

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
und
Lehrstuhl für Biochemie

Etablierung eines T-Zell spezifischen Maus Modells des großzellig-anaplastischen Lymphoms

Nicolas A. Schneider

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ulrich K. Heiz
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Michael Groll
2. Univ.-Prof. Dr. Justus G. Duyster

Die Dissertation wurde am 28.02.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 31.05.2011 angenommen.

Gewidmet, meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	13
2 Einleitung	15
2.1 Signaltransduktion	15
2.2 Proteinkinasen	16
2.3 Das großzellig anaplastische Lymphom (ALCL)	16
2.3.1 Der CD30-Rezeptor	17
2.3.2 NPM – Nucleophosmin	18
2.3.3 ALK – Anaplastische Lymphom Kinase	19
2.3.4 Das Fusionsprotein NPM-ALK	19
2.3.5 NPM-ALK aktivierte Signalkaskaden	21
2.3.6 ALK Fusionspartner	22
2.3.7 NPM-ALK im Tiermodell	24
2.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen	27
3.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur	28
3.1.3 Enzyme	29
3.1.4 Antikörper	30
3.1.5 Zelllinien	30
3.1.6 Vektoren und DNA-Konstrukte	31
3.1.7 Bakterienstämme	32
3.1.8 Tyrosinkinaseinhibitoren	32
3.1.9 Oligonukleotide für die RT-PCR	32
3.1.10 Primer für die Genotypisierung	32
3.1.11 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	32
3.1.12 Mäuse und tierexperimentelle Materialien	33
3.1.13 Molekularbiologische Kitsysteme	33
3.1.14 Standard Geräte	34
3.1.15 Standard Lösungen und Puffer	35
3.2 Methoden	38
3.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken	38
3.2.1.1 Restriktionsverdau	38
3.2.1.2 5'-Dephosphorylierung von DNA	38
3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese	39
3.2.1.4 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen	39
3.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
3.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.2.1.7 Isolierung genomischer DNA aus murinen Zellen	41
3.2.1.8 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	41
3.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion	42
3.2.1.10 PCR-Mutagenese	42
3.2.1.11 Reverse-Transkriptase PCR	43
3.2.1.12 Quantitative Real time PCR (RTQ-PCR)	44
3.2.2 Arbeiten mit Bakterien	45
3.2.2.1 Kulturbedingungen	45
3.2.2.2 Kompetente Bakterien	45
3.2.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	45
3.2.2.4 Kultivierung der transformierten Bakterien	46
3.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi Präparation)	46
3.2.2.6 Induktion und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine	47

