll, das freundlicherweise von Frau Priv.-Doz. Dr. L. Quintanilla-Martinez de Fend (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Spektratypisierung muriner T-Zellen etabliert werden. Die Detektion der einzelnen Genumlagerungen erfolgt hierbei über die Technik der Polymerasekettenreaktion, deren Primer in unterschiedlichen Reaktionen die zu untersuchenden Gensegmente flankieren (s. Abb. 7 auf Seite 54). Die entstehenden PCR-Produkte entsprechen so der Länge der untersuchten Genumlagerung auf genomischer Ebene. Die Wahl für den zu untersuchenden Genlocus fiel analog zur klinischen Routine zum einen auf den der TZR β -Kette, da dieser in fast allen T-Zell-Malignomen rekombiniert ist [168]. Zum anderen wurde der Genlocus der TZR γ -Kette gewählt, da dieser in einem frühen Stadium der T-Zell-Entwicklung umgelagert wird und aufgrund seiner einfachen Struktur auch leicht zu untersuchen ist (vgl. 3.2.1.1). Als nicht geeignet erwiesen sich die Genloci der TZR α -Kette aufgrund zu hoher Komplexität und jener der TZR δ -Kette, da dieser häufig in lymphoiden Malignomen deletiert ist [168, 170]. Auf eine zusätzliche Untersuchung des IgH-Genlocus wurde verzichtet. Ebenfalls wurden, analog zur klinischen Routine, keine Primer zur Detektion inkompletter TZR-Genumlagerungen ohne J-Region angewendet [168].

Um falsch positive Ergebnisse durch Auftrennung der PCR-Produkte mithilfe konventioneller Gelelektrophorese zu vermeiden, muss eine adäquate Analyse der erhaltenen PCR-Produkte erfolgen [168]. Ein möglicher Weg zur Unterscheidung zwischen mono-, oligo- oder polyklonal ist das so genannte *GeneScanning*TM [88]. Hierbei wird eine lasergestützte Fragmentanalyse der PCR-Produkte mithilfe eines Sequenzierautomaten durchgeführt. Zu diesem Zweck sind die verwendeten Rückwärtsprimer am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAMTM) markiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einer mit Polymer gefüllten Kapillare werden die nun an den PCR-Fragmenten befindlichen Fluorochrome mit einem Argonlaser angeregt und die Emission bei 494nm gemessen. Durch Zuordnung zu einem internen Längenstandard kann die Längenbestimmung bis zu einem Basenpaar genau durchgeführt werden [87]. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz (FI) ist dabei proportional zur Anzahl der markierten Fragmente bzw. der zu untersuchenden Rekombinationen [88].

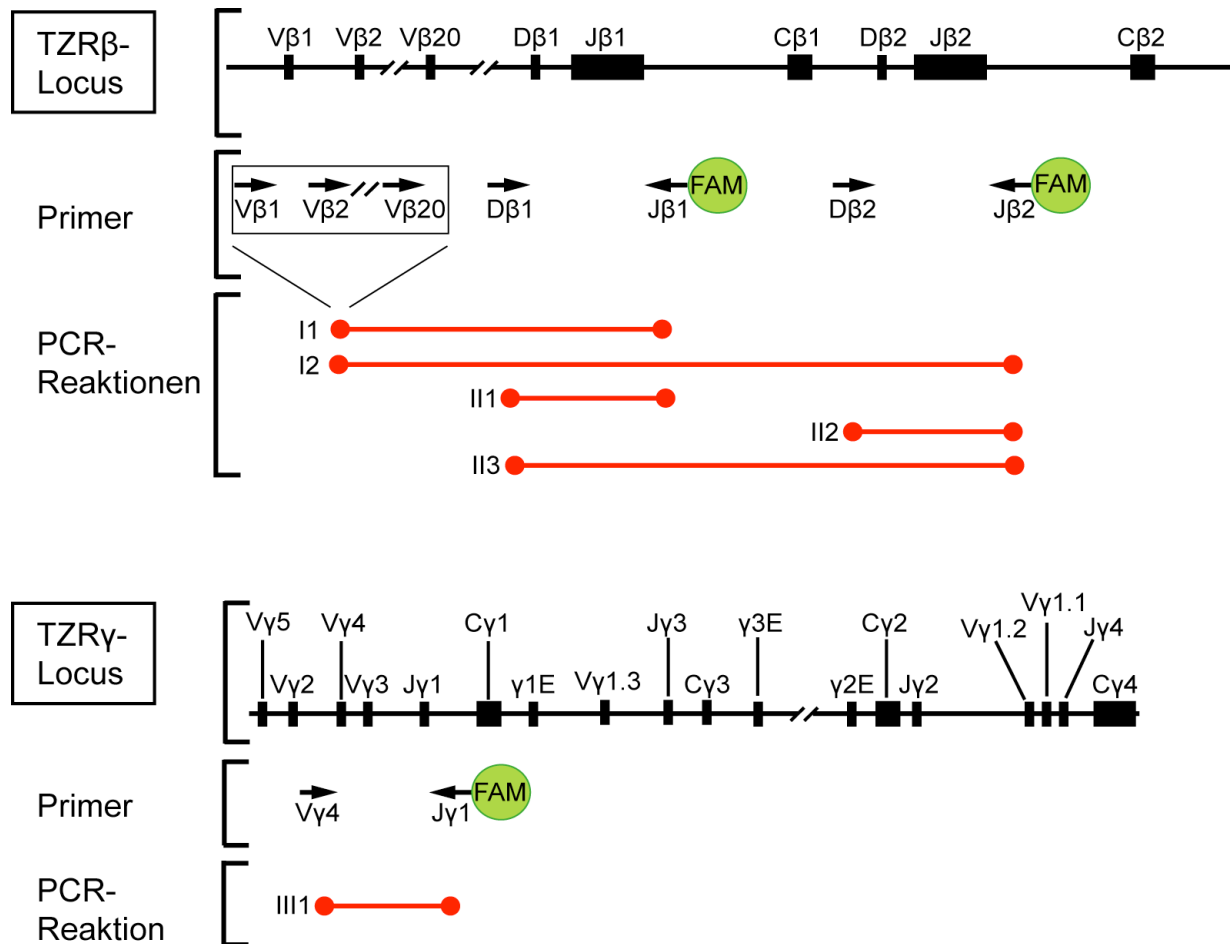


Abb. 7 Verwendete Primer und PCR-Reaktionen zur Spektrotypisierung muriner T-Zellen

Unter dem jeweiligen Genlocus im Keimbahnzustand mit seinen Gensegmenten (für Einzelheiten s. 3.2.1) sind die verwendeten Primer auf Höhe ihrer homologen Sequenz als Pfeile dargestellt. Um neben funktionellen Genumlagerungen der TZRβ-Kette (Reaktionen I) auch inkomplette Rekombinationen ohne V-Gensegment zu erfassen (s. 3.2.1.1), wurden Vorwärtsprimer oberhalb der D-Gensegmente gewählt (Reaktionen II). Zudem wurde eine Rekombination des TZRγ-Genlocus untersucht (Reaktion III).

Die Pfeilspitzen befinden sich am 3'-Ende der Primer und zeigen in Syntheserichtung der DNS-Polymerase. Die Rückwärtsprimer sind zur Darstellung der PCR-Produkte mittels automatisierter Längenfragmentanalyse (*GeneScanningTM*) mit Fluoreszenzfarbstoff (FAM) markiert. Rot eingezeichnet sind die jeweiligen Primer-Kombinationen für die verwendeten PCR-Reaktionen I1-III1. Die Primer Vβ1-Vβ20 wurden stets zusammen in einem Multiplex-Ansatz verwendet. Abbildung modifiziert nach [67, 171].

Zunächst wurden die Lymphozyten aus der Milz der zu untersuchenden Maus gemäß 5.2.4.1 präpariert. Aus diesen wurde die genomische DNS gemäß 5.2.5.6 extrahiert und anschließend quantifiziert (s. 5.2.5.7). 100ng der DNS wurden dann in einem PCR-Röhrchen mit den für die Polymerasekettenreaktion nötigen Substanzen versetzt:

- | | | |
|---|--------------------|-----------|
| • 10x PCR-Puffer (Applied Biosystems) | 2,5µl | |
| • MgCl ₂ (C _{stock} =25mM) | 1,3µl | |
| • dNTP-Mix (C _{stock} =2,5 mM) | 2,0µl | |
| • Entsprechende(r) Vorwärtsprimer* (C _{stock} =10µM) | 0,5µl (pro Primer) | |
| • Entsprechender Rückwärtsprimer* (C _{stock} =10µM) | 0,5µl | *s. 5.1.5 |
| • Taq Polymerase (Applied Biosystems) | 0,2µl (=1,25U) | |
| • Aqua ad iniectionem | ad 25µl | |

Die zur Amplifikation gewählten Programme sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Reaktionen I1-I2			
Zyklus:	Denaturierung:	Anlagerung:	Elongation:
0	5min; 95°C	-	-
1-16	1min; 94°C	40sec; 72°C -0,7°C pro Zyklus (s. 5.2.5.2)	1min; 72°C
17-47	1min; 94°C	40sec; 63°C	1min; 72°C
48	-	-	5min; 72°C
Reaktionen II1-II3			
Zyklus:	Denaturierung:	Anlagerung:	Elongation:
0	5min; 95°C	-	-
1-37	1min; 94°C	40sec; 63°C	1min; 72°C
38	-	-	5min; 72°C
Reaktion III1			
Zyklus:	Denaturierung:	Anlagerung:	Elongation:
0	5min; 95°C	-	-
1-37	1min; 94°C	40sec; 57°C	1min; 72°C
38	-	-	5min; 72°C

Tabelle 6 PCR-Zyklusprotokolle für die Spekatypisierung muriner T-Zellen

Nach der Amplifikation wurde ein Teil der PCR-Produkte wie unter 5.2.5.3 beschrieben aufgetrennt und visualisiert. Die Größenbereiche der spezifischen PCR-Produkte aus den einzelnen Reaktionen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Reaktion	I1	I2	II1	II2	II3	III1
Größenbereich in Basenpaaren	150-250	250-320	160-200	200-230	235-265	275-295

Tabelle 7 Übersicht der zu erwartenden Produktgrößen der PCR-Reaktionen zur Spekatypisierung muriner T-Zellen

Anhand der Bandenstärke im Agarosegel wurde die Verdünnung mit destilliertem Wasser der Amplifikate für die Längenfragmentanalyse im Sequenzierautomaten gewählt (von 1:1 bis 1:20). Für die Verdünnung wurde destilliertes Wasser benutzt. Die Elektrophorese erfolgte in Kapillaren mit POP-7[®] Polymer und als interner Längenstandard wurde ROX-500HD verwendet. Um eine Bildung von Haarnadelstrukturen der

einzelsträngigen Fragmente zu verhindern, wurde dem Ansatz Formamid hinzugefügt.

Ein Ansatz umfasste:

- Formamid 15µl
- Verdünnte Amplifikate 2,0µl
- Längenstandard 0,5µl

Die Auswertung der Längenfragmentanalyse erfolgte am Sequenzierautomaten mithilfe der Software GenMapper[®] (beides von Applied Biosystems, Darmstadt).

5.2.8 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Bei einigen Experimenten wurde zum Vergleich der Mittelwerte die statistische Signifikanz bestimmt. Hierfür wurde zunächst durch den Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft, ob die Messwerte eine Normalverteilung aufweisen. War diese gegeben, wurde mit dem F-Test nach Fisher entschieden, ob die Varianz der Stichproben wesentlich differiert. Entsprechend wurde die statistische Signifikanz mithilfe des heteroskedastischen Student-t-Testes für ungleiche Varianzen und des homoskedastischen Student-t-Testes für gleiche Varianzen durchgeführt. Bei nicht gegebener Normalverteilung der Messwerte wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. In Abbildungen sind die p-Werte wie folgt markiert:

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

6 Ergebnisse

6.1 Untersuchung zur Zelltransformation durch ITK-SYK im Mausmodell

Zur Untersuchung der Zelltransformation durch ITK-SYK wurden durch Pechloff *et al.* zwei Mausmodelle mit konditionaler Expression von ITK-SYK generiert [123]. In beiden Mausmodellen zeigt sich eine lymphoproliferative Erkrankung durch aktivierte T-Zellen, die klinisch, immunhistologisch und immunphänotypisch dem humanen Krankheitsbild ähnelt [123]. Wie unter 3.1.2.1 beschrieben, ist der Nachweis der Klonalität für die Diagnose eines PTZLs von grundlegender Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Aspekt untersucht, wofür eine Technik zur TZR-Spektratypisierung etabliert wurde (s. 5.2.7). Die Ergebnisse wurden zusammen mit der Beschreibung der Mausmodelle publiziert [123].

Zunächst wurde in einem Vorversuch überprüft, ob die TZR-Spektratypisierung mit automatisierter Längenspektroskopie (*GeneScanningTM*) den Nachweis von Klonalität erlaubt. Hierfür wurde das Längenspektrum des artifiziell eingebrachten T-Zell-Rezeptors einer OT-II-transgenen Maus untersucht. Dieser Rezeptor setzt sich aus einer V α 2-Kette sowie einer V β 5.1/5.2-Kette zusammen und erkennt den auf MHC-II präsentierten Peptidabschnitt von Aminosäure 323 bis 339 von Ovalbumin [15]. Der von allen T-Zellen einer OT-II-transgenen Maus exprimierte, präarrangierte Rezeptor weist auf genomischer Ebene keine Längenspektroskopie auf. Deshalb dient eine DNS-Probe aus entsprechender Maus als Positivkontrolle für Klonalität.

Abb. 8 auf Seite 58 zeigt für die PCR-Reaktion mit Primern zur Detektion der Genabschnitte zwischen V β 1-20 sowie D β 2 ein klonales Signal (engl. „*peak*“) für OT-II. Im Falle einer Wildtypmaus ergeben sich aufgrund der Multiplex-PCR zwei Normalverteilungen.

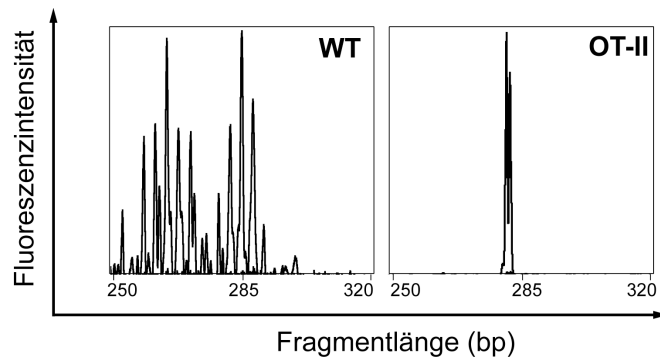


Abb. 8 **Elektropherogramm zur Spekatypisierung muriner T-Zellen einer Wildtyp- sowie einer OT-II-transgenen Maus**

Nach Multiplex-PCR mit entsprechenden Primern zur Detektion der genomischen Abschnitte zwischen V β 1-20 und D β 2 wurden die Amplifikate der DNS-Proben einer Wildtyp (WT) sowie einer OT-II-transgenen Maus mittels automatisierter Längenfragmentanalyse untersucht. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der angeregten Fluorochrome an den rückwärtigen Primern (D β 2) als Funktion der Amplifikatlänge in Basenpaaren (bp).

Im Folgenden wurden DNS-Proben aus Mäusen beider Mausmodelle von Pechloff *et al.*, wie unter 5.2.7 beschrieben, untersucht. In Vorversuchen ergaben sich mithilfe der Durchflusszytometrie für beide Modelle Hinweise auf Klonalität im Sinne einer vorherrschend exprimierten TZR $\nu\beta$ -Kette oder des gänzlichen Verlusts an nachweisbaren Epitopen der TZR $\nu\beta$ -Kette. Die TZR-Spekatypisierung mittels *Gene-Scanning*TM konnte nun für jede der untersuchten ITK-SYK^{CD19-Cre} (n=5) sowie ITK-SYK^{CD4-Cre} (n=3) Mäuse mindestens eine klonale Rekombination (engl. „peak“) detektieren. Ein polyklonaler Hintergrund an T-Zellen wurde in allen erkrankten Mäusen weitgehend verdrängt. Zwei komplette, klonale Rekombinationen pro Maus zeigten sich in zwei Individuen. Zwei klonale Rekombinationen pro PCR-Reaktion konnten in 15% aller Reaktionen nachgewiesen werden.

Für jede der verwendeten PCR-Reaktionen wurde mindestens eine Maus der Mausmodelle nach Pechloff *et al.* identifiziert, die eine oder zwei klonale Rekombinationen aufwies (s. Abb. 9 auf Seite 59). Als Kontrolle diente eine Wildtypmaus (C57BL/6) im Alter von fünf Monaten. Wie erwartet, zeigte sich für diese Kontrolle eine Normalverteilung in den Reaktionen II1 bis III1. In den Reaktionen I1 und I2 stellten sich aufgrund mehrerer verwendeter Primer zwei Normalverteilungen dar. In Vorversuchen wurde eine Normalverteilung der Fragmentlängen für CD4-Cre sowie CD19-Cre Mäuse sichergestellt. Ebenfalls wurde in Vorversuchen mithilfe von Kontrollmäusen im Alter von einem Jahr das Auftreten von benignen klonalen T-Zell-Expansionen ausgeschlossen, wie man sie gelegentlich in älteren humanen Individuen beobachten kann [129].

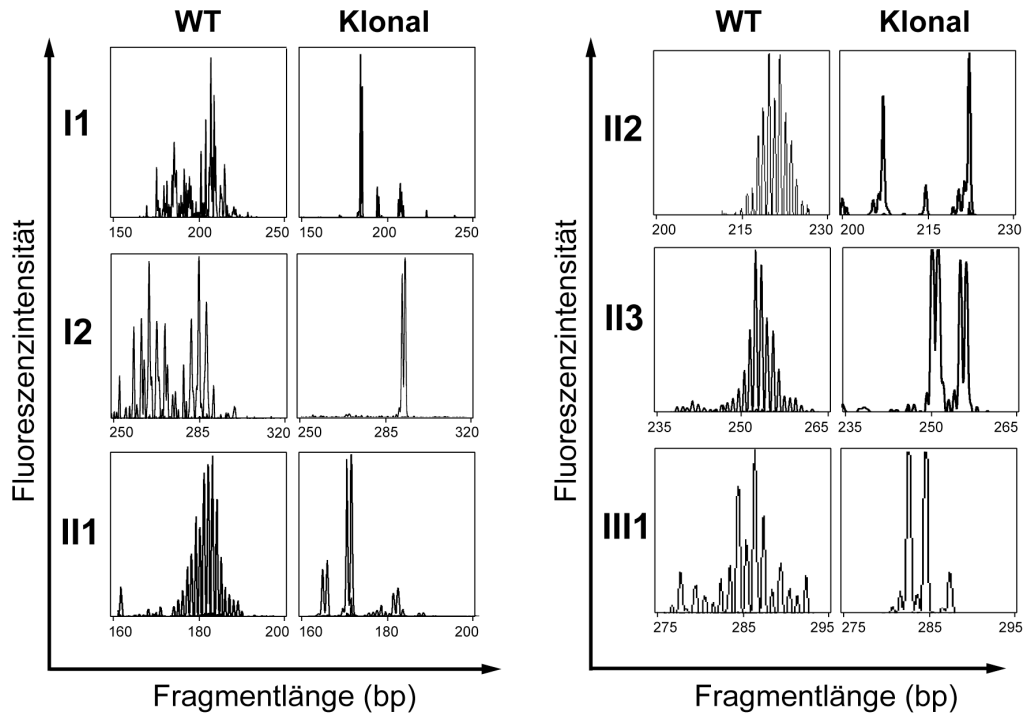


Abb. 9

TZR-Spektroskopie mittels *GeneScan™* von T-Zellen einer Wildtypmaus sowie sechs kranker Mäuse mit infiltrativer Expansion ITK-SYK exprimierender T-Zellen

Nach PCR mit entsprechenden Primern für die Reaktionen I1 bis III1 (s. 5.2.7) wurden die Amplikate mittels automatisierter Längenfragmentanalyse untersucht. Die DNS-Proben entstammen einer Wildtypmaus (WT) sowie für jede Reaktion einer kranken Maus mit infiltrativer Expansion ITK-SYK exprimierender T-Zellen. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der angeregten Fluorochrome an den rückwärtigen Primern als Funktion der Amplifikatlänge in Basenpaaren (bp).

6.2 Untersuchung zellulärer Folgen der Expression von ITK-SYK

6.2.1 Untersuchung mit Jurkat T-Zellen

Die Translokation $t(5;9)(q33;q22)$ mit Expression des Fusionsproteins ITK-SYK konnte für eine Untergruppe uPTZL mit vergleichbaren Eigenschaften als wiederkehrendes Ereignis identifiziert werden [157]. Anhand dieser neu identifizierten Fusionstyrosinkinase ergab sich die Möglichkeit, molekulare Zusammenhänge der Pathogenese zu beleuchten [157]. Hierfür wurden zunächst zelluläre Folgen der ITK-SYK-Expression in Jurkat T-Zellen untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass SYK in aktivierenden Signalwegen der T-Zelle involviert ist (s. 3.2.2 bis 3.2.4), galt es zu untersuchen, ob die Expression von ITK-SYK in Jurkat-Zellen zu typischen Erscheinungen der T-Zell-Aktivierung führt. Hierzu gehören neben der Expression von

CD69 [27] auch die Sekretion von IL-2 [1]. Des Weiteren führt die Aktivierung von Jurkat-Zellen zu Apoptose. Dieser sog. Aktivierungs-induzierte Zelltod (engl. *activation-induced cell death; AICD*) ist abhängig von APO-1 (engl. *apoptosis antigen 1*) [45].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach Expression von ITK-SYK, nicht aber nach Expression der Kinase-defekten Mutante von ITK-SYK (ITK-SYK^{KD}), zu den zellulären Folgen einer starken T-Zell-Aktivierung kommt.

6.2.1.1 Zellzahl und Viabilität

Um zu überprüfen, ob es nach Expression von ITK-SYK in Jurkat-Zellen Hinweise auf *AICD* gibt, wurde nach retroviraler Infektion die Zellzahl im Zeitverlauf bestimmt (s. Abb. 10, A auf Seite 61). Hierfür wurden Jurkat-Zellen mit Retroviren zur Expression für ITK-SYK bzw. ITK-SYK^{KD} infiziert. Als Kontrolle dienten Viren auf Basis des unveränderten retroviralen Vektors, die nur zu eGFP-Expression in den Zielzellen führen (Mig). Ein Teil dieser Zellfraktion wurde mit Antikörpern (anti-CD3/anti-CD28) oder PMA/Ionomycin inkubiert, um einen Vergleich mit stimulierten Jurkat-Zellen zu ermöglichen.

Es zeigte sich eine zeitabhängige Zunahme der Zellzahl bei Mig sowie bei ITK-SYK^{KD}. Dies ließ sich auch für die mit Antikörpern stimulierten Zellen feststellen, wobei deren Zellzahl nach 72h signifikant niedriger war als die der Kontrollzellen. Für Zellen, die mit PMA/Ionomycin stimuliert wurden, ließ sich keine signifikante Zunahme der Zellzahl nach 72h feststellen. Die Zellzahl bei ITK-SYK fiel im Zeitverlauf deutlich stärker ab als bei den mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen. Sie lag nach 72h bei ca. 45%.

Um zu überprüfen, inwieweit Zelltod oder verminderte Proliferation die reduzierten Zellzahlen verursachten, wurde in denselben Experimenten die Viabilität mittels Durchflusszytometrie bestimmt (s. Abb. 10, B).

Hierbei zeigte sich eine zeitabhängige Reduktion des Anteils der lebenden Zellen bei den unstimulierten Kontrollzellen sowie bei ITK-SYK^{KD} auf ca. 75% nach 72h. Dies ließ sich bei den mit Antikörpern sowie PMA/Ionomycin stimulierten Zellen in signifikant erhöhtem Maße nachweisen (bei beiden ca. 60% lebende Zellen nach 72h). Ebenso zeigte sich bei ITK-SYK eine zeitabhängige Reduktion der Viabilität, wobei diese im Vergleich zu den Stimulationskontrollen deutlich ausgeprägter war (ca. 30% lebende Zellen nach 72h).

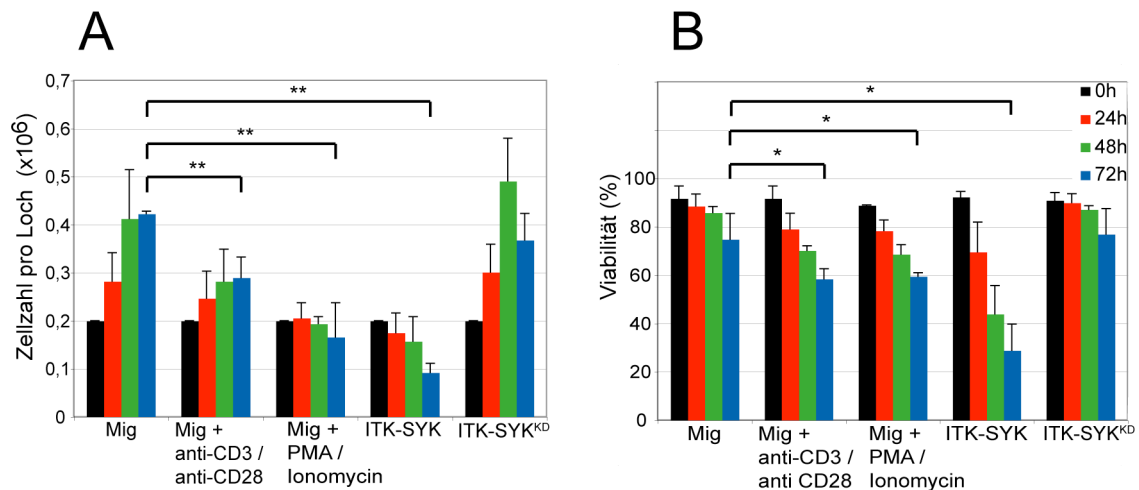


Abb. 10 Einfluss von Stimulation sowie ITK-SYK-Expression auf Zellzahl und Viabilität von Jurkat-Zellen

Nach retroviraler Transduktion von ITK-SYK, ITK-SYK^{KD} und unverändertem Mig-Vektor (Mig) in Jurkat-Zellen wurde ein Teil der letzteren Zellen zum Zeitpunkt t=0 mit Antikörpern kontinuierlich stimuliert: plattengebundener anti-CD3 (10µg/ml) und löslicher anti-CD28 (4µg/ml). Eine weitere Fraktion wurde mit PMA/Ionomycin (beides 50nM) kontinuierlich stimuliert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mithilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Viabilität wurde mithilfe von Durchflusszytometrie ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

6.2.1.2 Nachweis von Aktivierungsmarkern

Wie unter 6.2.1.1 beschrieben, wurden Jurkat-Zellen mit entsprechenden Retroviren infiziert und ein Teil der Kontrollzellen zum Zeitpunkt t=0h mit Antikörpern oder PMA/Ionomycin kontinuierlich stimuliert. Zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h wurde der Anteil an eGFP exprimierenden Zellen sowie der Anteil CD69 präsentierender Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (s. Abb. 11 auf Seite 62).

Bei allen untersuchten Zellen zeigte sich eine zeitabhängige Zunahme der eGFP-Expression in vergleichbarem Ausmaß (Anteil eGFP exprimierender Zellen ca. 70% nach 72h). Bei ITK-SYK war zudem eine Zunahme der Zellpopulation zu verzeichnen, für die sowohl eGFP als auch CD69 zu detektieren war (61% nach 72h). eGFP wurde in diesen Zellen zusammen mit ITK-SYK exprimiert, was in Voruntersuchungen durch Westernblot gezeigt werden konnte. Zellen, die kein eGFP exprimierten, zeigten bei ITK-SYK auch keine Präsentation von CD69. Bei den Stimulationen ließen sich hingegen CD69 präsentierende Zellen ohne Expression von eGFP finden. Der Grund ist die von der retroviralen Infektion unabhängige Stimulation der Zellen.

Die mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen wiesen nach 72h einen mit ITK-SYK vergleichbaren Anteil der Zellpopulation auf, für die sowohl eGFP als auch CD69 zu

detektieren war. Für die mit Antikörper stimulierten Zellen war der Anteil dieser Zellpopulation geringer (ca. 10% nach 72h).

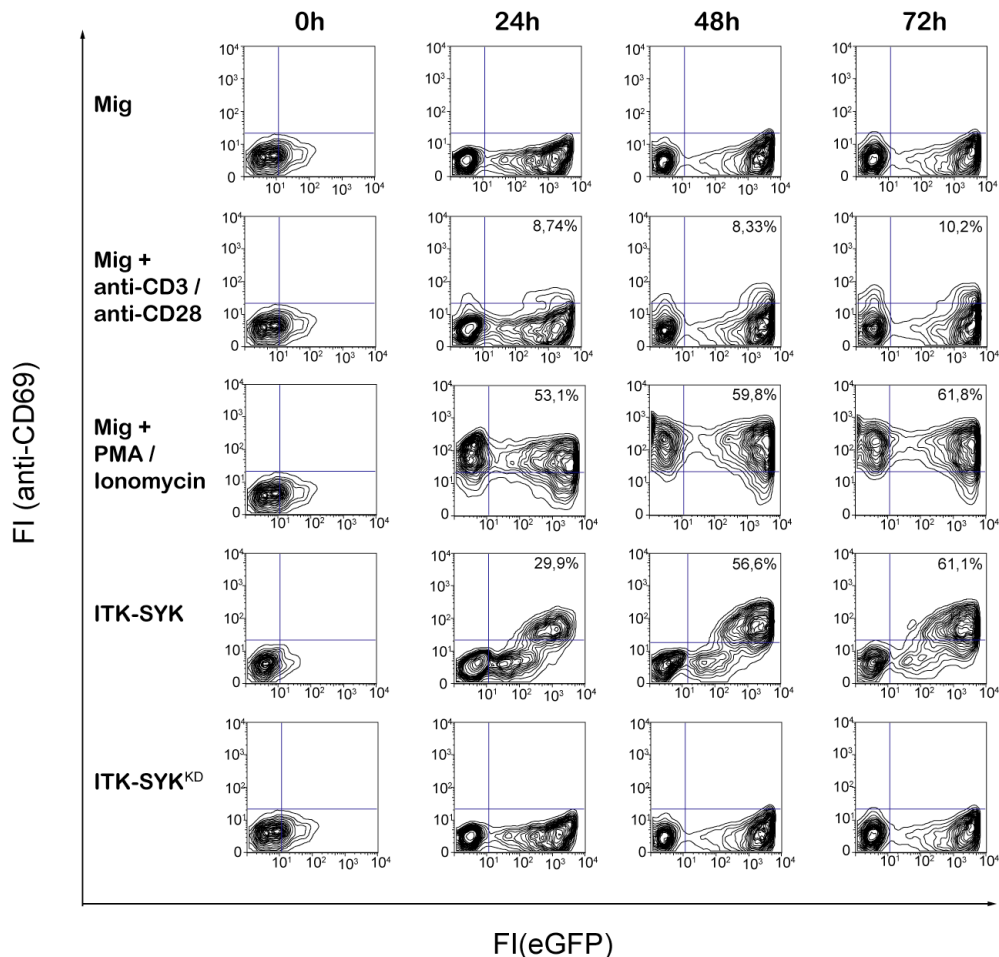


Abb. 11 Einfluss von Stimulation sowie ITK-SYK-Expression auf die Präsentation von CD69 durch Jurkat-Zellen

Nach retroviraler Transduktion von ITK-SYK, ITK-SYK^{KD} und unverändertem Mig-Vektor (Mig) in Jurkat-Zellen wurde ein Teil der letzteren Zellen zum Zeitpunkt t=0 mit Antikörpern kontinuierlich stimuliert: plattengebunden anti-CD3 (10µg/ml) und löslicher anti-CD28 (4µg/ml). Eine weitere Fraktion wurde mit PMA/Ionomycin (beides 50nM) kontinuierlich stimuliert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Expression von eGFP sowie die Präsentation von CD69 quantifiziert. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensität (FI) von eGFP als Funktion der FI des anti-CD69 Antikörpers. Es wurden nur lebende Zellen betrachtet. Das Experiment wurde dreimal unabhängig unter gleichen Bedingungen durchgeführt und zeigte jeweils vergleichbare Ergebnisse.

6.2.1.3 Sekretion von IL-2

Die Konzentration von IL-2 in den Zellüberständen der unter 6.2.1.2 beschriebenen Experimente wurde mittels ELISA-Kit bestimmt (s. Abb. 12 auf Seite 63).

Es zeigte sich eine zeitabhängige Zunahme der Konzentration an IL-2 im Überstand der stimulierten Kontrollzellen, wobei die Stimulation durch PMA/Ionomycin zu deutlich

größerer Produktion an IL-2 führte als die Stimulation durch Antikörper. Die Konzentration war bei PMA/Ionomycin nach 48h ca. 3,4-fach höher als bei den mit Antikörpern stimulierten Zellen. Auch bei Zellen mit Expression von ITK-SYK ließ sich IL-2 im Überstand nachweisen, wobei die Quantität um ein Vielfaches über jener der stimulierten Kontrollen lag. Die Konzentration bei ITK-SYK war nach 48h ca. 11-fach höher als bei den mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen. Nach 72h lag die Konzentration bei ITK-SYK exprimierenden Zellen sogar über der mittels ELISA-Kit detektierbaren Grenze von 8000 pg/ml. Bei ITK-SYK^{KD} sowie bei nicht stimulierten Kontrollen (Mig) war im Überstand der Gehalt an IL-2 zu keinem der untersuchten Zeitpunkte detektierbar (n.d.).

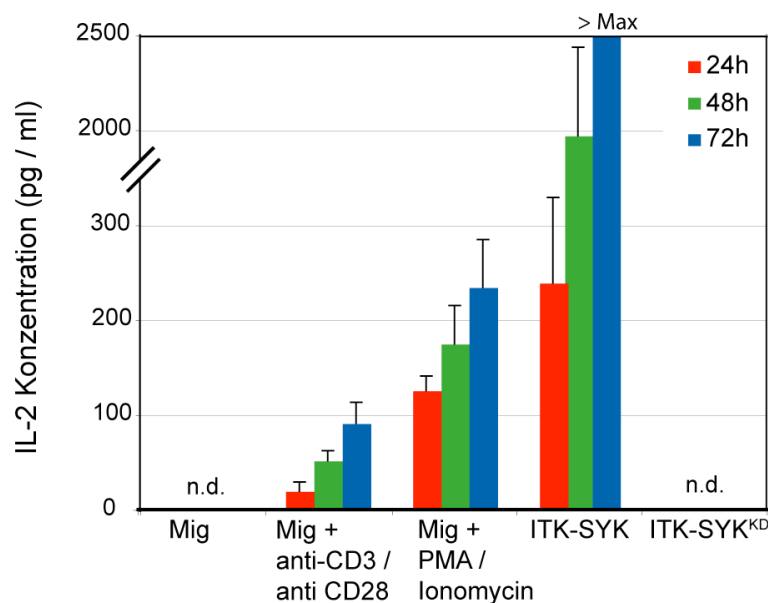


Abb. 12 Einfluss von Stimulation sowie ITK-SYK-Expression auf Sekretion von IL-2 durch Jurkat-Zellen

Nach retroviraler Transduktion von ITK-SYK, ITK-SYK^{KD} und unverändertem Mig-Vektor (Mig) in Jurkat-Zellen wurde ein Teil der letzteren Zellen zum Zeitpunkt t=0 mit Antikörpern kontinuierlich stimuliert: plattengebunden anti-CD3 (10µg/ml) und löslicher anti-CD28 (4µg/ml). Eine weitere Fraktion wurde mit PMA/Ionomycin (beides 50nM) kontinuierlich stimuliert. Der Zellüberstand wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zentrifugation abgenommen und mithilfe eines ELISA-Kits die Konzentration an IL-2 bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

6.2.2 Untersuchung mit murinen CD4-positiven T-Zellen

Um zu überprüfen, ob ITK-SYK auch in murinen CD4-positiven T-Zellen zur Aktivierung führt, wurden diese nach Expression des Fusionsproteins durchflusszytometrisch auf entsprechende Anzeichen untersucht. Hierzu zählen neben der Präsentation von Aktivierungsmarkern (CD25, CD44, CD62L, CD69) auch die Zunahme des Zellvolumens [73, 75]. Die Wahl fiel auf CD4-positive T-Zellen, da humane

uPTZL mit nachgewiesener $t(5;9)(q33;q22)$ überwiegend diesen Phänotyp zeigen [157].

Zunächst wurden CD4-positive T-Zellen aus $Rosa26^{loxSTOPlox-ITK-SYK}$ Mäusen aufgereinigt (s. 5.2.4.2). Diese tragen die Erbinformation von ITK-SYK im ubiquitär exprimierten Genlocus $Rosa26$ [123]. Das entsprechende Gen wird jedoch durch eine vorangehende Stopp-Kassette an der Expression gehindert [123]. Diese kann aufgrund einer flankierenden Sequenz (loxP) von einer eingebrachten Cre-Rekombinase erkannt und entfernt werden [125]. Folglich kommt es zur Expression von ITK-SYK [123]. Um die rekombinierten Zellen durchflusszytometrisch verfolgen zu können, wurde stromabwärts des Gens für ITK-SYK die Erbinformation eines grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) eingebracht [123].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Rekombination das Cre-Fusionsprotein His-TAT-NLS-Cre (HTNC) verwendet, das die Zell- sowie Kernmembran *in vitro* passieren kann [125]. Nach 270-minütiger Inkubation der aufgereinigten Zellen mit HTNC betrug der Anteil eGFP exprimierender Zellen zum Zeitpunkt $t=96h$ ca. 60%. Beim Vergleich dieser Zellpopulation mit nicht rekombinierten Zellen ließ sich wie in Abb. 13 gezeigt für jeden der untersuchten Parameter eine Aktivierung nachweisen.

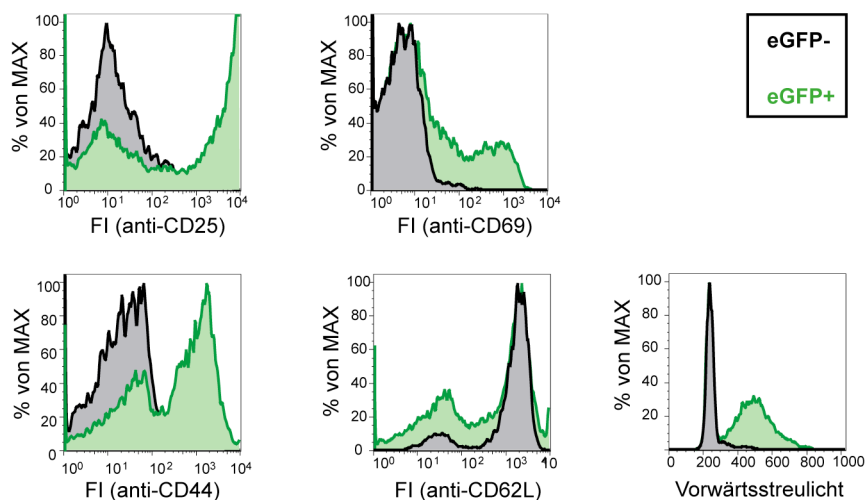


Abb. 13 Aktivierung muriner CD4-positiver T-Zellen aus $Rosa26^{loxSTOPlox-ITK-SYK}$ Mäusen nach Inkubation mit HTNC *in vitro*

CD4-positive T-Zellen aus $Rosa26^{loxSTOPlox-ITK-SYK}$ Mäusen [123] wurden nach Aufreinigung mit His-TAT-NLS-Cre inkubiert ($1\mu M$ für 270min). 96h nach Inkubation mit dieser Cre-Rekombinase wurden die Zellen geerntet und mit Durchflusszytometrie untersucht. Für jede Zielstruktur ist die Fluoreszenzintensität (FI) des verwendeten Antikörpers bzw. das Vorwärtsstreuung histogrammisch dargestellt. Hierfür wurden jeweils lebende, eGFP exprimierende Zellen mit lebenden, nicht rekombinierten Zellen verglichen. Das Experiment wurde dreimal unabhängig unter gleichen Bedingungen durchgeführt und zeigte vergleichbare Ergebnisse.