3.2.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien.....	48
3.2.3.1	Kultivierung von Zelllinien.....	48
3.2.3.2	Kryokonservierung von Zellen.....	49
3.2.3.3	Auftauen von Zellen.....	49
3.2.3.4	Bestimmung der Zellzahl.....	49
3.2.3.5	Methoden zur Einbringung von Fremd-DNA in Zellen.....	49
3.2.3.5.1	Lipofektion adhärenter Zellen.....	50
3.2.3.5.2	Elektroporation.....	50
3.2.3.5.3	Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion.....	51
3.2.3.6	Selektion der Virusverpackungszelllinie.....	52
3.2.3.7	Durchflusszytometrische Messung der EGFP-Expression (FACS-Analyse).....	52
3.2.3.8	Titerbestimmung.....	53
3.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	54
3.2.4.1	Herstellung von Zelllysaten.....	54
3.2.4.2	Immunpräzipitation.....	54
3.2.4.3	SDS-Gelelektrophorese.....	55
3.2.4.4	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen.....	56
3.2.4.5	Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot).....	56
3.2.4.6	Immunchemischer Nachweis von transferierten Proteinen.....	57
3.2.4.7	Entfernen gebundener Antikörper von der Membran.....	57
3.2.5	Biologische Untersuchungen.....	58
3.2.5.1	Messung der proliferativen Aktivität.....	58
3.2.6	Tiermodell.....	58
3.2.6.1	Präparation von Knochenmarkzellen aus Spendermäusen.....	58
3.2.6.2	Prästimulation von murinen Knochenmarkzellen.....	59
3.2.6.3	Retrovirale Transduktion der Knochenmarkzellen.....	59
3.2.6.4	Knochenmarktransplantation.....	59
3.2.6.5	Überwachung der transplantierten Mäuse.....	60
3.2.6.6	Hypotone Lyse von Erythrozyten.....	60
3.2.6.7	Aufbereitung von Organen transplantierte Mäuse.....	60
3.2.6.8	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen.....	61
3.2.6.9	Xenograft-Modell.....	63
3.2.6.10	Syngene / Serielle Transplantation.....	63
3.2.7	Statistische Auswertung.....	63
4	Ergebnisse.....	65
4.1	<i>Bisherige Alk-positive Mausmodelle.....</i>	<i>65</i>
4.2	<i>Das translationale Stopkonstrukt MSCV-Stop-EGFP (MSE).....</i>	<i>66</i>
4.3	<i>Der Stopvektor zur zellspezifischen Expression eines Onkogens – MSNAIE.....</i>	<i>69</i>
4.4	<i>Das retrovirale Infektions- / Transplantationsmodell.....</i>	<i>71</i>
4.5	<i>Retroviraler Gentransfer.....</i>	<i>73</i>
4.6	<i>Übersicht der NPM-ALK Transplantationsexperimente.....</i>	<i>75</i>
4.6.1	<i>Promotoranalysen der verwendeten Cre-Mäuse.....</i>	<i>76</i>
4.6.2	<i>LysM-Cre transgene Knochenmarks-Spendermäuse.....</i>	<i>78</i>
4.6.3	<i>GrzmB-Cre transgene Knochenmarks-Spendermäuse.....</i>	<i>79</i>
4.6.4	<i>CD4-Cre transgene Knochenmarks-Spendermäuse.....</i>	<i>81</i>
4.6.5	<i>Lck-Cre transgene Knochenmarks-Spendermäuse.....</i>	<i>83</i>
4.7	<i>Exkurs: Generierung eines murinen, polyklonalen CD30-Antikörpers.....</i>	<i>90</i>
4.8	<i>SC71710 - ein neuer, spezifischer ALK-Inhibitor.....</i>	<i>93</i>
4.8.1	<i>SC71710 inhibiert die Kinaseaktivität und Proliferation ALK-positiver Zellen.....</i>	<i>94</i>
4.8.2	<i>SC71710 zur Behandlung muriner ALK-positiver Mausmodelle.....</i>	<i>97</i>
5	Diskussion.....	103
5.1	<i>Das großzellig anaplastischen Lymphom (ALCL) im Mausmodell.....</i>	<i>103</i>
5.2	<i>NPM-ALK führt nicht zur Transdifferenzierung.....</i>	<i>106</i>
5.3	<i>Die Ursprungszelle der Translokation t(2;5) ist eine frühe T-Zelle.....</i>	<i>108</i>
5.4	<i>Der spezifische Alk-Inhibitor 4SC-71710.....</i>	<i>111</i>
6	Referenzen.....	115

7	Abbildungsverzeichnis	127
8	Danksagung	129
9	Publikationen	131

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
λ	Wellenlänge
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μmol	10^{-6} Mol
μM ($\mu\text{mol/l}$)	10^{-6} Mol/Liter
Abb.	Abbildung
A.d.	Aqua destillata
ALCL	großzellig-anaplastische Lymphom
ALK	anaplastische Lymphoma-Kinase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Base
BBMM	<i>Basal Bone Marrow Medium</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CIAP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
DISK-PAGE	diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion

ECD	extrazelluläre Domäne
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i>
F	Farad
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
5-FU	5-Fluoruracil
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
Gy	Gray (1 Gy=1 J/kg)
h	human / Stunde
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
ITD	interne Tandemduplikation (<i>internal tandem duplication</i>)
JMD	juxtamembranäre Domäne
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
KN	Kinase-neagative / Kinase dead
LB	Luria-Bertani
lin	linear
log	logarithmisch
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	murin

M	Marker
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
mM	(mmol/l) 10^{-3} Mol/Liter
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
ng	10^{-9} Gramm, Nanogramm
nm	10^{-9} Meter, Nanometer
nM	(nmol/l) 10^{-9} Mol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	pondus Hydrogenii (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PTB	Phosphotyrosin-bindend (<i>phosphotyrosine binding</i>)
pY	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
s.c.	subcutaneus
SH	<i>Src-homology</i>
SS	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TKD	Tyrosinkinasedomäne

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

1 Zusammenfassung

Das großzellig anaplastische Lymphom ALCL gehört zur Untergruppe der sogenannten Non-Hodgkin Lymphome und zeichnet sich durch CD30-positive Lymphomzellen aus, die einen T-Zell oder Null-Zell-Phänotyp mit rearrangierten T-Zellrezeptoren aufweisen. In über 50% der ALCL-Fälle findet sich eine t(2;5) Translokation die zum Fusionsgen NPM/ALK einer onkogenen Tyrosinkinase führt. Das entstehende Fusionsprotein oligomerisiert und wird durch gegenseitige Autophosphorylierung zu einer konstitutiv aktiven Kinase, die mehrere proliferative Signalwege aktiviert und somit zur Transformation der Zelle führt. Dabei scheint die spatio-temporale Expression NPM/ALKs von besonderer Bedeutung für den Phänotyp zu sein, weshalb in der vorliegenden Arbeit die linien- und differenzierungsspezifische Expression des Onkogens genauer untersucht wurde. Ziel der Arbeit war es daher, ein Mausmodell zu etablieren, dass der humanen Entität des großzellig-anaplastischen Lymphoms ähnelt und somit zur näheren Charakterisierung, als auch zur Behandlung mit verschiedenen, neuen Medikamenten verwendet werden kann.