6.3 Analyse der Signaltransduktion von ITK-SYK

6.3.1 Untersuchung zur intrazellulären Proteinphosphorylierung (*Phosflow™*)

Um potentielle therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, galt es in der vorliegenden Arbeit die Signaltransduktion von ITK-SYK *in vitro* zu analysieren. Hierbei lag der Fokus auf aktivierenden Signalwegen, die von Rezeptoren der T-Zelle angesteuert werden und in deren Signaltransduktion SYK eine Rolle spielt (s. 3.2.2 bis 3.2.4). Für die Untersuchungen kamen transgene Jurkat-Zellen zur Anwendung, mit denen ein leicht zu handhabendes sowie für die Fragestellung etabliertes Modellsystem zur Verfügung stand [1, 77]. Die Charakterisierung der Signalwege erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei intrazellulär gebundene, phosphorylierungsspezifische Antikörper detektiert wurden (s. 5.2.6.3).

In Vorversuchen wurden die notwendigen Bedingungen zur Untersuchung der Signaltransduktion im gewählten Zellsystem sichergestellt: Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Tyrosinkinasedomäne von SYK im Fusionsprotein katalytisch aktiv ist und deren Funktion nach Punktmutation in der ATP-Bindungsstelle zum Erliegen kommt (ITK-SYK^{KD}). Ferner wurde nachgewiesen, dass die Infektion der Jurkat-Zellen mit geeigneten Retroviren zu einer starken Expression von ITK-SYK bzw. ITK-SYK^{KD} führt. Beide Moleküle konnten in den *lipid rafts* der Zellmembran durch Westernblot nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte hier endogenes ITK, wenn auch schwach, zusammen mit ITK-SYK gefunden werden (vgl. [123]).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass ITK-SYK in Jurkat-Zellen die Signalwege des T-Zell-Rezeptors sowie die des CD28-Korezeptors aktiviert. Darüber hinaus ergab sich mit der detektierbaren Phosphorylierung von STAT5 der Hinweis auf Beteiligung eines zytokinspezifischen Signalweges.

6.3.1.1 Untersuchung zur intrazellulären Proteinphosphorylierung nach Expression von ITK-SYK

Hierfür wurden Jurkat-Zellen mit Retroviren zur Expression von ITK-SYK bzw. dessen Kinase-defekten Mutante (ITK-SYK^{KD}) infiziert. Als Kontrolle dienten Viren auf Basis des unveränderten retroviralen Vektors, die nur zu eGFP-Expression in den Zielzellen führen (Mig). Nach retroviraler Infektion wurden die Zellen zum Zeitpunkt t=24h geerntet und wie unter 5.2.6.3 beschrieben untersucht.

Im Vergleich zu ITK-SYK^{KD} und Mig ließ sich für ITK-SYK in unterschiedlichem Maße eine Phosphorylierung der untersuchten Proteine nachweisen (s. Abb. 14 auf Seite 67). Am deutlichsten traf dies für SLP-76 an Tyrosin 128 (pY128) zu. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des phosphorylierungsspezifischen Antikörpers nahm hier im Vergleich zu Mig um das ca. 6,5-fache zu. Für PLCγ1 (pY783) ließ sich eine ca. 2,5-fache Zunahme verzeichnen. Die Analyse von LAT (pY171) und Lck (pY505) ergab einen Anstieg der MFI auf 150 – 200%. Für die Phosphorylierung der ITAMs an CD3ζ ließ sich in ITK-SYK exprimierenden Zellen nur eine schwache Zunahme der MFI feststellen (ca. 125%)

Für rezeptordistale Zielstrukturen wie die untersuchten MAP-Kinasen p38, Erk1/2 und JNK zeigten sich ebenfalls unterschiedliche Signalstärken (s. Abb. 14, C/D). So war ein Anstieg der phosphorylierungsspezifischen Fluoreszenz für p38 (pT180/pY182) nur in geringem Maße objektivierbar (ca. 135%). Für JNK (pY505) und Erk1/2 (pT202/pY204) war eine deutlich größere Zunahme zu verzeichnen (ca. 200%). Insbesondere bei letzterer Kinase bestanden jedoch große interexperimentelle Unterschiede in der MFI, was sich in einer entsprechenden Standardabweichung der Mittelwerte widerspiegelt. Ein konstanteres Phosphorylierungssignal konnte für Akt (Ser437) und STAT5 (pY694) objektiviert werden. Bei letzterer Zielstruktur wurde durch Betrachtung nicht infizierter Zellen eine Phosphorylierung als Folge von IL-2 im Überstand ausgeschlossen. Die Zunahme der MFI betrug für Akt und STAT5 ca. 150 - 180%.

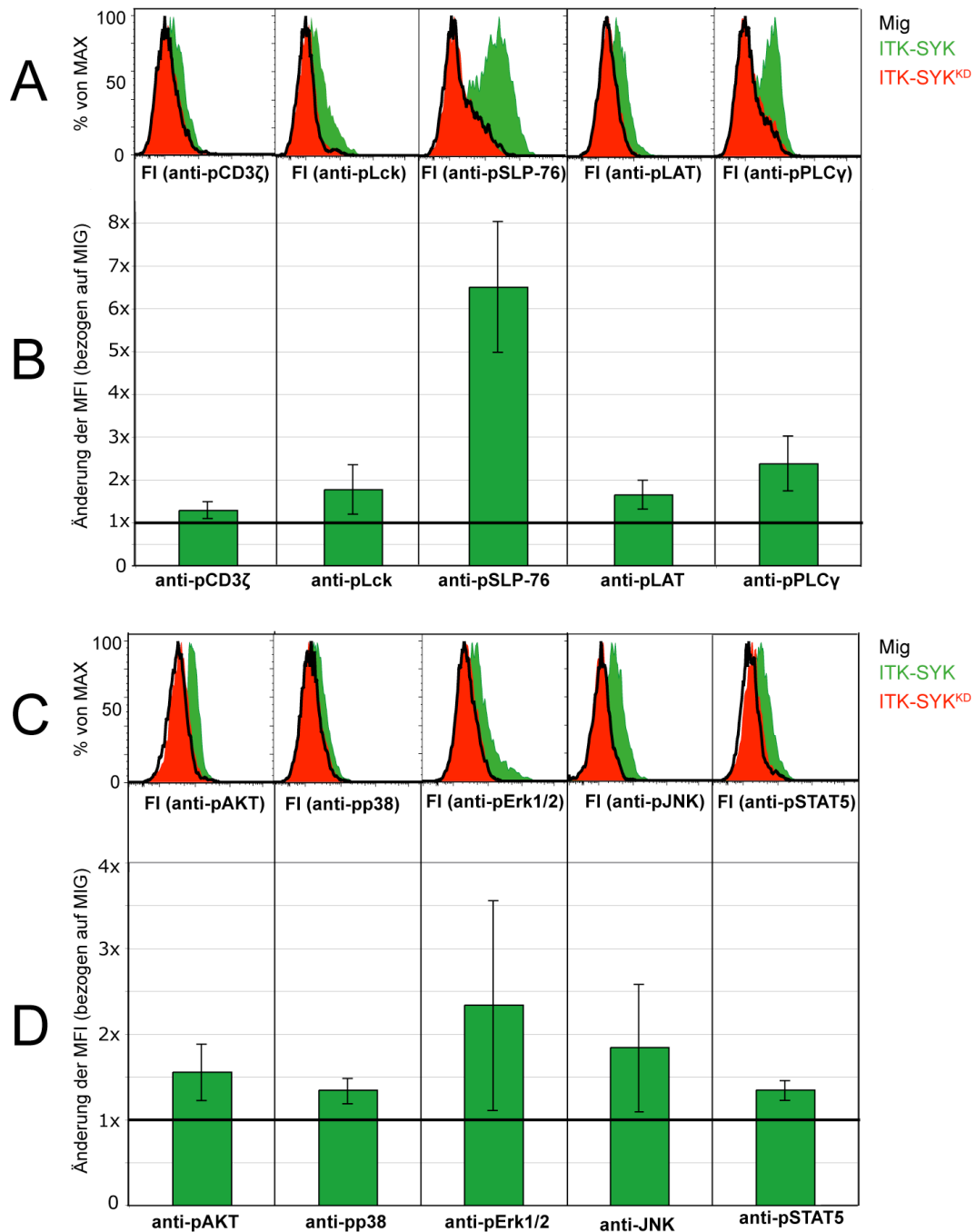


Abb. 14 Phosphorylierung von intrazellulären Signalmolekülen nach Expression von ITK-SYK in Jurkat-Zellen

Nach retroviraler Transduktion von ITK-SYK, ITK-SYK^{KD} oder unverändertem Mig-Vektor (Mig) in Jurkat-Zellen wurde in diesen zum Zeitpunkt t=24h die Phosphorylierung von intrazellulären Signalproteinen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Für jede Zielstruktur ist in A bzw. C exemplarisch die Fluoreszenzintensität (FI) des verwendeten phosphorylierungsspezifischen Antikörpers in den drei Zellpopulationen histographisch dargestellt. In B und D befinden sich als Diagramm die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) aus sechs (bzw. für JNK und STAT5 drei) unabhängigen Experimenten. Die Änderungen der MFI sind auf Mig aus dem jeweiligen Experiment normiert. Bei der Betrachtung der intrazellulären Proteinphosphorylierung wurden nur lebende, eGFP exprimierende Zellen berücksichtigt.

6.3.1.2 Untersuchung zur intrazellulären Proteinphosphorylierung nach Stimulation mit Antikörpern

Zur Darstellung der Phosphorylierung aktivierender Signalmoleküle nach T-Zell-Stimulation wurden Kontrollzellen mit Antikörpern stimuliert und anschließend untersucht. Hierfür wurden Jurkat-Zellen mit Retroviren auf Basis des unveränderten Mig-Vektors infiziert. Nach retroviraler Infektion wurden diese Zellen zum Zeitpunkt $t=24h$ geerntet und mit anti-CD3 sowie anti-CD28 Antikörper stimuliert (s. 5.2.3.7). Anschließend wurden die Zellen wie unter 5.2.6.3 beschrieben, analysiert.

Es zeigte sich nach CD3/CD28-Stimulation eine deutliche Tyrosinphosphorylierung der TZR-assoziierten Signalmoleküle Lck (pY505) und CD3 ζ (pY142) (s. Abb. 15 A/B auf Seite 69). Auch für die rezeptorproximalen Signalproteine SLP-76 (pY128), LAT (pY171) und PLC- γ 1 (pY783) konnte eine Phosphorylierung in unterschiedlichem Maße nachgewiesen werden, wobei das Signal für ersteres Molekül am ausgeprägtesten war (Zunahme der MFI um ca. 350%).

Für rezeptordistale Zielstrukturen wie die untersuchten MAP-Kinasen p38, Erk1/2 und JNK konnte ebenfalls eine Phosphorylierung der untersuchten Aminosäuren nachgewiesen werden (s. Abb. 15, C/D). Die Zunahme der phosphorylierungsspezifischen MFI betrug hierbei zwischen 150% (JNK) und 250% (Erk1/2). Im Gegensatz zu Akt (Ser437) mit einem Anstieg der MFI von ca. 150% konnte für STAT5 keine signifikante Phosphorylierung an pY694 detektiert werden.

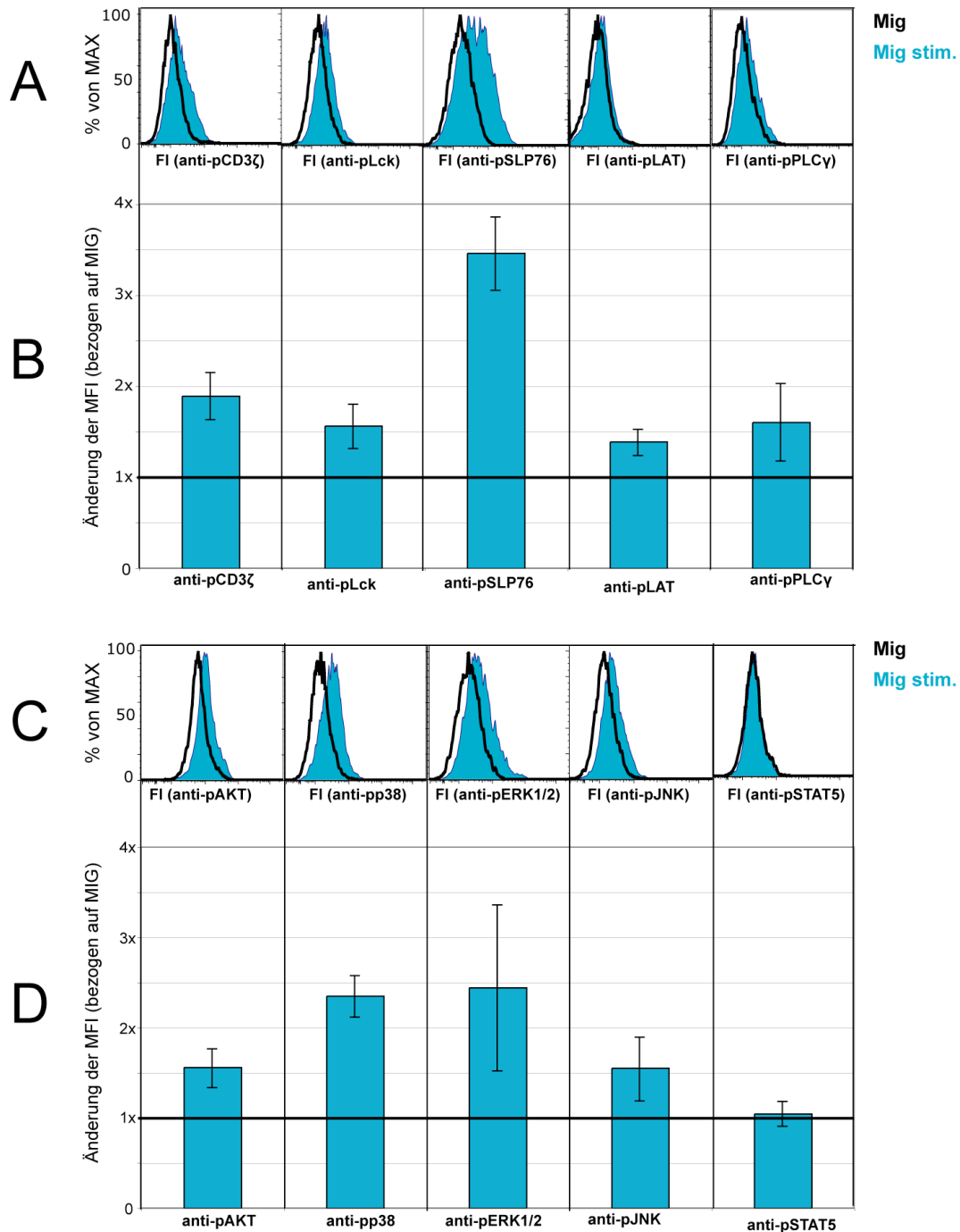


Abb. 15 **Phosphorylierung von intrazellulären Signalmolekülen nach CD3/CD28-Stimulation von Jurkat-Zellen**

Nach retroviraler Transduktion von unverändertem Mig-Vektor (Mig) in Jurkat-Zellen wurde ein Teil dieser Zellen zum Zeitpunkt $t=24\text{h}$ mit Antikörpern für 5 Minuten stimuliert: anti-CD3 ($3\mu\text{g/ml}$) und anti-CD28 ($1\mu\text{g/ml}$). Anschließend wurde die Phosphorylierung von intrazellulären Signalmolekülen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Für jede Zielstruktur ist in A und C exemplarisch die Fluoreszenzintensität (FI) des verwendeten phosphorylierungsspezifischen Antikörpers in den zwei Zellpopulationen histographisch dargestellt. In B und D befindet sich für jeden Antikörper die Darstellung der Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) aus drei unabhängigen Experimenten. Bei der Betrachtung der intrazellulären Proteinphosphorylierung wurden nur lebende, eGFP exprimierende Zellen berücksichtigt.

6.3.2 Inhibitionsexperimente

Zur weiteren Charakterisierung der Signaltransduktion von ITK-SYK in Jurkat-Zellen wurden wichtige Moleküle für die T-Zell-Aktivierung pharmakologisch inhibiert (s. 5.2.3.8). In der vorliegenden Arbeit konnte so gezeigt werden, dass die Aktivierung durch ITK-SYK die Funktionsfähigkeit der untersuchten Signalwege des T-Zell-Rezeptors sowie des CD28-Korezeptors voraussetzt.

Nach retroviraler Transduktion von ITK-SYK wurden die verwendeten Jurkat-Zellen mit in Medium verdünnten Inhibitoren inkubiert. Nach 48h erfolgte die Bestimmung der IL-2-Sekretion im Vergleich zu ITK-SYK exprimierenden Jurkat-Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel des jeweiligen Inhibitors inkubiert wurden. Die Konzentration an IL-2 wurde mittels ELISA bestimmt (s. Abb. 16 auf Seite 71).

Bei Inhibition der rezeptorproximalen Zielstrukturen Syk oder PKC durch R406 oder AEB071 zeigte sich ein komplettes Sistieren der IL-2-Sekretion. Ebenso ließ sich dies bei wichtigen Strukturen der untersuchten Signalwege hin zu NFAT (via Cyclosporin A), NFκB (via BMS-345541), p38 (via SB203580) sowie AKT (via Ly294002) beobachten. Bei Inhibition der Kinasen MEK (via PD98059) sowie mTORC1 (via Rapamycin) war die Sekretion von IL-2 zu ca. 90% inhibiert. Bei Hemmung von p65 (via Helenalin) war die Sekretion von IL-2 zu ca. 85% sowie bei JNK (via SP60125) zu ca. 75% supprimiert. Nach Hemmung der Proteasefunktion von Malt1 (via z-VRPR-fmk) war noch ca. 40% von IL-2 auffindbar. Keine signifikante Hemmung der IL-2-Sekretion zeigte sich bei Einsatz des Naturstoffes Curcumin sowie des Proteasominhibitors Bortezomib.

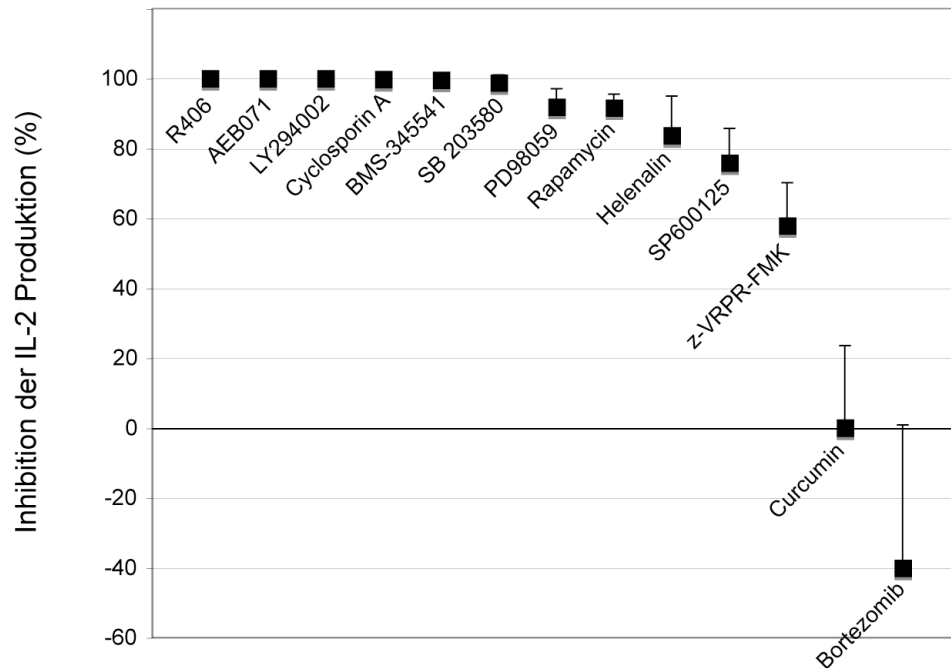


Abb. 16 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die IL-2-Sekretion von ITK-SYK exprimierenden Jurkat-Zellen

Nach retroviraler Transduktion von ITK-SYK in Jurkat-Zellen wurden diese 48h in RPMI¹⁰⁺-Medium mit je einem der folgenden Inhibitoren inkubiert: R406 (2 μ M), AEB071 (1 μ M), LY294002 (50 μ M), Cyclosporin A (1 μ g/ml), BMS-345541 (10 μ M), SB203580 (50 μ M), PD98059 (25 μ M), Rapamycin (10nM), Helenalin (1,0 μ M), SP600125 (10 μ M), z-VRPR-fmk (75 μ M), Curcumin (5 μ M), Bortezomib (6,25nM). Anschließend wurde die Konzentration an IL-2 im Überstand mit der von unbehandelten, ITK-SYK exprimierenden Jurkat-Zellen verglichen. Diesen Kontrollzellen war lediglich das Lösungsmittel der entsprechenden Substanz zugesetzt. Die Konzentration an IL-2 wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Inhibition aus vier unabhängigen Experimenten.

7 Diskussion

7.1 Das transformierende Potential von ITK-SYK im Mausmodell

Die Translokation t(5;9)(q33;q22) mit Expression des Fusionsproteins ITK-SYK konnte für eine Subgruppe von uPTZL als wiederkehrendes Ereignis identifiziert werden [157]. Streubel *et al.* zeigten, dass jene Subgruppe ein vergleichbares histologisches Muster sowie Immunphänotyp aufweist. Diese Tatsache ließ uns davon ausgehen, dass ITK-SYK an der Lymphomentstehung beteiligt ist. Um diese Hypothese zu testen, wurden von Pechloff *et al.* zwei Mausmodelle generiert [123]. Es zeigt sich in beiden Modellen eine lymphoproliferative Erkrankung durch ITK-SYK exprimierende T-Zellen, die klinisch sowie pathologisch dem humanen PTZL ähnelt [123]. Um die sichere Diagnose eines PTZLs in den Mausmodellen stellen zu können, bedurfte es zusätzlich des Nachweises von Klonalität (s. 3.1.2.1). In der vorliegenden Arbeit galt es, die murine lymphoproliferative Erkrankung beider Mausmodelle darauf zu untersuchen. Es konnte ein durchflusszytometrischer Hinweis auf Klonalität mit einer hierfür etablierten, molekularbiologischen Methode zur TZR-Spektratypisierung bestätigt werden. Die Ergebnisse wurden zusammen mit der Beschreibung der Mausmodelle publiziert [123].

7.1.1 Der Nachweis von Klonalität in hämatologischen Neoplasien

Die Technik des *Southern Blot* gilt als Goldstandard zur Diagnostik von Klonalität in hämatologischen Malignomen [168]. Entsprechend wurde diese Technik auch in mehreren Studien mit Mausmodellen angewendet [34, 50, 175]. Das Prinzip beruht auf der Detektion rekombinierter DNS-Fragmente nach Verdau mit Restriktionsenzymen [155, 169]. Die Darstellung erfolgt durch radioaktiv markierte Gensonden [155]. Im Vergleich zur PCR-basierten Spektratypisierung ergeben sich jedoch mehrere Nachteile: Die Analyse mit *Southern Blot* ist zeitaufwändig, technisch herausfordernd und benötigt eine große Menge an DNS von guter Qualität [168]. Darüber hinaus ist die Sensitivität im Vergleich zur Spektratypisierung reduziert (5-10% versus 1-5%) [168]. Dies dürfte u.a. damit zusammenhängen, dass letztere Technik mit entsprechenden Primern auch inkomplette Rekombinationen zu detektieren vermag (s. 3.2.1.1)

Ein Nachteil der PCR-basierten Methode besteht in der Möglichkeit falsch negativer Ergebnisse aufgrund suboptimaler Primerhybridisierung [168]. Um dieser Problematik in der vorliegenden Arbeit adäquat zu begegnen, wurden mithilfe mehrerer Versuchsreihen die bestmöglichen Reaktionsbedingungen ermittelt.

Falsch positive Ergebnisse sind für die Analyse mit *Southern Blot* bei geeigneter Auswahl der untersuchten Genloci selten [168, 169]. Dies gilt auch für die PCR-basierte Methode mit hochauflösender Längenanalyse der Amplifikate. Hierzu gehört das in der vorliegenden Arbeit verwendete *GeneScanning*TM [88]. Aufgrund der oben erwähnten Eigenschaften verdrängt die PCR-basierte Technik zunehmend die Analyse mittels *Southern Blot* [168].

Die Durchflusszytometrie mit mehreren Antikörpern gegen unterschiedliche variable Domänen der TZR β -Kette stellt eine weitere Möglichkeit zur Spektratypisierung von T-Zellen dar [94]. Inkomplette Genumlagerungen sowie Tumorzellen mit $\gamma\delta$ -Phänotyp oder ohne Expression eines TZR können jedoch nur indirekt über den Verlust aller detektierbarer Epitope erkannt werden, wenn sich die klonalen Zellen nicht in einem polyklonalen Hintergrund befinden [94, 168]. Aus diesem Grund sind molekularbiologische Methoden heutzutage unverzichtbar, da sie klonale Zellen in polyklonalem Hintergrund bis zu einem Anteil von 10% zu detektieren vermögen [168]. In der Literatur werden zur durchflusszytometrischen Spektratypisierung derzeit 20 bis 25 monoklonale Antikörper gegen variable Domänen der TZR β -Kette verwendet [94, 168]. Aufgrund der intrinsischen eGFP-Fluoreszenz der proliferierenden T-Lymphozyten in den Mausmodellen von Pechloff *et al.* standen jedoch nur 9 Antikörper zur Verfügung. Nur diese waren an Fluorochromen gekoppelt, die nicht mit eGFP interferieren. Eine Diagnose bezüglich Klonalität konnte entsprechend nicht alleine mittels Durchflusszytometrie getroffen werden.

7.1.2 Der Nachweis von Klonalität in den Mausmodellen mit konditionaler Expression von ITK-SYK

In Zusammenschau mit der klinischen Präsentation, der Immunhistologie sowie Immunphänotypisierung stellt die Untersuchung auf Klonalität ein wichtiges Werkzeug dar, um zwischen reaktiven, autoimmunen oder malignen Prozessen zu unterscheiden [31, 168]. Mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode zur TZR-Spektratypisierung mittels *GeneScanning*TM konnte für die Mausmodelle von Pechloff *et al.* [123] der durchflusszytometrische Hinweis auf Klonalität bestätigt werden. Es zeigte sich hierbei in jedem untersuchten Individuum eine klonale lymphoproliferative Erkrankung. In der Zusammenschau mit Immunhistologie und Immunphänotypisierung konnte die murine Erkrankung durch konditionale Expression von ITK-SYK als peripheres T-Zell-Lymphom klassifiziert werden [123]. Dieses ähnelt klinisch wie auch pathologisch der menschlichen Erkrankung [123]. Somit wurde ein murines Modell des humanen PTZLs generiert, mit dessen Hilfe die transformierenden Signalwege *in vivo*

untersucht werden können. Letztendlich sind diese Erkenntnisse zur Etablierung dringend benötigter, zielgerichteter Therapieverfahren unabdingbar (s. 7.3.6).

Es ist anzumerken, dass eine genaue Quantifizierung der Klone mithilfe der PCR-basierten Methode nicht möglich ist, da es neben zwei Rekombinationen in einem Allel auch zu biallelischen Genumlagerungen und solchen in nicht untersuchten Genloci kommen kann (s. 3.2.1.1). Die Tatsache, dass mehrfach zwei komplette Genumlagerungen der TZR β -Kette pro Maus sowie zwei Rekombinationen pro PCR-Reaktion zu detektieren waren, lässt jedoch eher eine (oligo-)klonale als eine monoklonale Erkrankung vermuten. Die Sequenzierung der vorhandenen Genumlagerungen könnte herangezogen werden, um die genaue Anzahl an Klonen in einer Maus zu bestimmen. Dierks *et al.* untersuchten Mäuse nach Transplantation von ITK-SYK exprimierendem Knochenmark ebenfalls auf Klonalität [46]. Die Autoren benutzten hierfür eine PCR-basierte Methode zum Nachweis funktioneller Rekombinationen der TZR β -Kette. Es zeigte sich, wie auch in Transplantationsmodellen mit *bona fide* Onkogenen, eine polyklonale Erkrankung [46]. Nach Retransplantation der expandierten Zellen stellten die Autoren hingegen in drei von vier Mäusen eine mono-/biklonale Erkrankung fest [46]. Aufgrund der oben genannten Einschränkungen sowie der Tatsache, dass Dierks *et al.* keine inkompletten TZR β -Genumlagerungen oder solche des TZR γ -Genlocus untersuchten, ist die Aussage bezüglich Quantität der Klone nicht haltbar. Korrekterweise müsste die murine Erkrankung nach Retransplantation als klonale Lymphoproliferation klassifiziert werden.

Die Beobachtung von Dierks *et al.* nach Retransplantation und die eigenen Ergebnisse weisen auf die kooperative Beteiligung weiterer genomischer Mutationen am Proliferationsvorteil einzelner Klone hin. Inwieweit ITK-SYK neben der Initiation auch an der Aufrechterhaltung des Lymphoms beteiligt ist, bleibt derzeit unklar (s. 7.3.5.2).

7.2 Zelluläre Folgen der ITK-SYK-Expression

Das Fehlen dringend benötigter, zielgerichteter Therapiestrategien für uPTZL hängt mit der schlecht verstandenen Pathobiologie dieser Erkrankung zusammen [5]. Anhand der in einer Subgruppe von uPTZL identifizierten Fusionstyrosinkinase ITK-SYK ergab sich die Möglichkeit, molekulare Zusammenhänge der Pathogenese zu beleuchten [157]. Vor Analyse der durch ITK-SYK aktivierten Signalwege galt es die zellulären Folgen der ITK-SYK-Expression zu untersuchen.

7.2.1 Verwendete Zellen

Nach Beobachtungen zur physiologischen Rolle von Kinasen der SYK-Familie in T-Zellen nahmen wir an, dass ITK-SYK antigen- und zytokinunabhängig aktivierende Signalwege der T-Zelle anzuschalten vermag (s. 4.2). Um diese Hypothese zu testen, wählten wir Jurkat-Zellen. Ausschlaggebend war, dass eine Vielzahl von Studien zur Signaltransduktion des TZR mithilfe dieses etablierten Zellsystems durchgeführt wurden [1]. Der Vorteil von Jurkat-Zellen liegt außerdem in der einfachen Handhabung und der Möglichkeit des effizienten Gentransfers (s. 5.2.3.6). Des Weiteren ermöglichte das gewählte Modellsystem, die Signaltransduktion von ITK-SYK in humanen Zellen zu untersuchen [150]. Leider kann jedoch für die immortalisierten Jurkat-Zellen nicht ausgeschlossen werden, dass sich ihre Physiologie von natürlichen T-Zellen unterscheidet [1]. Einige Wissenschaftler stellen sogar die physiologische Relevanz von Experimenten mit Jurkat-Zellen in Frage [1, 11, 152]. Der Grund hierfür ist, dass eine reduzierte Expression von *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN) für Jurkat T-Zellen gezeigt werden konnte [11]. Verlust dieser Phosphatase führt zur konstitutiven Aktivierung von PI3K-abhängigen Signalwegen [151]. In der Folge könnte die Wichtigkeit dieser Signalwege in Studien mit Jurkat T-Zellen falsch interpretiert werden [11]. Es bleibt unklar, inwieweit die abnormale Expression von PTEN tatsächlich die Antwort von Jurkat T-Zellen auf TZR-Stimulation verändert [1].

Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurde in der vorliegenden Arbeit angestrebt, auch Untersuchungen zur Signaltransduktion von ITK-SYK in nicht transformierten murinen T-Zellen durchzuführen. Zum Einsatz kam hierbei die Technik der Proteintransduktion *in vitro* (s. 5.2.4.3). Leider war nach Aufreinigung sowie Inkubation mit modifizierter Cre-Rekombinase ein sehr hoher Zellverlust zu verzeichnen. Aus diesem Grund konnten zellzahlintensive Analysen nicht durchgeführt werden. Hierzu gehören die Analyse der intrazelluläre Proteinphosphorylierung sowie Inhibitionsexperimente.

7.2.2 Aktivierung von T-Zellen durch ITK-SYK

Zunächst wurden Jurkat-Zellen sowie murine CD4-positive T-Zellen nach Expression von ITK-SYK auf Anzeichen von Aktivierung untersucht. Hierzu gehören neben Sekretion von IL-2 [162] auch die Präsentation von Antigenen wie CD25, CD69 [27] und CD44 sowie CD62L [75]. Des Weiteren führt die Stimulation des TZR bei Jurkat-Zellen zum Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) [45]. Im Falle der murinen CD4-positiven T-Zellen wurde neben Aktivierungsmarkern die herabregulierte Expression des TZR-Komplexes [166] sowie die Zunahme des Zellvolumens untersucht [73].

Es zeigte sich, dass ITK-SYK in Jurkat-Zellen zu Expression von CD69 wie auch zu Sekretion von IL-2 führt (s. 6.2.1.2 und 6.2.1.3). Eine im Zeitverlauf verminderte Zellzahl sowie reduzierte Viabilität der untersuchten Jurkat-Zellen kann als Hinweis auf AICD gedeutet werden (s. 6.2.1.1). Interessanterweise war die Quantität der IL-2-Sekretion sowie des AICDs bei ITK-SYK exprimierenden Jurkat-Zellen um ein Vielfaches höher als bei den Stimulationskontrollen. Im Falle von CD69 zeigte sich ein mit dem starken Stimulus PMA/Ionomycin vergleichbares Niveau. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte ein beträchtlicher Unterschied zwischen der Signalstärke von ITK-SYK und der physiologischen TZR-Stimulation sein. Letztere wurde in den Experimenten durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 simuliert. Allerdings kann ein Unterschied der Signalstärken aufgrund der unter 7.2.1 beschriebenen Einschränkungen nicht mit letzter Sicherheit angenommen werden. Insbesondere die Tatsache, dass die Aktivierung durch ITK-SYK von PI3K abhängt (s. 7.2.3), könnte zusammen mit einer defizienten Expression von PTEN in Jurkat-Zellen zu einer Fehlinterpretation der Signalstärke des Fusionsproteins führen. Des Weiteren unterscheiden sich die Signale der physiologischen TZR-Stimulation und der von ITK-SYK unter kinetischen Gesichtspunkten, was grundsätzlich die Qualität einer T-Zell-Antwort beeinflussen kann [159]. Im Gegensatz zur physiologischen TZR-Ligation, die selbstlimitierend verläuft, handelt es sich bei ITK-SYK um eine chronische Stimulation durch die konstitutiv aktive Tyrosinkinase (s. 7.2.4).

Nach Expression von ITK-SYK in murinen CD4-positiven T-Zellen konnte für alle untersuchten Parameter eine Zellaktivierung festgestellt werden (s. 6.2.2). Für periphere T-Lymphozyten führt die Stimulation des TZR neben Präsentation von Aktivierungsmarkern zu einer reduzierten Apoptoseneigung sowie erhöhter Proliferationsrate [112]. Entsprechend ergänzen folgende Befunde die Ergebnisse: Dierks *et al.* konnten in ITK-SYK-positiven T-Zellen eine reduzierte Apoptose *in vitro* feststellen [46]. Pechloff *et al.* konnten immunhistochemisch eine hohe Proliferationsrate im Mausmodell mit Expression von ITK-SYK in CD4-positiven Zellen zeigen [123]. Auch die Deletion von Thymozyten *in vivo* weist hier auf eine Aktivierung durch ITK-SYK vergleichbar mit regulärer TZR-Ligation hin [123].

Offensichtlich führt die Expression von ITK-SYK *in vitro* sowie *in vivo* zu Aspekten der physiologischen T-Zell-Aktivierung.

7.2.3 Die Rolle der *Pleckstrin homology*-Domäne für die Funktion von ITK-SYK

Fusionsproteine mit konstitutiver Aktivierung von Proteintyrosinkinasen (PTK) wie BCR-ABL, NPM-ALK oder TEL-PDGFR finden sich häufig in hämatologischen Malignomen [165]. In der Mehrheit liegt hier die PTK-Domäne mit einem Motiv zur Oligo- oder Dimerisierung vor, was für die Aktivierung der Kinase wesentlich ist [165]. Interessanterweise findet sich in ITK-SYK neben der PTK-Domäne kein entsprechendes Motiv [157]. Allerdings enthält das Fusionsprotein die PH-Domäne von ITK, die in ITK-SYK durch ein Fehlen an Elementen zur Autoinhibition gekennzeichnet ist (s. 3.3). Die PH-Domäne vermag PIP₃ der Zellmembran zu binden. Letzteres wird durch PI3K gebildet [84]. Bereits 2006 wurde eine wichtige Rolle von PH-Domäne und PI3K für die Aktivierung des Fusionsproteins angenommen [179]. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit mit einem PI3K-Inhibitor (Ly294002) die Aktivierung durch ITK-SYK unterbrochen werden. Nach Inkubation mit der Substanz war ein komplettes Sistieren der IL-2-Sekretion von ITK-SYK exprimierenden Jurkat-Zellen zu verzeichnen (s. 6.3.2). Auch Ergebnisse von Pechloff *et al.* unterstreichen die Wichtigkeit der PH-Domäne für die Aktivierung durch ITK-SYK [123]. Hierbei wurde die inaktivierende Punktmutation R29C in die PH-Domäne von ITK-SYK eingefügt (ITK-SYK^{PHmut}). Wird diese Mutante in Jurkat-Zellen transduziert, bleibt jegliche CD69-Expression sowie Sekretion von IL-2 aus [123]. Ebenso lässt sich ITK-SYK^{PHmut} nicht in *lipid rafts* derselben Zellen nachweisen, noch führt es zu Tyrosinphosphorylierung von *lipid raft*-assoziierten Proteinen [123].

Rigby *et al.* konnte mit derselben Punktmutation eine verminderte katalytische Aktivität und aufgehobene Phosphorylierung von ITK-SYK an Y385/386 in 293T- und Jurkat-Zellen feststellen [136]. Die entsprechenden Phosphotyrosine in der Aktivierungsschleife von SYK (pY525/526) eignen sich als guter Indikator für die katalytische Aktivität der Kinase [26, 147]. Eine Dephosphorylierung von Y385/386 in ITK-SYK wurde auch durch Inkubation mit Ly294002 erreicht [136]. Koexpression von ITK-SYK mit einer konstitutiv aktiven Form von PI3K erhöht hingegen die Phosphorylierung des Fusionsproteins an selber Stelle [136]. Außerdem konnten die Autoren durch Verwendung von ITK-SYK^{PHmut} die Membranassoziation sowie das Transformationspotential des Fusionsproteins in 293T- und NIH3T3-Zellen unterbinden [136].

Hussain *et al.* konnten eine gleichgerichtete Wirkung von ITK-SYK^{PHmut} auf die Phosphorylierung von Y385/386 und Y212 in COS-7 und 293T-Zellen nachweisen [79]. Das Analogon von Y212 in SYK zeigt eine konstitutiv aktive katalytische Aktivität an [26]. Außerdem konnten die Autoren in 293T-Zellen eine PI3K-abhängige Phos-

phorylierung von SLP-76 durch ITK-SYK demonstrieren [79]. Eine von der PH-Domäne abhängige Membranassoziation wird in COS-7-Zellen gezeigt [79].

Die aufgeführten Ergebnisse veranschaulichen die wesentliche Rolle der PH-Domäne für die funktionelle Aktivierung von ITK-SYK *in vitro*. Rigby *et al.* konnten zudem durch Myristoylierung von ITK-SYK^{PHmut} zeigen, dass die Membranlokalisation die ausschlaggebende Determinante für die aktivierende Phosphorylierung des Fusionsproteins *in vitro* ist [136]. Ein möglicher Mechanismus könnte gemäß Wossning *et al.* wie folgt aussehen:

Die PH-Domäne von ITK-SYK vermittelt die Rekrutierung des Fusionsproteins zur Zellmembran durch Bindung an PIP₃ [84]. Das bringt die PTK-Domäne in die Nähe von weiteren Fusionsmolekülen zur Autophosphorylierung mit konsekutiver Aktivierung [136]. Auch könnte eine Änderung der Konformation von ITK-SYK nach Bindung an PIP₃ zur Aktivierung beitragen [136]. Schließlich ermöglicht die intakte PH-Domäne eine Interaktion mit membranassoziierten Substraten wie PI3K [179]. Dieses ist als Substrat von SYK bekannt [16]. PI3K katalysiert nach Aktivierung durch ITK-SYK weiteres PIP₃ [179]. Die Folge ist ein „Circulus vitiosus“ durch reziproke Aktivierung von ITK-SYK und PI3K, die zu einer abnormalen Bildung von PIP₃ führt [179]. Anzumerken sei, dass die Bildung von PIP₃ auch zu Rekrutierung von endogenem ITK an die Zellmembran führt [123]. Inwieweit dieser Umstand für die Effektorfunktionen von ITK-SYK von Bedeutung ist, bleibt zu klären.