Wie bereits in Vorarbeiten gezeigt wurde, führten Knochenmarks- / Transplantationsmodelle bei denen das Knochenmark retroviral mit NPM/ALK transduziert wurde zu einem histiozytären bzw. plasmazytoiden Phänotyp in Abhängigkeit des verwendeten Virustiters. Aber bislang gibt es kein Mausmodell, welches die humane ALCL widerspiegelt und einen T-Zell Ursprung aufweist. Um eine T-lymphoide Erkrankung in Mäusen zu induzieren wurde daher in dieser Arbeit NPM/ALK linienspezifisch exprimiert. Dazu wurde eine gefloخته Stopkassette zwischen dem retroviralen Promotor und NPM/ALK inseriert. Dieses Konstrukt wurde verwendet, um damit Knochenmark zu infizieren, in welchem Cre zellspezifisch exprimiert wird und es so zu einer gerichteten Expression von NPM/ALK kommen kann. Dabei konnten folgende Erkenntnisse gemacht werden: 1.) Alle transplantierten Mäuse entwickelten eine Erkrankung innerhalb weniger Monate 2.) NPM/ALK führt nicht zu einer Transdifferenzierung, da der Phänotyp der Mäuse der Ursprungszelle entspricht, in welcher die Expression von NPM/ALK stattfindet 3.) Die Ursprungszelle in der die Translokation auftritt, muss eine frühe T-Zelle sein

Es ist gelungen, mit der oben aufgeführten Methode ein Mausmodell zu etablieren, welches einen CD30-positiven, T-lymphoiden Phänotyp mit vergrößerten Lymphknoten und Thymi

aufweist und somit die humane Erkrankung in vielen Punkten widerspiegelt. Dieses Modell kann nun verwendet werden, um das Onkogen NPM/ALK im Hinblick auf dessen transformierende Eigenschaft und Auswirkung näher zu untersuchen und damit selektive Inhibitoren gegen das deregulierte Proteine zu entwickeln und zu erproben. Ein Ziel, welches mit dem Tyrosinkinaseinhibitor SC71710 weiter verfolgt wurde. Dieser zeigte eine hohe Spezifität für ALK-positive Zellen und konnte deren Proliferation und die Kinaseaktivität des Onkogens effektiv reduzieren. In einem ALCL-imitierenden Mausmodell zeigte der Inhibitor die Fähigkeit das Tumorwachstum zu verlangsamen und selektiv die ALK-positiven Zellen zu verringern. Es wäre daher denkbar, diesen spezifischen Inhibitor in klinischen Studien weiter an ALCL-erkrankten Patienten zu testen. Auf lange Sicht könnte somit die intensive und mit vielen Nebenwirkungen behaftete Behandlung einer Chemotherapie am Patienten reduziert oder sogar ersetzt werden.

2 Einleitung

2.1 Signaltransduktion

Die Fähigkeit auf exogene und endogene Reize zu reagieren, ist eine grundlegende Eigenschaft jeder lebender Zelle. Signaltransduktionskaskaden verknüpfen sich zu Netzwerken, um eine Anpassung an Umgebungseinflüsse und den Entwicklungsstand der Zelle zu gewährleisten. Die Signale werden über die Membran hinweg in den Zellkern transportiert, um dort die Genexpression zu regulieren, wodurch u.a. Differenzierung, Proliferation oder Apoptose der Zelle gesteuert wird. Desweiteren können Signalübertragungswege die Zellteilungsaktivität oder posttranskriptionelle Modifikationen beeinflussen ¹. Das korrekte ineinandergreifen dieses Prozesses ist von entscheidender Bedeutung, da bereits geringste Abweichungen, wie z.B. eine Erhöhung der Proliferation oder eine Unterbrechung der Differenzierung der Zelle, zu einer Transformation dieser und somit zu einer malignen Erkrankung beitragen kann ².

Bedeutend für diese Entwicklung sind meist Protoonkogene und Tumorsuppressorgene, welche für Proteine kodieren, die für den promotogenen Status einer Zelle mitverantwortlich sind. Aus besagten Protoonkogenen können durch Mutation, Deletion oder Translokation Onkogene entstehen, deren Proteine dann u.a. konstitutiv promotogene und / oder antiapoptische Signalkaskaden in der Zelle aktivieren können ³.