Interessanterweise konnte Dierks *et al.* eine konträre Rolle der PH-Domäne von ITK-SYK *in vivo* demonstrieren [46]: Die Autoren transplantierten ITK-SYK exprimierendes Knochenmark in BALB/c Mäuse. Das führte zu einer lymphoproliferativen Erkrankung durch T-Zellen. Nach Verwendung von ITK-SYK^{PHmut} wurde diese jedoch noch verstärkt. Dierks *et al.* zeigen zudem, dass die Membranlokalisierung durch die intakte PH-Domäne von ITK-SYK in 293T-Zellen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Y183 führt [46]. Das Analogon in SYK (Y323) ist als Bindungsstelle für *Casitas B-lineage Lymphoma* (Cbl) bekannt, das als E3-Ubiquitin-Ligase einen Negativregulator der T-Zell-Aktivierung darstellt [120]. Mit einer forcierten Membranrekrutierung durch Punktmutation in der PH-Domäne (E42K) lässt sich sowohl die Phosphorylierung von Y183 *in vitro* als auch der inhibierende Einfluss auf die murine Erkrankung weiter steigern [46]. Nach Austausch des kritischen Tyrosinrestes durch Phenylalanin (Y323F) können beide Effekte revidiert werden [46]. Dierks *et al.* konnten so zeigen, dass eine funktionelle PH-Domäne zu Membranrekrutierung von ITK-SYK führt. Die Autoren nehmen an, dass die dadurch gesteigerte Assoziation

von ITK-SYK mit Cbl der lymphoproliferativen Erkrankung im Mausmodell entgegen wirkt [46].

Offensichtlich unterscheidet sich die Aktivierung von ITK-SYK im Transplantationsmodell vom weiter oben skizzierten Mechanismus gemäß Wossning *et al.* Die Autoren Dierks *et al.* vermuten weiter, dass die fehlende Autoinhibition der PTK-Domäne (s. 3.3) zur Aktivierung des Fusionsproteins ausreichen könnte. Die Aktivierung von ITK-SYK^{PHmut} könnte hierbei analog zur Fusionstyrosinkinase FIP1L1-PDGFR α erfolgen. FIP1L1 unterbricht lediglich die Autoinhibition der PTK-Domäne von PDGFR α und bleibt selbst für die Transformation entbehrlich [156].

Weiterführende Studien scheinen deshalb für das Verständnis der Tumorbologie unerlässlich zu sein. Insbesondere die Evaluation der PH-Domäne als potentielle Zielstruktur könnte einen zusätzlichen therapeutischen Ansatz für uPTZL mit t(5;9)(q33;q22) liefern [136]. Die Mausmodelle mit Expansion maligner, ITK-SYK exprimierender T-Zellen stellen hierbei ein wertvolles Werkzeug dar [123]. Mithilfe von Inhibitionsexperimenten könnte die entsprechende Fragestellung angegangen werden [36].

7.2.4 Die Rolle der Proteintyrosinkinase-Domäne für die Funktion von ITK-SYK

Die Transduktion von ITK-SYK^{KD} führt in Jurkat-Zellen zu keinerlei CD69-Expression, AICD oder Sekretion von IL-2 (s. 6.2.1). Letzteres konnte ebenso durch Inkubation von ITK-SYK exprimierenden Jurkat-Zellen mit dem SYK-Inhibitor R406 erreicht werden (s. 6.3.2). Eine fehlende Transformation durch ITK-SYK^{KD} in NIH3T3-Zellen sowie im Mausmodell von Dierks *et al.* ergänzen diese Befunde und weisen auf die essenzielle Rolle der PTK-Domäne für die Effektorfunktionen von ITK-SYK hin [46, 136]. Letztere Arbeitsgruppe konnte auch durch Verwendung des SYK-Inhibitors Curcumin die murine Erkrankung nach Transplantation von ITK-SYK exprimierendem Knochenmark inhibieren sowie Apoptose in ITK-SYK-positiven T-Zellen *in vitro* induzieren [46].

Neben Effektorfunktionen scheint die Proteintyrosinkinase (PTK-)Domäne von ITK-SYK auch wichtig für dessen Autophosphorylierung und somit konstitutive katalytische Aktivität zu sein [79, 136]. Dies konnte für unterschiedliche Phosphotyrosine in ITK-SYK gezeigt werden (s. Tabelle 8 auf S.80). Für diese Untersuchungen verwendeten die aufgeführten Autoren ebenfalls ITK-SYK^{KD}. Mit einer pharmakologischen Inhibition von ITK-SYK mittels Piceatannol und Curcumin konnten ähnliche Ergebnisse in 293T-Zellen erzielt werden [46, 136]. Eine residuale Phosphorylierung von Y352 im selben Zellsystem weist jedoch auf die Möglichkeit von

Transphosphorylierung durch weitere Kinasen hin [79]. Ebenfalls in 293T-Zellen konnten Dierks *et al.* sogar eine von ITK-SYK gänzlich unabhängige Phosphorylierung von Y352 zeigen [46]. Dies konnten Rigby *et al.* nach Einsatz des Phosphatase-Inhibitors Pervanadat in 293T- und Jurkat-Zellen beobachten [136].

Die PTK-Domäne von ITK-SYK scheint also wesentlich für die Effektorfunktionen und Autophosphorylierung des Fusionsproteins zu sein. Sie stellt somit einen vielversprechenden Kandidaten zur Evaluation als therapeutische Zielstruktur für uPTZL mit t(5;9)(q33;q22) dar [46]. Dies könnte mittels Inhibitionsexperimenten in den Mausmodellen von Pechloff *et al.* erfolgen [36, 123].

detektierte Phosphotyrosine in ITK-SYK	verwendete Zellsysteme	Referenz	Pendant in SYK	Funktion des Phosphotyrosin in SYK
pY212	293T, COS-7	[46, 79]	pY352	Aktivierung durch Konformationsänderung [26]
pY385/386	293T, COS-7, Jurkat	[79, 136]	pY525/526	Ermöglicht maximale katalytische Aktivität und Signaltransduktion [26]

Tabelle 8 Übersicht der detektierten Phosphotyrosine von ITK-SYK in der Literatur

7.3 Die Signaltransduktion von ITK-SYK

Um potentielle therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, galt es in der vorliegenden Arbeit die Signaltransduktion von ITK-SYK *in vitro* zu analysieren. Streubel *et al.* nahmen bereits 2006 an, dass das Fusionsprotein SYK-assoziierte Signalwege ansteuert [157]. SYK wird durch Tumornekrosefaktor (TNF) in Jurkat-Zellen aktiviert und schaltet Signalwege hin zu MAPK und NFκB an [161]. Folglich untersuchten die Autoren Proben von uPTZL mit t(5;9)(q33;q22) auf Aktivierung von p38, Erk1/2 sowie NFκB (s. 7.3.5.2). Hussain *et al.* vermuteten hingegen ein Mitwirken von Signalwegen, die durch SYK im Zusammenhang mit der Fusionstyrosinkinase Tel-SYK aktiviert werden [79]. Hierzu zählen PI3K/Akt, MAPK und STAT5 [85]. Eine systematische Analyse der Signaltransduktion von ITK-SYK wurde bisher jedoch nicht durchgeführt. Entsprechend stellt die vorliegende Arbeit die erste, systematische Untersuchung zur Signaltransduktion von ITK-SYK *in vitro* dar. Da SYK in aktivierende Signalwege der T-Zelle involviert ist, lag der Fokus auf entsprechenden Signalproteinen (s. 3.2.2 bis 3.2.4). Mit diesem Ansatz werden auch die bisherigen Hypothesen von Streubel *et al.* und Hussain *et al.* berücksichtigt. Die Charakterisierung der Signalwege erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels Durchflusstrometrie

(*Phosflow*TM) sowie mithilfe einer Vielzahl von Inhibitoren gegen Signalproteine aktivierender Signalwege der T-Zelle.

Es konnte gezeigt werden, dass ITK-SYK Aspekte der physiologischen Stimulation des T-Zell-Rezeptors imitieren kann. Hierbei vermag das Fusionsprotein ligandenunabhängig die Signalwege des TZR und seines Korezeptors CD28 zu aktivieren. Darüber hinaus ließ sich mit der Tyrosinphosphorylierung von STAT5 der Hinweis auf Beteiligung eines zytokinspezifischen Signalweges objektivieren. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit über die Funktionsweise der Fusionstyrosinkinase ITK-SYK fanden überwiegend Einzug in die Publikation von Pechloff *et al.* [123].

7.3.1 Analyse von intrazellulärer Proteinphosphorylierung mittels *Phosflow*TM

„Fast alle Aspekte des Zellebens werden durch reversible Phosphorylierung von Proteinen kontrolliert [...]“ [36]. Um die Signaltransduktion von ITK-SYK zu analysieren, wurde entsprechend die Phosphorylierung von Molekülen in aktivierenden Signalwegen der T-Zelle untersucht. Dies erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei intrazellulär gebundene, phosphorylierungsspezifische Antikörper über die an sie gekoppelte Fluorochrome detektiert wurden (*Phosflow*TM) [126]. Diese Methode ermöglicht es, mehrere Signalwege parallel zu untersuchen. Mit *Phosflow*TM können darüber hinaus individuelle Zellpopulationen einer Probe diskriminiert werden, was mit ELISA oder Immunoblot nicht möglich ist [180]. Dies trägt zur hohen Sensitivität der Methode bei. Die Tatsache, dass die detektierbare Fluoreszenzintensität der an die verwendeten Antikörper gekoppelten Fluorochrome von Fixierung, Permeabilisierung sowie Färbemethode abhängt, kann in manchen Fällen die Sensitivität beeinträchtigen [180]. Ebenfalls spielt die Wahl der Fluorochrome eine wichtige Rolle [92]. Soweit es möglich war, wurden diese Punkte in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. Des Weiteren wurde sichergestellt, dass ein phosphorylierungsspezifisches Signal nicht durch Größenzunahme der aktivierten Zellen imitiert wurde.

Anzumerken sei außerdem, dass die Avidität der verwendeten Antikörper gegenüber ihrer Zielantigene nicht bekannt ist. Ein absoluter Vergleich bezüglich der Beteiligung einzelner Signalproteine ist deshalb mit *Phosflow*TM nicht sinnvoll. Um die Beteiligung der einzelnen Komponenten an der Signaltransduktion von ITK-SYK zu charakterisieren, sind weitere Ansätze vonnöten.

Als Vergleichsgrundlage wurde die Analyse intrazellulärer Proteinphosphorylierung von CD3/CD28-stimulierten Jurkat-Zellen erstellt (s. 6.3.1.2). Das physiologische T-Zell-Signal ist ein kinetischer Prozess, der durch negative Rückkopplung begrenzt wird

[153, 159]. Entsprechend konnte in den CD3/CD28-stimulierten Jurkat-Zellen nach 30min kaum mehr entsprechende Proteinphosphorylierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Insofern kann kein absoluter Vergleich mit dem chronischen Signal durch ITK-SYK erfolgen (s. 7.2.4).

7.3.2 Analyse der Signaltransduktion mittels Inhibitoren

Um die Signaltransduktion von ITK-SYK auf einer weiteren Ebene zu betrachten, kam eine Vielzahl von Inhibitoren zum Einsatz. Entsprechend unserer Hypothese wählten wir Substanzen aus, die gegen unterschiedliche Moleküle aus aktivierenden Signalwegen der T-Zelle gerichtet sind. Aktuelle Studien zur zielgerichteten Therapie von PTZL unterstützen dieses Vorgehen, da sie u.a. ebenfalls diesen Ansatz verfolgen [181, 182].

Kleine, zellpermeable Inhibitoren haben mehrere Vorzüge, um Signalwege zu untersuchen [39]. So ermöglichen sie es, schnell und einfach die Rolle von Proteinkinasen und weiteren Effektoren zu bestimmen. Hierbei hemmen sie endogene Zielstrukturen, sodass experimentell keine dominant-negativen oder konstitutiv aktiven Signalmoleküle überexprimiert werden müssen [39]. Des Weiteren können viele Inhibitoren in weiterführenden Studien *in vivo* eingesetzt werden und so die Grundlage neuer Therapiestrategien bilden [36]. Jedoch müssen Schlussfolgerungen aufgrund alleiniger Interpretation von Inhibitionsexperimenten mit Bedacht erfolgen. Der Grund hierfür ist, dass einige der üblichen Substanzen eine eingeschränkte Spezifität aufweisen und mehrere Zielstrukturen inhibieren [39]. So wurde berichtet, dass die MAPK-Inhibitoren SB203580 und PD98059 auch in den Arachidonsäure-Stoffwechsel eingreifen [23]. Für den PI3K-Inhibitor Ly294002 konnte gezeigt werden, dass dieser auch Casein-Kinase 2 mit vergleichbarer Potenz hemmt [39]. Auch R406 kann neben Syk mehrere Kinasen bei gleicher Konzentration inhibieren [56].

Um eine möglichst hohe Spezifität sicherzustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Verdünnungsreihen die optimale Konzentration jedes Inhibitors ermittelt. Als Orientierung dienten Konzentrationswerte aus der Literatur mit vergleichbaren Rahmenbedingungen. Des Weiteren wurden, um Fehlinterpretationen zu vermeiden, mehrere Inhibitoren pro Signalweg benutzt. Schließlich wurde mit Phosflow auch eine alternative Methode gewählt, um die Signaltransduktion von ITK-SYK zu untersuchen. Für zwei Inhibitoren stellte sich das Jurkat-System als ungeeignet heraus. Curcumin und Bortezomib werden in der Literatur verwendet, um in diesem Zellsystem Apoptose zu induzieren [52, 101, 132]. Aus diesem Grund konnte keine mit der Literatur vergleichbare Konzentration bei tolerablem Einfluss auf die Viabilität der Zellen erreicht

werden. Die entsprechend niedrig gewählte Konzentration in der vorliegenden Arbeit könnte die fehlende Suppression der IL-2-Produktion bedingen. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die mit Bortezomib und Curcumin untersuchten Signalwege nicht doch an der Signaltransduktion von ITK-SYK beteiligt sind. Für den Inhibitor BMS-345541 lag die verwendete Konzentration von 10 μ M deutlich über der in der Literatur verwendeten Konzentration von 1,0 μ M. Laut Herstellerangaben ist eine Spezifität des Inhibitors aber bis 100 μ M gewährleistet.

7.3.3 Die proximale Signaltransduktion von ITK-SYK in Jurkat-Zellen

Zu den proximalen Ereignissen der physiologischen TZR-Ligation gehört die Phosphorylierung von ITAMs der CD3 ζ -Kette [153]. Latour *et al.* konnten in COS-1-Zellen diese ITAMs auch als Substrat von SYK identifizieren [96]. Hierauf wurde diese Möglichkeit für ITK-SYK in Jurkat-Zellen untersucht (s. 6.3.1.1). An dieser Stelle wurde jedoch nur ein geringes phosphorylierungsspezifisches Signal detektiert. Da nur ein relativ geringes Signal für dieses Phosphotyrosin nach Stimulation mit Antikörpern zu objektivieren war (s. 6.3.1.2), könnten technische Gründe eine reduzierte Sensitivität für dieses Phosphotyrosin bewirken (s. 7.3.1).

Ein deutliches Signal zeigte sich hingegen nach Expression von ITK-SYK in Jurkat-Zellen für Lck sowie die Adapterproteine SLP-76, LAT und deren Bindungspartner PLC- γ 1. Diese Proteinphosphorylierungen sind ein typisches Ereignis der physiologischen TZR-Stimulation [153]. PLC- γ 1 führt zur Bildung von IP₃ und DAG [61]. Diese sind wichtige sekundäre Botenstoffe hin zu einer Aktivierung der T-Zelle [153]. Eine Phosphorylierung von SLP-76 durch ITK-SYK konnte auch von Hussain *et al.* in 293T-Zellen gezeigt werden [79]. Eine entsprechende Phosphorylierung von PLC- γ 1 konnte von Dierks *et al.* im selben Zellsystem bestätigt werden [46]. Es konnte zudem mit Westernblot gezeigt werden, dass das Muster der Tyrosinphosphorylierung von *lipid raft*-assoziierten Proteinen nach Expression von ITK-SYK in Jurkat-Zellen mit dem nach Antikörperstimulation (anti-CD3/anti-CD28) vergleichbar ist [123].

7.3.4 Die distale Signaltransduktion von ITK-SYK in Jurkat-Zellen

Die physiologische Stimulation des TZR führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF κ B und AP-1. In T-Zellen regulieren diese u.a. die Expression von IL-2 [112].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ITK-SYK ebenfalls die Signalwege hin zu diesen Transkriptionsfaktoren aktiviert und in Folge zur Produktion von IL-2 führt (s. 6.2.1.3). So ließ sich die Zytokinproduktion nach Transduktion von

ITK-SYK in Jurkat-Zellen durch Hemmung von NFAT via Calcineurin und NF κ B via IKK komplett unterdrücken (s. 6.3.2). Gleiches konnte auch für die Stress-induzierte MAP-Kinase p38 gezeigt werden, deren Phosphorylierung mit *Phosflow*TM detektierbar war (s. 6.3.1.1). Bei Verwendung von Substanzen zur Hemmung von JNK sowie Erk1/2 blieb die Sekretion von IL-2 auf geringem Niveau detektierbar (s. 6.3.2). Eine Phosphorylierung dieser Kinasen konnte mittels *Phosflow*TM dargestellt werden (s. 6.3.1.1). Hierzu ergänzend konnte der Nachweis einer Phosphorylierung von Erk1/2 Kinase von Rigby *et al.* nach Expression von ITK-SYK in 293T-Zellen erbracht werden [136].

Für eine effiziente Aktivierung von T-Lymphozyten bedarf es neben der Ligation des TZR auch kostimulatorischer Moleküle wie CD28 [2]. Dieser Rezeptor rekrutiert nach Ligation die PI3K, welche durch Generierung von PIP₃ eine Bindungsstelle für weitere Effektormoleküle schafft [2, 151]. Zu diesen gehört Proteinkinase B (Akt). Dieses Protein phosphoryliert multiple Zielstrukturen, was zu Zellüberleben, Proliferation und gesteigertem Zellmetabolismus führt [18]. Ein wichtiger Positivregulator der katalytischen Aktivität von Akt stellt hierbei die Serin/Threonin-Kinase mTORC2 dar, die Akt an Ser473 phosphoryliert und somit aktiviert [184]. mTORC1, welches wiederum durch Akt phosphoryliert wird, kann mittels Aktivierung von *eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1* (4E-BP1) und *protein S6 kinase 1* (S6K1) unmittelbar die Proteinsynthese stimulieren [184]. Insbesondere letztere Funktion wird durch Rapamycin inhibiert [184].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch pharmakologische Inhibition von mTORC1 sowie PI3K deren Beteiligung an den Signalwegen von ITK-SYK belegt werden (s. 6.3.2). Darüber hinaus wurde die aktivierende Phosphorylierung an Ser473 von Akt mittels *Phosflow*TM nachgewiesen (s. 6.3.1.1).

Neben den erwähnten Signalmolekülen konnten mit PKC (via AEB071), p65 (via Helenalin) und MALT1 (via z-VRPR-fmk) weitere potentiell therapeutische Zielstrukturen innerhalb der Signaltransduktion von ITK-SYK identifiziert werden. Eine vollständige Suppression der IL-2-Sekretion nach Expression des Fusionsproteins in Jurkat-Zellen gelang hier jedoch nur mit AEB071, dessen molekulares Ziel relativ proximal zu ITK-SYK liegt.

ITK-SYK vermag offensichtlich ligandenunabhängig die Signalwege des TZR und seines Korezeptors CD28 zu aktivieren. Dies zeigt auch der Vergleich des Phosphorylierungsmusters von Signalproteinen innerhalb der TZR-Signalkaskade zwischen ITK-SYK exprimierenden und antikörperstimulierten Jurkat-Zellen (s. 6.3.1). Zusätzlich wurde mit STAT5 auch ein zytokinspezifischer Transkriptionsfaktor

untersucht [17]. Es zeigte sich nach Expression von ITK-SYK in Jurkat-Zellen eine von IL-2 unabhängige Phosphorylierung von STAT5 (s. 6.3.1.1), was bei den mit Antikörpern stimulierten Zellen nicht zu objektivieren war (s. 6.3.1.2). Eine Phosphorylierung von STAT5 nach Expression von ITK-SYK konnte auch von Dierks *et al.* in 293T-Zellen nachgewiesen werden [46]. Offensichtlich kann ITK-SYK neben den Signalwegen distal des TZR und CD28-Korezeptors auch weitere Signalkaskaden aktivieren. Dieser Befund wird ausführlich unter 7.3.6 diskutiert.

Eine entsprechende Aussage über den proteasomalen Abbau intrazellulärer Proteine (inhibiert durch Bortezomib) konnte mithilfe des verwendeten Zellsystems leider nicht getroffen werden (vgl. 7.3.2).

7.3.5 Modell der Signaltransduktion von ITK-SYK im Rahmen der Lymphomentstehung

Turner *et al.* unterscheiden in der Transformation durch Fusionstيروسinkinase (FTKs) in hämatopoetischen Zellen zwei Phasen [165]: Nach Entstehung durch Translokation steuern FTKs zunächst mitogene Signalwege an, die u.a. zur Phosphorylierung von MAPK und STAT führen. Die gesteigerte Proliferationsrate erhöht die Wahrscheinlichkeit für weitere Mutationen, was die Autoren als „replikativen Stress“ bezeichnen. Parallel hierzu verhindern FTKs typischerweise den durch DNS-Schaden induzierten Zelltod [165]. Hierbei werden Signalwege aktiviert, die Proteine wie Akt und NFκB umfassen und zu Zellüberleben führen. Dies leistet weiterer genomischer Instabilität Vorschub. Die Akkumulation von Mutationen, die zu zusätzlichem Proliferations- und Überlebensvorteil führen, scheint eine wichtige Konsequenz der FTK-induzierten Mitogenese in der frühen Phase der Transformation zu sein.

Die späte Phase der Transformation gemäß Turner *et al.* beschreibt den Zustand der Aufrechterhaltung einer malignen Zellpopulation. Hierbei gibt es Hinweise, dass sich die dysfunktionellen Signalwege zu diesem Zeitpunkt vom präneoplastischen Stadium unterscheiden [165]. Ein Grund hierfür könnten die zusätzlichen Mutationen sein. Für die meisten FTKs (wie BCR-ABL oder NPM-ALK) scheinen die initial aktivierten Signalwege auch für die Aufrechterhaltung essenziell zu sein. In diesem Zusammenhang sprechen die Autoren von der „*oncogene addiction*“ (engl. „Abhängigkeit vom Onkogen“).

Turner *et al.* vermuten, dass alle FTKs dieselben zellulären Dysfunktionen hin zur Transformation induzieren (deregulierte Proliferation, genomische Instabilität, Akkumulation von weiteren Mutationen, Verhinderung des durch DNS-Schaden induzierten Zelltodes). Hierbei scheint ein gleiches Repertoire an Signalwegen

involviert zu sein [165]. Für einzelne FTKs konnte aber eine differenzielle Beteiligung distinkter Signalwege an der Transformation gezeigt werden [85, 103]. Zusätzlich scheinen klinische Unterschiede zwischen einzelnen FTKs durch Quantität und Zeitpunkt derer Expression in einer bestimmten Zelllinie zu entstehen [165].

Auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse über ITK-SYK zeigt Abb. 17 ein Modell der Signaltransduktion des Fusionsproteins im Rahmen der Lymphomentstehung.

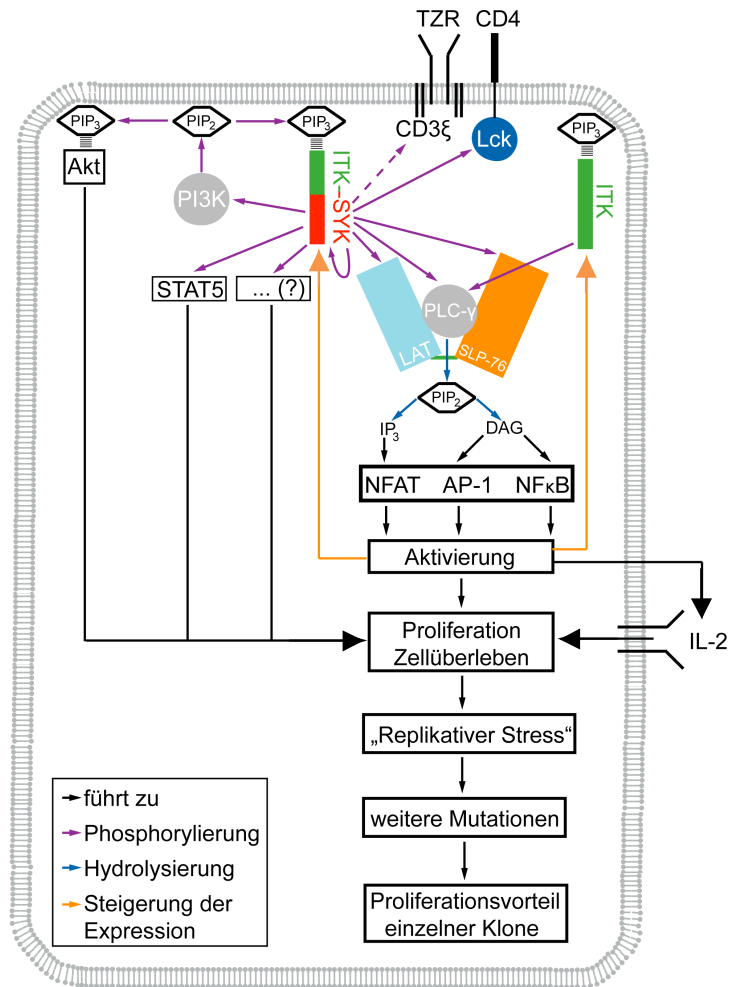


Abb. 17 Modell der Signaltransduktion von ITK-SYK im Rahmen der Lymphomentstehung

Für Einzelheiten siehe folgenden Text. Abbildung modifiziert nach [165]

7.3.5.1 Replikativer Stress durch ITK-SYK

Die Fusionstyrosinkinase ITK-SYK vermag konstitutiv die Signalwege der physiologischen TZR-Stimulation ligandenunabhängig anzuschalten (s. 7.3). Dies führt zur Aktivierung der T-Zelle mit gesteigerter Proliferation und verminderter Apoptoseeigung [46, 123]. Gemäß Turner *et al.* könnte dies die kritische Voraus-

setzung zur Transformation und Akkumulation weiterer Mutationen darstellen. Einen Anhalt hierfür bietet die Tatsache, dass sich in den Mausmodellen von Pechloff *et al.* eine klonale Erkrankung zeigt (s. 6.1). Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zusammen mit den Erkenntnissen aus den Mausmodellen weisen also darauf hin, dass ein konstitutives Signal des Antigenrezeptors im Prinzip als starker onkogener Promotor wirken kann [123].

Nicht auszuschließen ist jedoch, dass weitere durch ITK-SYK aktivierte Signalwege zum „replikativen Stress“ beitragen. Als einen ersten Hinweis hierauf kann die zytokinunabhängige Phosphorylierung von STAT5 gewertet werden. Ebenso könnte die autokrine Stimulation des sezernierten IL-2 einen wichtigen Beitrag leisten. Dies könnte für die Krankheitsentität „Adulte T-Zell Leukämie / Lymphom“ (ATLL) gezeigt werden [51, 173].

Weitere Untersuchungen sollten dementsprechend den Beitrag einzelner Signalwege für die Initiation des Lymphoms analysieren. Die Mausmodelle von Pechloff *et al.* mit Expansion maligner, ITK-SYK exprimierender T-Zellen [123] stellen hierfür ein wertvolles Werkzeug dar (s. 7.3.6).

7.3.5.2 Die Abhängigkeit des Lymphoms von ITK-SYK

Wie von Turner *et al.* beschrieben, könnten zusätzliche Mutationen zu einer Alteration der dysfunktionellen Signalwege im etablierten Lymphom führen [165]. Es stellt sich hierbei die Frage, ob die initial durch ITK-SYK aktivierten Signalwege auch für die Aufrechterhaltung der malignen Erkrankung im Sinne einer „Abhängigkeit vom Onkogen“ notwendig sind. Diese Fragestellung hat insbesondere für therapeutische Ansätze eine fundamentale Bedeutung [165]. Weitere Untersuchungen sollten entsprechend den Beitrag einzelner Signalwege für die Aufrechterhaltung des Lymphoms analysieren. Auch dazu sind die Mausmodelle von Pechloff *et al.* [123] wichtige Werkzeuge (s. 7.3.6).

Streubel *et al.* untersuchten Proben von uPTZL mit t(5;9)(q33;q22) auf Aktivierung der SYK-assoziierten Zielstrukturen p38, Erk1/2 sowie NFκB [157]. Der fehlende Nachweis einer Aktivierung dieser Strukturen könnte als erster Hinweis gedeutet werden, dass andere Signalwege im etablierten Lymphom eine Rolle spielen. Zwei weitere Untersuchungen könnten auf eine fehlende Abhängigkeit unselektierter uPTZL von NFκB deuten: Agostinelli *et al.* fanden eine globale Herunterregulation von NFκB-abhängiger Genen [5]. Martinez-Delgado *et al.* konnten zeigen, dass eine reduzierte Expression NFκB-abhängiger Gene sogar zu einer schlechteren Prognose führt [105].

7.3.5.3 Die Regulation der Expression von ITK-SYK

Im humanen Lymphom mit t(5;9)(q33;q22) wird die Expression von ITK-SYK durch den Promotor von ITK reguliert [157]. In ruhenden, humanen CD4-positiven T-Zellen ist die Expression von ITK sehr gering, was sich nach Aktivierung jedoch stark ändert [80]. Die durch ITK-SYK hervorgerufene Aktivierung der T-Zelle (s.o.) könnte entsprechend einen wichtigen Beitrag zu einer gesteigerten Expression des Fusionsproteins darstellen. Die Folge ist eine Überexpression von ITK-SYK mit seiner konstitutiv aktiven PTK-Domäne. Interessanterweise wurde konstitutiv aktives SYK ohne t(5;9)(q33;q22) in über 90% von PTZL gefunden [60]. So stellt sich die Frage, ob diese Translokation eventuell nur einen alternativen Mechanismus mit dem selben Ergebnis darstellt [111]. In diesem Falle könnten die Ergebnisse aus Studien mit ITK-SYK auch auf uPTZL mit Überexpression von SYK ohne t(5;9)(q33;q22) übertragen werden.

Bemerkenswert ist auch, dass die Überexpression von aktivem SYK mit einer Reihe weiterer Malignome assoziiert ist: Mantelzelllymphom [138], akute myeloische Leukämie [74] und chronisch lymphatische Leukämie [24]. Die Inhibition der Kinase stellt also nicht nur für PTZL einen interessanten Ansatz dar [178]. In einer ersten klinischen Studie konnte durch Einsatz eines oralen SYK-Inhibitors (Fostamatinib) ein verlängertes Überleben von Patienten mit verschiedenen Typen von B-NHL nachgewiesen werden [63].

7.3.5.4 Die Rolle des Antigenrezeptors in der Lymphomentstehung von uPTZL

Aberrante Aktivierung von Signalwegen des Antigenrezeptors (AgR) wurde für einige PTZL [83] sowie weitere Lymphomentitäten beschrieben [42, 93]. Ergänzend hierzu bietet die vorliegende Arbeit einen Hinweis, dass konstitutive Aktivierung von Signalwegen des AgR auch direkt die Lymphomentstehung induzieren kann [123]. Dies könnte aufgrund der Tatsache, dass uPTZL überwiegend aktivierten T-Zellen ähneln, ein gemeinsames Prinzip in der Pathogenese von uPTZL darstellen [123, 127].

7.3.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersucht die Signaltransduktion der Fusionstyrosinkinase ITK-SYK *in vitro*. Hierbei konnten mehrere potentielle Zielstrukturen für zielgerichtete Therapiestrategien identifiziert werden. In weiterführenden Studien sollten diese Erkenntnisse *in vivo* verifiziert werden. Die Mausmodelle von Pechloff *et al.* mit Expansion maligner, ITK-SYK exprimierender T-Zellen stellen hierbei ein wertvolles Instrument dar [123]. Mithilfe von Inhibitionsexperimenten könnte die entsprechende Fragestellung angegangen werden [36]. Das Fernziel der Untersuchungen wäre die

Identifikation mehrerer aussichtsreicher Inhibitoren für klinische Studien [182]. Diese könnten helfen, dringend benötigte Therapiestrategien für uPTZL zu entwickeln. Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Fusionstyrosinkinase ITK-SYK auch Signalwege zu aktivieren vermag, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. In der Literatur finden sich entsprechende Beispiele, deren Inhibition in den Mausmodellen von Pechloff *et al.* versucht werden sollten: Piccaluga *et al.* zeigen für uPTZL eine regelhafte Überexpression sowie Phosphorylierung von PDGFR α [127]. Die Tatsache, dass eine Inhibition dieser Kinase mit Imatinib zu Apoptose der uPTZL-Zellen führt, weist auf eine Abhängigkeit der untersuchten Lymphome von PDGFR α hin [127]. Entsprechend stellt dieses Enzym einen vielversprechenden Kandidaten zur Hemmung in den Mausmodellen von Pechloff *et al.* dar. Ebenso sollte die Inhibition des Transkriptionsfaktor c-myc versucht werden, dem Wossning *et al.* eine Schlüsselrolle bei der SYK-induzierten Transformation von B-Lymphozyten zusprechen [179].

8 Zusammenfassung

Das unspezifizierte periphere T-Zell-Lymphom (uPTZL) ist ein hoch aggressives Malignom, das mit derzeitigen Therapieschemata eine schlechte Prognose aufweist. Es fehlt an alternativen Therapiestrategien, was mit der kaum verstandenen molekularen Pathogenese zusammenhängt. Im Jahr 2006 wurde mit ITK-SYK in einer Subgruppe von uPTZL eine rekurrente Fusionstyrosinkinase identifiziert. Anhand dieser Mutation ergab sich die Möglichkeit, molekulare Zusammenhänge der Pathogenese zu beleuchten.

Zunächst galt es, in der vorliegenden Arbeit das transformierende Potential des Fusionsproteins in den Mausmodellen von Pechloff *et al.* zu untersuchen, in denen sich eine infiltrative Expansion von ITK-SYK exprimierenden T-Zellen zeigt. Hierzu wurde eine molekularbiologische Methode auf Grundlage der Polymerasekettenreaktion etabliert, die eine klonale T-Zell-Proliferation in der Maus zu detektieren vermag. Anschließend wurden die zellulären Folgen der ITK-SYK-Expression sowie die zugrunde liegende Signaltransduktion des Fusionsproteins analysiert. Dies geschah mithilfe von transgenen Jurkat-Zellen und peripheren murinen T-Zellen. Zum Einsatz kamen sich ergänzende Methoden wie die Analyse intrazellulärer Phosphorylierung von Signalmolekülen oder deren pharmakologische Inhibition.

Es konnte gezeigt werden, dass ITK-SYK in beiden Mausmodellen von Pechloff *et al.* zu einer klonalen lymphoproliferativen Erkrankung führt. In der Zusammenschau mit Klinik, Immunhistologie sowie Immunphänotypisierung konnte diese als peripheres T-Zell-Lymphom klassifiziert werden, welches der humanen Erkrankung ähnelt.

In den anschließenden Experimenten konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ITK-SYK mehrere Aspekte der physiologischen Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TZR) imitieren kann. Hierbei aktiviert das Fusionsprotein ligandenunabhängig die Signalwege des TZRs und seines Korezeptors CD28. Darüber hinaus ließ sich mit der Phosphorylierung von STAT5 der Hinweis auf Beteiligung eines zytokinspezifischen Signalweges objektivieren. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten so mehrere potentielle Strukturen für zielgerichtete Therapiestrategien in den Signalwegen von ITK-SYK identifiziert werden. Des Weiteren demonstriert die Arbeit zusammen mit den Erkenntnissen aus den Mausmodellen, dass ein konstitutives Signal des Antigenrezeptors im Prinzip als starker onkogener Promotor wirken kann.

In weiterführenden Studien sollen die potentiellen therapeutischen Zielstrukturen mithilfe der Mausmodelle von Pechloff *et al.* verifiziert werden. Das Fernziel der Untersuchungen wäre die Identifikation mehrerer aussichtsreicher Inhibitoren für klinische Studien. Diese könnten helfen, dringend benötigte Therapiestrategien für uPTZL zu entwickeln.

9 Literaturverzeichnis

1. Abraham R. T. and Weiss A. *Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm*. Nat Rev Immunol. 4 (2004): 301-308.
2. Acuto O. and Michel F. *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol. 3 (2003): 939-951.
3. Adachi K. and Davis M. M. *T-cell receptor ligation induces distinct signaling pathways in naive vs. antigen-experienced T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 108 (2011): 1549-1554.
4. Agbottah E., Yeh W. I., Berro R., Klase Z., Pedati C., Kehn-Hall K., Wu W., and Kashanchi F. *Two specific drugs, BMS-345541 and purvalanol A induce apoptosis of HTLV-1 infected cells through inhibition of the NF-kappaB and cell cycle pathways*. AIDS Res Ther. 5 (2008): 12.
5. Agostinelli C., Piccaluga P. P., Went P., Rossi M., Gazzola A., Righi S., Sista T., Campidelli C., Zinzani P. L., Falini B., and Pileri S. A. *Peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified: the stuff of genes, dreams and therapies*. J Clin Pathol. 61 (2008): 1160-1167. Epub 2008 Aug 1128.
6. Aifantis I., Buer J., von Boehmer H., and Azogui O. *Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus*. Immunity. 7 (1997): 601-607.
7. Aisenberg A. C., Wilkes B. M., and Jacobson J. O. *Different T-cell receptor gene configurations in T-cell neoplasms and acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Res. 51 (1991): 6103-6109.
8. Aivazian D. and Stern L. J. *Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition*. Nat Struct Biol. 7 (2000): 1023-1026.
9. Albritton L. M., Tseng L., Scadden D., and Cunningham J. M. *A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection*. Cell. 57 (1989): 659-666.
10. Arias-Palomo E., Recuero-Checa M. A., Bustelo X. R., and Llorca O. *3D structure of Syk kinase determined by single-particle electron microscopy*. Biochim Biophys Acta. 1774 (2007): 1493-1499.
11. Astoul E., Edmunds C., Cantrell D. A., and Ward S. G. *PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models*. Trends Immunol. 22 (2001): 490-496.
12. Au-Yeung B. B., Deindl S., Hsu L. Y., Palacios E. H., Levin S. E., Kuriyan J., and Weiss A. *The structure, regulation, and function of ZAP-70*. Immunol Rev. 228 (2009): 41-57.
13. Ballester B., Ramuz O., Gisselbrecht C., Doucet G., Loi L., Loriod B., Bertucci F., Bouabdallah R., Devilard E., Carbuccia N., Mozziconacci M. J., Birnbaum D., Brousset P., Berger F., Salles G., Briere J., Houlgatte R., Gaulard P., and Xerri L. *Gene expression profiling identifies molecular subgroups among nodal peripheral T-cell lymphomas*. Oncogene. 25 (2006): 1560-1570.
14. Barber E. K., Dasgupta J. D., Schlossman S. F., Trevillyan J. M., and Rudd C. E. *The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex*. Proc Natl Acad Sci U S A. 86 (1989): 3277-3281.
15. Barnden M. J., Allison J., Heath W. R., and Carbone F. R. *Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements*. Immunol Cell Biol. 76 (1998): 34-40.
16. Beitz L. O., Fruman D. A., Kurosaki T., Cantley L. C., and Scharenberg A. M. *SYK is upstream of phosphoinositide 3-kinase in B cell receptor signaling*. J Biol Chem. 274 (1999): 32662-32666.

17. Benczik M. and Gaffen S. L. *The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes*. Immunol Invest. 33 (2004): 109-142.
18. Benczik M. and Gaffen S. L. *The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes*. Immunol Invest. 33 (2004): 109-142.
19. Berg L. J., Finkelstein L. D., Lucas J. A., and Schwartzberg P. L. *Tec family kinases in T lymphocyte development and function*. Annu Rev Immunol. 23 (2005): 549-600.
20. Bierhuizen M. F., Westerman Y., Visser T. P., Wognum A. W., and Wagemaker G. *Green fluorescent protein variants as markers of retroviral-mediated gene transfer in primary hematopoietic cells and cell lines*. Biochem Biophys Res Commun. 234 (1997): 371-375.
21. Billadeau D. D. *T cell activation at the immunological synapse: vesicles emerge for LATer signaling*. Sci Signal. 3 (2010): pe16.
22. Blonska M. and Lin X. *CARMA1-mediated NF-kappaB and JNK activation in lymphocytes*. Immunol Rev. 228 (2009): 199-211.
23. Borsch-Haubold A. G., Pasquet S., and Watson S. P. *Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. SB 203580 also inhibits thromboxane synthase*. J Biol Chem. 273 (1998): 28766-28772.
24. Buchner M., Fuchs S., Prinz G., Pfeifer D., Bartholome K., Burger M., Chevalier N., Vallat L., Timmer J., Gribben J. G., Jumaa H., Veelken H., Dierks C., and Zirlik K. *Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Res. 69 (2009): 5424-5432.
25. Caravatta L., Sancilio S., di Giacomo V., Rana R., Cataldi A., and Di Pietro R. *PI3-K/Akt-dependent activation of cAMP-response element-binding (CREB) protein in Jurkat T leukemia cells treated with TRAIL*. J Cell Physiol. 214 (2008): 192-200.
26. Carsetti L., Laurenti L., Gobessi S., Longo P. G., Leone G., and Efremov D. G. *Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation*. Cell Signal. 21 (2009): 1187-1194.
27. Castellanos M. C., Munoz C., Montoya M. C., Lara-Pezzi E., Lopez-Cabrera M., and de Landazuri M. O. *Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1*. J Immunol. 159 (1997): 5463-5473.
28. Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Ranier J. E., Nguyen P. N., and Caskey C. T. *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Res. 16 (1988): 11141-11156.
29. Chan A. C., Iwashima M., Turck C. W., and Weiss A. *ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain*. Cell. 71 (1992): 649-662.
30. Chan A. C., van Oers N. S., Tran A., Turka L., Law C. L., Ryan J. C., Clark E. A., and Weiss A. *Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling*. J Immunol. 152 (1994): 4758-4766.
31. Chan J. K. and Kwong Y. L. *Common misdiagnoses in lymphomas and avoidance strategies*. Lancet Oncol. 11): 579-588.
32. Chaney W. G., Howard D. R., Pollard J. W., Sallustio S., and Stanley P. *DNA transfection of Mammalian cells using polybrene*. Methods Mol Biol. 4 (1988): 363-370.

33. Chatila T., Silverman L., Miller R., and Geha R. *Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin*. J Immunol. 143 (1989): 1283-1289.
34. Chevillard G., Paquet M., and Blank V. *Nfe2l3 (Nrf3) deficiency predisposes mice to T-cell lymphoblastic lymphoma*. Blood. 117 (2011): 2005-2008.
35. Chu D. H., Spits H., Peyron J. F., Rowley R. B., Bolen J. B., and Weiss A. *The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling*. EMBO J. 15 (1996): 6251-6261.
36. Cohen P. *The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors*. Curr Opin Chem Biol. 3 (1999): 459-465.
37. Coornaert B., Baens M., Heynink K., Bekaert T., Haegman M., Staal J., Sun L., Chen Z. J., Marynen P., and Beyaert R. *T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20*. Nat Immunol. 9 (2008): 263-271.
38. Damle N. K., Doyle L. V., Grosmaire L. S., and Ledbetter J. A. *Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes*. J Immunol. 140 (1988): 1753-1761.
39. Davies S. P., Reddy H., Caivano M., and Cohen P. *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J. 351 (2000): 95-105.
40. Davis H. E., Morgan J. R., and Yarmush M. L. *Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes*. Biophys Chem. 97 (2002): 159-172.
41. Davis M. M. and Bjorkman P. J. *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition*. Nature. 334 (1988): 395-402.
42. Davis R. E., Ngo V. N., Lenz G., Tolar P., Young R. M., Romesser P. B., Kohlhammer H., Lamy L., Zhao H., Yang Y., Xu W., Shaffer A. L., Wright G., Xiao W., Powell J., Jiang J. K., Thomas C. J., Rosenwald A., Ott G., Muller-Hermelink H. K., Gascoyne R. D., Connors J. M., Johnson N. A., Rimsza L. M., Campo E., Jaffe E. S., Wilson W. H., Delabie J., Smeland E. B., Fisher R. I., Braziel R. M., Tubbs R. R., Cook J. R., Weisenburger D. D., Chan W. C., Pierce S. K., and Staudt L. M. *Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma*. Nature. 463 (2010): 88-92.
43. de Leval L., Bisig B., Thielen C., Boniver J., and Gaulard P. *Molecular classification of T-cell lymphomas*. Crit Rev Oncol Hematol. 72 (2009): 125-143.
44. de Leval L., Savilo E., Longtine J., Ferry J. A., and Harris N. L. *Peripheral T-cell lymphoma with follicular involvement and a CD4+/bcl-6+ phenotype*. Am J Surg Pathol. 25 (2001): 395-400.
45. Dhein J., Walczak H., Baumler C., Debatin K. M., and Krammer P. H. *Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)*. Nature. 373 (1995): 438-441.
46. Dierks C., Adrian F., Fisch P., Ma H., Maurer H., Herchenbach D., Forster C. U., Sprissler C., Liu G., Rottmann S., Guo G. R., Katja Z., Veelken H., and Warmuth M. *The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease*. Cancer Res. 70 (2010): 6193-6204.
47. Dombroski D., Houghtling R. A., Labno C. M., Precht P., Takesono A., Caplen N. J., Billadeau D. D., Wange R. L., Burkhardt J. K., and Schwartzberg P. L. *Kinase-independent functions for Itk in TCR-induced regulation of Vav and the actin cytoskeleton*. J Immunol. 174 (2005): 1385-1392.
48. Don R. H., Cox P. T., Wainwright B. J., Baker K., and Mattick J. S. *'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification*. Nucleic Acids Res. 19 (1991): 4008.
49. Dorion S., Lambert H., and Landry J. *Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1*. J Biol Chem. 277 (2002): 30792-30797.

-
50. dos Santos N. R. and Ghysdael J. *A transgenic mouse model for TEL-JAK2-induced B-cell lymphoma/leukemia*. *Leukemia*. 20 (2006): 182-185.
 51. Dunleavy K., Piekarz R. L., Zain J., Janik J. E., Wilson W. H., O'Connor O. A., and Bates S. E. *New strategies in peripheral T-cell lymphoma: understanding tumor biology and developing novel therapies*. *Clin Cancer Res*. 16 (2010): 5608-5617.
 52. Duvoix A., Morceau F., Schnekenburger M., Delhalle S., Galteau M. M., Dicato M., and Diederich M. *Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat*. *Ann N Y Acad Sci*. 1010 (2003): 389-392.
 53. Dykstra M., Cherukuri A., Sohn H. W., Tzeng S. J., and Pierce S. K. *Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling*. *Annu Rev Immunol*. 21 (2003): 457-481.
 54. Ebinu J. O., Bottorff D. A., Chan E. Y., Stang S. L., Dunn R. J., and Stone J. C. *RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs*. *Science*. 280 (1998): 1082-1086.
 55. EMA *Pralatrexate for the treatment of cutaneous T-cell lymphom.* (2008) (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2009/10/WC500006111.pdf) Stand:25.09.2013
 56. EMA *Versagung der Genehmigung für das Inverkehrbringen von Folutyn (Pralatrexat)* (2012) (http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/002096/WC500125706.pdf) Stand:24.09.2013
 57. Engvall E. and Perlmann P. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*. 8 (1971): 871-874.
 58. Evenou J. P., Wagner J., Zenke G., Brinkmann V., Wagner K., Kovarik J., Welzenbach K. A., Weitz-Schmidt G., Guntermann C., Towbin H., Cottens S., Kaminski S., Letschka T., Lutz-Nicoladoni C., Gruber T., Hermann-Kleiter N., Thuille N., and Baier G. *The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation*. *J Pharmacol Exp Ther*. 330 (2009): 792-801.
 59. Fang Z., Xing F., Bronner C., Teng Z., and Guo Z. *ICBP90 mediates the ERK1/2 signaling to regulate the proliferation of Jurkat T cells*. *Cell Immunol*. 257 (2009): 80-87.
 60. Feldman A. L., Sun D. X., Law M. E., Novak A. J., Attygalle A. D., Thorland E. C., Fink S. R., Vrana J. A., Caron B. L., Morice W. G., Remstein E. D., Grogg K. L., Kurtin P. J., Macon W. R., and Dogan A. *Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas*. *Leukemia*. 22 (2008): 1139-1143. Epub 2008 Apr 1110.
 61. Finco T. S., Kadlecsek T., Zhang W., Samelson L. E., and Weiss A. *LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway*. *Immunity*. 9 (1998): 617-626.
 62. Freeley M., Park J., Yang K. J., Wange R. L., Volkov Y., Kelleher D., and Long A. *Loss of PTEN expression does not contribute to PDK-1 activity and PKC activation-loop phosphorylation in Jurkat leukaemic T cells*. *Cell Signal*. 19 (2007): 2444-2457.
 63. Friedberg J. W., Sharman J., Sweetenham J., Johnston P. B., Vose J. M., Lacasce A., Schaefer-Cuttillo J., De Vos S., Sinha R., Leonard J. P., Cripe L. D., Gregory S. A., Sterba M. P., Lowe A. M., Levy R., and Shipp M. A. *Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*. 115 (2010): 2578-2585.
 64. Fumarola C., La Monica S., Alfieri R. R., Borra E., and Guidotti G. G. *Cell size reduction induced by inhibition of the mTOR/S6K-signaling pathway protects Jurkat cells from apoptosis*. *Cell Death Differ*. 12 (2005): 1344-1357.

-
65. Gallamini A., Stelitano C., Calvi R., Bellei M., Mattei D., Vitolo U., Morabito F., Martelli M., Brusamolino E., Iannitto E., Zaja F., Cortelazzo S., Rigacci L., Devizzi L., Todeschini G., Santini G., Brugiattelli M., and Federico M. *Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study*. *Blood*. 103 (2004): 2474-2479.
 66. Gao N., Budhraja A., Cheng S., Yao H., Zhang Z., and Shi X. *Induction of apoptosis in human leukemia cells by grape seed extract occurs via activation of c-Jun NH2-terminal kinase*. *Clin Cancer Res*. 15 (2009): 140-149.
 67. Gartner F., Alt F. W., Monroe R., Chu M., Sleckman B. P., Davidson L., and Swat W. *Immature thymocytes employ distinct signaling pathways for allelic exclusion versus differentiation and expansion*. *Immunity*. 10 (1999): 537-546.
 68. Geissinger E., Odenwald T., Lee S. S., Bonzheim I., Roth S., Reimer P., Wilhelm M., Muller-Hermelink H. K., and Rudiger T. *Nodal peripheral T-cell lymphomas and, in particular, their lymphoepithelioid (Lennert's) variant are often derived from CD8(+) cytotoxic T-cells*. *Virchows Arch*. 445 (2004): 334-343.
 69. Gertsch J., Sticher O., Schmidt T., and Heilmann J. *Influence of helenanolide-type sesquiterpene lactones on gene transcription profiles in Jurkat T cells and human peripheral blood cells: anti-inflammatory and cytotoxic effects*. *Biochem Pharmacol*. 66 (2003): 2141-2153.
 70. Ghosh S., May M. J., and Kopp E. B. *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. *Annu Rev Immunol*. 16 (1998): 225-260.
 71. Gil D., Schamel W. W., Montoya M., Sanchez-Madrid F., and Alarcon B. *Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation*. *Cell*. 109 (2002): 901-912.
 72. Grundler R., Miething C., Thiede C., Peschel C., and Duyster J. *FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model*. *Blood*. 105 (2005): 4792-4799.
 73. Gupta S., Shimizu M., Ohira K., and Vayuvegula B. *T cell activation via the T cell receptor: a comparison between WT31 (defining alpha/beta TcR)-induced and anti-CD3-induced activation of human T lymphocytes*. *Cell Immunol*. 132 (1991): 26-44.
 74. Hahn C. K., Berchuck J. E., Ross K. N., Kakoza R. M., Clauser K., Schinzel A. C., Ross L., Galinsky I., Davis T. N., Silver S. J., Root D. E., Stone R. M., DeAngelo D. J., Carroll M., Hahn W. C., Carr S. A., Golub T. R., Kung A. L., and Stegmaier K. *Proteomic and genetic approaches identify Syk as an AML target*. *Cancer Cell*. 16 (2009): 281-294.
 75. Hanna Z., Priceputu E., Hu C., Vincent P., and Jolicoeur P. *HIV-1 Nef mutations abrogating downregulation of CD4 affect other Nef functions and show reduced pathogenicity in transgenic mice*. *Virology*. 346 (2006): 40-52.
 76. Hentrich M. Zewen S., Dreyling M., *T-Zell-Lymphome in "Manual Maligne Lymphome Tumorzentrum München"*, Dreyling, M. (Hrsg.), W.Zuckerschwerdt Verlag, München-Wien-New York, 2012, 9. Auflage
 77. Hitoshi Y., Lorens J., Kitada S. I., Fisher J., LaBarge M., Ring H. Z., Francke U., Reed J. C., Kinoshita S., and Nolan G. P. *Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells*. *Immunity*. 8 (1998): 461-471.
 78. Holmes K. L., Otten G., and Yokoyama W. M. *Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACS Calibur*. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 5 (2002): Unit 5 4.
 79. Hussain A., Faryal R., Nore B. F., Mohamed A. J., and Smith C. I. *Phosphatidylinositol-3-kinase-dependent phosphorylation of SLP-76 by the*

-
- lymphoma-associated ITK-SYK fusion-protein*. *Biochem Biophys Res Commun.* (2009).
80. Hussain A., Yu L., Faryal R., Mohammad D. K., Mohamed A. J., and Smith C. I. *TEC family kinases in health and disease - loss-of-function of BTK and ITK and the gain-of-function fusions ITK-SYK and BTK-SYK*. *FEBS J.* (2011).
 81. Innis M. A., Myambo K. B., Gelfand D. H., and Brow M. A. *DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (1988): 9436-9440.
 82. Jiang K., Zhong B., Ritchey C., Gilvary D. L., Hong-Geller E., Wei S., and Djeu J. Y. *Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac*. *Blood.* 101 (2003): 236-244.
 83. Jones D. *Functional classification of peripheral T-cell lymphomas as an approach to improve outcome prediction and therapy selection*. *Semin Hematol.* 47 Suppl 1 (2010): S1-4.
 84. Joseph R. E. and Andreotti A. H. *Conformational snapshots of Tec kinases during signaling*. *Immunol Rev.* 228 (2009): 74-92.
 85. Kanie T., Abe A., Matsuda T., Kuno Y., Towatari M., Yamamoto T., Saito H., Emi N., and Naoe T. *TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways*. *Leukemia.* 18 (2004): 548-555.
 86. Kawamoto H., Ikawa T., Ohmura K., Fujimoto S., and Katsura Y. *T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver*. *Immunity.* 12 (2000): 441-450.
 87. Kimpton C. P., Gill P., Walton A., Urquhart A., Millican E. S., and Adams M. *Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci*. *PCR Methods Appl.* 3 (1993): 13-22.
 88. Kneba M., Bolz I., Linke B., and Hiddemann W. *Analysis of rearranged T-cell receptor beta-chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR fragment analysis*. *Blood.* 86 (1995): 3930-3937.
 89. Kolanus W., Romeo C., and Seed B. *T cell activation by clustered tyrosine kinases*. *Cell.* 74 (1993): 171-183.
 90. Krishnan S., Farber D. L., and Tsokos G. C. *T cell rewiring in differentiation and disease*. *J Immunol.* 171 (2003): 3325-3331.
 91. Krogsgaard M., Li Q. J., Sumen C., Huppa J. B., Huse M., and Davis M. M. *Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity*. *Nature.* 434 (2005): 238-243.
 92. Krutzik P. O., Clutter M. R., and Nolan G. P. *Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry*. *J Immunol.* 175 (2005): 2357-2365.
 93. Kuppers R. *Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis*. *Nat Rev Cancer.* 5 (2005): 251-262.
 94. Langerak A. W., van Den Beemd R., Wolvers-Tettero I. L., Boor P. P., van Lochem E. G., Hooijkaas H., and van Dongen J. J. *Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha/beta T-cell proliferations*. *Blood.* 98 (2001): 165-173.
 95. Langerak A. W., Wolvers-Tettero I. L., and van Dongen J. J. *Detection of T cell receptor beta (TCRB) gene rearrangement patterns in T cell malignancies by Southern blot analysis*. *Leukemia.* 13 (1999): 965-974.
 96. Latour S., Fournel M., and Veillette A. *Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase*. *Mol Cell Biol.* 17 (1997): 4434-4441.
 97. Lee P. P., Fitzpatrick D. R., Beard C., Jessup H. K., Lehar S., Makar K. W., Perez-Melgosa M., Sweetser M. T., Schlissel M. S., Nguyen S., Cherry S. R., Tsai J. H., Tucker S. M., Weaver W. M., Kelso A., Jaenisch R., and Wilson C.

- B. *A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival.* Immunity. 15 (2001): 763-774.
98. Leever S. J. and Marshall C. J. *Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein.* EMBO J. 11 (1992): 569-574.
99. Loken M. R. and Herzenber L. A. *Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter.* Ann N Y Acad Sci. 254 (1975): 163-171.
100. Long M. and Adler A. J. *Cutting edge: Paracrine, but not autocrine, IL-2 signaling is sustained during early antiviral CD4 T cell response.* J Immunol. 177 (2006): 4257-4261.
101. Lu S., Yang J., Song X., Gong S., Zhou H., Guo L., Song N., Bao X., Chen P., and Wang J. *Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line.* J Pharmacol Exp Ther. 326 (2008): 423-431.
102. Macian F., Garcia-Cozar F., Im S. H., Horton H. F., Byrne M. C., and Rao A. *Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance.* Cell. 109 (2002): 719-731.
103. Maeda T., Yagasaki F., Ishikawa M., Takahashi N., and Bessho M. *Transforming property of TEL-FGFR3 mediated through PI3-K in a T-cell lymphoma that subsequently progressed to AML.* Blood. 105 (2005): 2115-2123.
104. Manger B., Hardy K. J., Weiss A., and Stobo J. D. *Differential effect of cyclosporin A on activation signaling in human T cell lines.* J Clin Invest. 77 (1986): 1501-1506.
105. Martinez-Delgado B., Cuadros M., Honrado E., Ruiz de la Parte A., Roncador G., Alves J., Castrillo J. M., Rivas C., and Benitez J. *Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas.* Leukemia. 19 (2005): 2254-2263.
106. Miller A. D., Miller D. G., Garcia J. V., and Lynch C. M. *Use of retroviral vectors for gene transfer and expression.* Methods Enzymol. 217 (1993): 581-599.
107. Minami Y. and Taniguchi T. *IL-2 signaling: recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the components of the IL-2 receptor.* Curr Opin Cell Biol. 7 (1995): 156-162.
108. Minguet S. and Schamel W. W. *A permissive geometry model for TCR-CD3 activation.* Trends Biochem Sci. 33 (2008): 51-57. Epub 2008 Jan 2016.
109. Morrison C., Smith G. C., Stingl L., Jackson S. P., Wagner E. F., and Wang Z. Q. *Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis.* Nat Genet. 17 (1997): 479-482.
110. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 1 (1986): 263-273.
111. Mulloy J. C. *Peripheral T cell lymphoma: new model + new insight.* J Exp Med. 207 (2010): 911-913.
112. Murphey K., Travers P., and Walport M. *Janeway's Immuno biology*, Lawrence, E. (Hrsg.), Garland Science, New York, 2008, 7. Auflage
113. Nerl C. Abedinpour F., Dreyling M., Zewen S., Hentrich M. *T-Zell-Lymphome in "Manual Maligne Lymphome Tumorzentrum München"*, Dreyling, M. (Hrsg.), W.Zuckerschwerdt Verlag, München-Wien-New York, 2008, 8. Auflage
114. Nolan G. P. *Phoenix helper-free retrovirus producer lines.* (2011) (http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html) Stand:18.03.2011
115. O'Leary H. and Savage K. J. *The spectrum of peripheral T-cell lymphomas.* Curr Opin Hematol. 16 (2009): 292-298.

116. Oh-hora M. *Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells*. Immunol Rev. 231 (2009): 210-224.
117. Olejniczak K. and Kasprzak A. *Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review*. Med Sci Monit. 14 (2008): RA179-189.
118. Padhan K. and Varma R. *Immunological synapse: a multi-protein signalling cellular apparatus for controlling gene expression*. Immunology. 129 (2010): 322-328.
119. Palacios E. H. and Weiss A. *Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development*. J Exp Med. 204 (2007): 1703-1715.
120. Paolino M. and Penninger J. M. *Cbl-b in T-cell activation*. Semin Immunopathol. 32 (2010): 137-148.
121. Pear W. S., Miller J. P., Xu L., Pui J. C., Soffer B., Quackenbush R. C., Pendergast A. M., Bronson R., Aster J. C., Scott M. L., and Baltimore D. *Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow*. Blood. 92 (1998): 3780-3792.
122. Pear W. S., Nolan G. P., Scott M. L., and Baltimore D. *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection*. Proc Natl Acad Sci U S A. 90 (1993): 8392-8396.
123. Pechloff K., Holch J., Ferch U., Schwenecker M., Brunner K., Kremer M., Sparwasser T., Quintanilla-Martinez L., Zimmer-Strobl U., Streubel B., Gewies A., Peschel C., and Ruland J. *The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma*. J Exp Med. 207 (2010): 1031-1044.
124. Pegg D. E. *Principles of cryopreservation*. Methods Mol Biol. 368 (2007): 39-57.
125. Peitz M., Pfannkuche K., Rajewsky K., and Edenhofer F. *Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 99 (2002): 4489-4494.
126. Perez O. D. and Nolan G. P. *Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry*. Nat Biotechnol. 20 (2002): 155-162.
127. Piccaluga P. P., Agostinelli C., Califano A., Rossi M., Basso K., Zupo S., Went P., Klein U., Zinzani P. L., Baccarani M., Dalla Favera R., and Pileri S. A. *Gene expression analysis of peripheral T cell lymphoma, unspecified, reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets*. J Clin Invest. 117 (2007): 823-834.
128. Pohl F. M., Jovin T. M., Baehr W., and Holbrook J. J. *Ethidium bromide as a cooperative effector of a DNA structure*. Proc Natl Acad Sci U S A. 69 (1972): 3805-3809.
129. Posnett D. N., Sinha R., Kabak S., and Russo C. *Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy"*. J Exp Med. 179 (1994): 609-618.
130. Pralle A., Keller P., Florin E. L., Simons K., and Horber J. K. *Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells*. J Cell Biol. 148 (2000): 997-1008.
131. Project Non-Hodgkin's Lymphoma Classification. *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma*. Blood. 89 (1997): 3909-3918.
132. Rajasingh J., Raikwar H. P., Muthian G., Johnson C., and Bright J. J. *Curcumin induces growth-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active JAK-STAT pathway in T cell leukemia*. Biochem Biophys Res Commun. 340 (2006): 359-368.

133. Rebeaud F., Hailfinger S., Posevitz-Fejfar A., Tapernoux M., Moser R., Rueda D., Gaide O., Guzzardi M., Iancu E. M., Rufer N., Fasel N., and Thome M. *The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation*. Nat Immunol. 9 (2008): 272-281.
134. Reynolds L. F., de Bettignies C., Norton T., Beeser A., Chernoff J., and Tybulewicz V. L. *Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1*. J Biol Chem. 279 (2004): 18239-18246.
135. Rickert R. C., Roes J., and Rajewsky K. *B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice*. Nucleic Acids Res. 25 (1997): 1317-1318.
136. Rigby S., Huang Y., Streubel B., Chott A., Du M. Q., Turner S. D., and Bacon C. M. *The lymphoma-associated fusion tyrosine kinase ITK-SYK requires pleckstrin homology domain-mediated membrane localization for activation and cellular transformation*. J Biol Chem. 284 (2009): 26871-26881.
137. Riha P. and Rudd C. E. *CD28 co-signaling in the adaptive immune response*. Self Nonself. 1 (2010): 231-240. Epub 2010 Jul 2012.
138. Rinaldi A., Kwee I., Taborelli M., Largo C., Uccella S., Martin V., Poretti G., Gaidano G., Calabrese G., Martinelli G., Baldini L., Pruneri G., Capella C., Zucca E., Cotter F. E., Cigudosa J. C., Catapano C. V., Tibiletti M. G., and 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): 303-316.
139. Rochman Y., Spolski R., and Leonard W. J. *New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines*. Nat Rev Immunol. 9 (2009): 480-490.
140. Roose J. P., Mollenauer M., Gupta V. A., Stone J., and Weiss A. *A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells*. Mol Cell Biol. 25 (2005): 4426-4441.
141. Roose J. P., Mollenauer M., Ho M., Kurosaki T., and Weiss A. *Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes*. Mol Cell Biol. 27 (2007): 2732-2745.
142. Roovers K. and Assoian R. K. *Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery*. Bioessays. 22 (2000): 818-826.
143. Rosette C. and Karin M. *Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors*. Science. 274 (1996): 1194-1197.
144. Rowen L., Koop B. F., and Hood L. *The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus*. Science. 272 (1996): 1755-1762.
145. Rudiger T., Ichinohasama R., Ott M. M., Muller-Deubert S., Miura I., Ott G., and Muller-Hermelink H. K. *Peripheral T-cell lymphoma with distinct perifollicular growth pattern: a distinct subtype of T-cell lymphoma?* Am J Surg Pathol. 24 (2000): 117-122.
146. Ruland J. and Mak T. W. *From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF-kappaB*. Semin Immunol. 15 (2003): 177-183.
147. Sada K., Takano T., Yanagi S., and Yamamura H. *Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase*. J Biochem. 130 (2001): 177-186.
148. Saito T. and Yokosuka T. *Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells*. Curr Opin Immunol. 18 (2006): 305-313. Epub 2006 Apr 2017.
149. Schmid I., Krall W. J., Uittenbogaart C. H., Braun J., and Giorgi J. V. *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. Cytometry. 13 (1992): 204-208.

-
150. Schneider U., Schwenk H. U., and Bornkamm G. *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.* *Int J Cancer.* 19 (1977): 621-626.
 151. Seminario M. C. and Wange R. L. *Signaling pathways of D3-phosphoinositide-binding kinases in T cells and their regulation by PTEN.* *Semin Immunol.* 14 (2002): 27-36.
 152. Shan X., Czar M. J., Bunnell S. C., Liu P., Liu Y., Schwartzberg P. L., and Wange R. L. *Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation.* *Mol Cell Biol.* 20 (2000): 6945-6957.
 153. Smith-Garvin J. E., Koretzky G. A., and Jordan M. S. *T cell activation.* *Annu Rev Immunol.* 27 (2009): 591-619.
 154. Sohn B. S., Park I., Kim E. K., Yoon D. H., Lee S. S., Kang B. W., Jang G., Choi Y. H., Kim C., Lee D. H., Kim S., Huh J., and Suh C. *Comparison of clinical outcome after autologous stem cell transplantation between patients with peripheral T-cell lymphomas and diffuse large B-cell lymphoma.* *Bone Marrow Transplant.* 44 (2009): 287-293.
 155. Southern E. M. *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* *J Mol Biol.* 98 (1975): 503-517.
 156. Stover E. H., Chen J., Folens C., Lee B. H., Mentens N., Marynen P., Williams I. R., Gilliland D. G., and Cools J. *Activation of FIP1L1-PDGFRalpha requires disruption of the juxtamembrane domain of PDGFRalpha and is FIP1L1-independent.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006): 8078-8083.
 157. Streubel B., Vinatzer U., Willheim M., Raderer M., and Chott A. *Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma.* *Leukemia.* 20 (2006): 313-318.
 158. Sun L., Deng L., Ea C. K., Xia Z. P., and Chen Z. J. *The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes.* *Mol Cell.* 14 (2004): 289-301.
 159. Sykulev Y. *T cell receptor signaling kinetics takes the stage.* *Sci Signal.* 3 (2010): pe50.
 160. Szczepanski T., Pongers-Willemse M. J., Langerak A. W., and van Dongen J. J. *Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias.* *Curr Top Microbiol Immunol.* 246 (1999): 205-213; discussion 214-205.
 161. Takada Y. and Aggarwal B. B. *TNF activates Syk protein tyrosine kinase leading to TNF-induced MAPK activation, NF-kappaB activation, and apoptosis.* *J Immunol.* 173 (2004): 1066-1077.
 162. Taniguchi T. and Minami Y. *The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview.* *Cell.* 73 (1993): 5-8.
 163. Tennant J. R. *EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY.* *Transplantation.* 2 (1964): 685-694.
 164. Todaro G. J. and Green H. *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines.* *J Cell Biol.* 17 (1963): 299-313.
 165. Turner S. D. and Alexander D. R. *Fusion tyrosine kinase mediated signalling pathways in the transformation of haematopoietic cells.* *Leukemia.* 20 (2006): 572-582.
 166. Valitutti S., Muller S., Cella M., Padovan E., and Lanzavecchia A. *Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes.* *Nature.* 375 (1995): 148-151.

-
167. Vallabhapurapu S. and Karin M. *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. *Annu Rev Immunol.* 27 (2009): 693-733.
 168. van Dongen J. J., Langerak A. W., Bruggemann M., Evans P. A., Hummel M., Lavender F. L., Delabesse E., Davi F., Schuurink E., Garcia-Sanz R., van Krieken J. H., Droese J., Gonzalez D., Bastard C., White H. E., Spaargaren M., Gonzalez M., Parreira A., Smith J. L., Morgan G. J., Kneba M., and Macintyre E. A. *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. *Leukemia.* 17 (2003): 2257-2317.
 169. van Dongen J. J. and Wolvers-Tettero I. L. *Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects*. *Clin Chim Acta.* 198 (1991): 1-91.
 170. van Dongen J. J. and Wolvers-Tettero I. L. *Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders*. *Clin Chim Acta.* 198 (1991): 93-174.
 171. Vernooij B. T., Lenstra J. A., Wang K., and Hood L. *Organization of the murine T-cell receptor gamma locus*. *Genomics.* 17 (1993): 566-574.
 172. von Essen M. R., Kongsbak M., Schjerling P., Olgaard K., Odum N., and Geisler C. *Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells*. *Nat Immunol.* 11 (2010): 344-349.
 173. Waldmann T. A. *Daclizumab (anti-Tac, Zenapax) in the treatment of leukemia/lymphoma*. *Oncogene.* 26 (2007): 3699-3703.
 174. Wang H., Kavanaugh M. P., North R. A., and Kabat D. *Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter*. *Nature.* 352 (1991): 729-731.
 175. Wang J., Liu Y., Li Z., Wang Z., Tan L. X., Ryu M. J., Meline B., Du J., Young K. H., Ranheim E., Chang Q., and Zhang J. *Endogenous oncogenic Nras mutation initiates hematopoietic malignancies in a dose- and cell type-dependent manner*. *Blood.* 118 (2011): 368-379.
 176. Went P., Agostinelli C., Gallamini A., Piccaluga P. P., Ascani S., Sabattini E., Bacci F., Falini B., Motta T., Paulli M., Artusi T., Piccioli M., Zinzani P. L., and Pileri S. A. *Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score*. *J Clin Oncol.* 24 (2006): 2472-2479. Epub 2006 Apr 2424.
 177. Wilcox R. A., Sun D. X., Novak A., Dogan A., Ansell S. M., and Feldman A. L. *Inhibition of Syk protein tyrosine kinase induces apoptosis and blocks proliferation in T-cell non-Hodgkin's lymphoma cell lines*. *Leukemia.* 24(2010): 229-232.
 178. Wilcox R. A., Sun D. X., Novak A., Dogan A., Ansell S. M., and Feldman A. L. *Inhibition of Syk protein tyrosine kinase induces apoptosis and blocks proliferation in T-cell non-Hodgkin's lymphoma cell lines*. *Leukemia.* 24 (2010): 229-232. Epub 2009 Sep 2024.
 179. Wossning T., Herzog S., Kohler F., Meixlsperger S., Kulathu Y., Mittler G., Abe A., Fuchs U., Borkhardt A., and Jumaa H. *Deregulated Syk inhibits differentiation and induces growth factor-independent proliferation of pre-B cells*. *J Exp Med.* 203 (2006): 2829-2840.
 180. Wu S., Jin L., Vence L., and Radvanyi L. G. *Development and application of 'phosphoflow' as a tool for immunomonitoring*. *Expert Rev Vaccines.* 9 (2010): 631-643.
 181. Zain J. M. and O'Connor O. *Targeted treatment and new agents in peripheral T-cell lymphoma*. *Int J Hematol.* 92 (2010): 33-44.

-
182. Zhao W. L. *Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways*. *Leukemia*. 24 (2010): 13-21.
 183. Zhou Y. J., Magnuson K. S., Cheng T. P., Gadina M., Frucht D. M., Galon J., Candotti F., Geahlen R. L., Changelian P. S., and O'Shea J. J. *Hierarchy of protein tyrosine kinases in interleukin-2 (IL-2) signaling: activation of syk depends on Jak3; however, neither Syk nor Lck is required for IL-2-mediated STAT activation*. *Mol Cell Biol*. 20 (2000): 4371-4380.
 184. Zoncu R., Efeyan A., and Sabatini D. M. *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12 (2011): 21-35. Epub 2010 Dec 2015.

10 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Schematische Darstellung von Genumlagerung und Expression der β -Kette des murinen T-Zell-Rezeptors.....	15
Abb. 2	Proximaler Signalkomplex des T-Zell-Rezeptors.....	19
Abb. 3	Zielstrukturen von Akt.....	22
Abb. 4	Aufbau der Fusionstyrosinkinase ITK-SYK.....	24
Abb. 5	Zielstrukturen der verwendeten Inhibitoren im Kontext aktivierender Signalwege der T-Zelle.....	42
Abb. 6	Längenverteilung einer Genumlagerung des T-Zell-Rezeptors im polyklonalen sowie klonalen Fall.....	52
Abb. 7	Verwendete Primer und PCR-Reaktionen zur Spekatypisierung muriner T-Zellen.....	54
Abb. 8	Elektropherogramm zur Spekatypisierung muriner T-Zellen einer Wildtyp- sowie einer OT-II-transgenen Maus.....	58
Abb. 9	TZR-Spekatypisierung mittels <i>GeneScan</i> TM von T-Zellen einer Wildtypmaus sowie sechs kranker Mäuse mit infiltrativer Expansion ITK-SYK exprimierender T-Zellen.....	59
Abb. 10	Einfluss von Stimulation sowie ITK-SYK-Expression auf Zellzahl und Viabilität von Jurkat-Zellen.....	61
Abb. 11	Einfluss von Stimulation sowie ITK-SYK-Expression auf die Präsentation von CD69 durch Jurkat-Zellen.....	62
Abb. 12	Einfluss von Stimulation sowie ITK-SYK-Expression auf Sekretion von IL-2 durch Jurkat-Zellen.....	63
Abb. 13	Aktivierung muriner CD4-positiver T-Zellen aus Rosa26 ^{cre} STOP ^{ITK-SYK} Mäusen nach Inkubation mit HTNC <i>in vitro</i>	64

Abb. 14	Phosphorylierung von intrazellulären Signalmolekülen nach Expression von ITK-SYK in Jurkat-Zellen.....	67
Abb. 15	Phosphorylierung von intrazellulären Signalmolekülen nach CD3/CD28-Stimulation von Jurkat-Zellen	69
Abb. 16	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die IL-2-Sekretion von ITK-SYK exprimierenden Jurkat-Zellen.....	71
Abb. 17	Modell der Signaltransduktion von ITK-SYK im Rahmen der Lymphomentstehung.....	86

11 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Übersicht der verwendeten Primer.....	29
Tabelle 2	Übersicht der verwendeten Antikörper.....	30
Tabelle 3	PCR-Zyklusprotokolle für die Genotypisierung der verwendeten Mäuse	36
Tabelle 4	Übersicht der verwendeten Inhibitoren	43
Tabelle 5	Übersicht der verwendeten Fluorochrome.....	50
Tabelle 6	PCR-Zyklusprotokolle für die Spekatypisierung muriner T-Zellen	55
Tabelle 7	Übersicht der zu erwartenden Produktgrößen der PCR-Reaktionen zur Spekatypisierung muriner T-Zellen	55
Tabelle 8	Übersicht der detektierten Phosphotyrosine von ITK-SYK in der Literatur.....	80

12 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Julian Walter Holch
Geburtsdatum	11. Februar 1985
Geburtsort	München
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet, ein Sohn

SCHULAUSSBILDUNG

1991 – 1995	Grundschule an der Schwindstraße in München
1995 – 2004	Gisela-Gymnasium in München Abschluss: Abitur

ZIVILDIENTST

2004 – 2005	Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Bayerischen Roten Kreuz (BRK)
2003 – 2009	Verpflichtung beim Bayerischen Roten Kreuz zum freiwilligen Dienst im Katastrophenschutz

HOCHSCHULAUSSBILDUNG

2005 – 2007	Studium der Humanmedizin (Vorklinischer Abschnitt) an der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Technischen Universität München Abschluss: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2007 – 2011	Studium der Humanmedizin (Klinischer Abschnitt) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2011 – 2012	Praktisches Jahr: <u>Tertial I: Palliativmedizin</u> Interdisziplinäres Zentrum für Palliativmedizin Klinikum der Universität München Campus Großhadern <u>Tertial II (1. Teil): Allgemein- und Abdominalchirurgie</u> John Goligher Department of Colorectal Surgery University Teaching Hospital Leeds General Infirmary Leeds, United Kingdom <u>Tertial II (2. Teil): Allgemein- und Unfallchirurgie</u> Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt Klinikum der Universität München Campus Innenstadt <u>Tertial III: Innere Medizin</u> Medizinische Klinik Klinikum der Universität München Campus Innenstadt

-
- 2012** 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Approbation als Arzt
- seit 08/2012** Assistenzarzt an der III. Medizinischen Klinik für
Hämatologie und internistische Onkologie
Klinikum der Universität München
Campus Großhadern

FÖRDERUNG

- 2006 – 2011** Bildungsfonds der CareerConcept AG

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

1. Pechloff K., Holch J., Ferch U., Schwenecker M., Brunner K., Kremer M., Sparwasser T., Quintanilla-Martinez L., Zimmer-Strobl U., Streubel B., Gewies A., Peschel C., and Ruland J. **The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma.** J Exp Med. 207 (2010): 1031-1044.
2. Bach M. P., Hug E., Werner M., Holch J., Sprissler C., Pechloff K., Zirlik K., Zeiser R., Dierks C., Ruland J., and Jumaa H. **Premature terminal differentiation protects from deregulated lymphocyte activation by ITK-Syk.** J Immunol. 192 (2014): 1024-1033.
3. von Einem J. C., Heinemann V., von Weikersthal L. F., Vehling-Kaiser U., Stauch M., Hass H. G., Decker T., Klein S., Held S., Jung A., Kirchner T., Haas M., Holch J., Michl M., Aubele P., Boeck S., Schulz C., Giessen C., Stintzing S., and Modest D. P. **Left-sided primary tumors are associated with favorable prognosis in patients with KRAS codon 12/13 wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus chemotherapy: an analysis of the AIO KRK-0104 trial.** J Cancer Res Clin Oncol. 140 (2014): 1607-1614.
4. Michl M., Holtzem B., Koch J., Moosmann N., Holch J., Hiddemann W., and Heinemann V. **[Metastatic colorectal cancer--analysis of treatment modalities and survival now and then].** Dtsch Med Wochenschr. 139 (2014): 2068-2072.

13 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. Jürgen Ruland möchte ich mich für die Überlassung dieses vielseitigen und interessanten Themas sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seinem Labor bedanken. Außerdem möchte ich ihm für die großartige persönliche Unterstützung während meines Studiums sowie bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Betreuerin und wissenschaftlichen Mentorin Konstanze Pechloff bedanken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert hat. Vielen Dank für die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und inspirierenden Gespräche!

Herzlichen Dank auch für jegliche wissenschaftliche sowie moralische Unterstützung und eine wunderbar freundschaftliche Atmosphäre im Labor an Kristina Brunner, Andreas Gewies, Stefan Wanninger, Nathalie Knies, Oliver Gorka, Verena Laux, Steffi Weiß, Katrin und Marc Schwenecker, Nicole Hanneschläger, Dominik Strasser, Ulrike Höckendorf, Susanne Roth, Uta Meyer zum Büschenfelde....

Rudi Baumann, Julian Hupf, Stefan Wanninger und Nathalie Knies danke ich sehr herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Frau Julia, meinem Sohn Vinzent sowie meiner ganzen Familie für ihr Verständnis und liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung bedanken.