Die Weiterleitung der extrazellulären Signale über die Membran hinweg ins Innere der Zelle erfolgt über membrangebundene Rezeptoren oder membrangängige Signalmoleküle, wie z.B. Steroidhormone. Man unterscheidet vier Familien der Rezeptoren: a.) Rezeptor-Tyrosinkinasen, b.) Tyrosinkinase-assoziierte Rezeptoren, c.) G-Protein gekoppelte Rezeptoren und schließlich d.) Liganden-gesteuerte Ionenkanäle.

Wird der Rezeptor über einen spezifischen Liganden stimuliert, erfolgt die Einleitung einer Signalkaskade und die Weiterleitung an zellinnere Signalmoleküle, wodurch Rezeptor- und Zelltyp-spezifische Signalwege aktiviert werden ⁴.

Aus der Tatsache, dass Signalelemente verschiedenste Proteine binden können, resultiert einerseits die Möglichkeit eine Vielzahl von nachgeschalteten Kaskaden zu aktivieren, zum anderen können aber auch mehrere Signalwege miteinander verknüpft werden ⁵.

Zusammengefasst sind die Signalproteine dafür verantwortlich eine zellspezifische Antwort auf einen Stimulus / Reiz auszulösen⁶.

2.2 Proteinkinasen

Die Weiterleitung bzw. Erzeugung eines Signals innerhalb einer Zelle erfolgt meist durch die Phosphorylierung von Proteinen. Verantwortlich hierfür sind Proteinkinasen, welche den γ -Phosphatrest von Adenosintriphosphat (ATP) meist auf eine Hydroxylgruppe der Aminosäureseitenketten von Serin, Threonin oder Tyrosin überträgt. Proteinkinasen werden in drei Gruppen, abhängig von ihrer Substratspezifität, eingeteilt: a.) Serin / Threoninkinasen übertragen den Phosphatrest auf die Hydroxylgruppe von Serin bzw. Threonin, b.) Tyrosinkinasen phosphorylieren die Hydroxylgruppe des Phenolring von Tyrosin und c.) Proteinkinasen, die beide Reaktionen durchführen können⁷.

Untersuchungen zeigen, dass 518 humane Gene für Proteinkinasen kodieren⁸. Etwa 20 Prozent kodieren für Tyrosinkinasen, welche wiederum in Rezeptor- und zytoplasmatische Tyrosinkinasen eingeteilt werden⁹. Aktivierte Tyrosinkinasen sind grundlegende Mechanismen promotogener Signalkaskaden. Daher können Mutationen, Deletionen bzw. Translokationen zu konstitutiv aktivierten Tyrosinkinasen führen, welche ihrerseits Ausgangspunkt zellulärer Transformation sein können und dadurch die Entwicklung von Neoplasien begünstigen¹⁰.

2.3 Das großzellig anaplastische Lymphom (ALCL)

Lymphome sind lymphozytäre Neoplasien und treten sowohl innerhalb, als auch außerhalb des lymphatischen Gewebes auf¹¹. Prinzipiell teilt man sie in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) ein. Letztere leiten sich von unterschiedlich stark differenzierten Lymphozyten der B- und T-Zelllinie ab. Diese maligne Neoplasie kommt als nodales und extranodales Lymphom oder Leukämie vor. Grundsätzlich wird die Erkrankung nach dem vorherrschenden Zelltyp benannt. Abgesehen vom zellulären Ursprung und zytologischen Kriterien ist die Aggressivität der NHL (hoch- bzw. niedrigmalign) bei der sog. Kiel-Klassifikation von Relevanz. Es wird davon ausgegangen, dass die Zielzelle dieser Neoplasien aus lymphozytären Entwicklungsstufen der normalen Hämatopoese entsteht.

Das großzellig anaplastische Lymphom (ALCL) ist eine aggressive Untergruppe der NHL¹²⁻¹⁴. Diese Entität zeichnet sich durch seine anaplastische Morphologie, die Infiltration des Lymphknotensinus¹³, das kohäsive Wachstumsmuster der Blasten, die Expression des CD30-Rezeptors (Ki-1) und seines typischen T- bzw. Null-Zell Phänotyp aus¹⁵. Wobei bei letzteren gemeint ist, dass die Zellen zwar keinen typischen Oberflächen T-Zell-Marker exprimieren, jedoch auf genetischer Ebene bereits T-Zell-Rezeptor Rearrangements aufweisen. Da die Zellen neben dieser Tatsache auch zytotoxische Moleküle wie Perforin und Granzyme B exprimieren, wird davon ausgegangen, dass das ALCL sich aus T-Zellen entwickelt^{16,17}.

Dennoch ist das ALCL eine heterogene Gruppe hinsichtlich des klinischen Erscheinungsbildes, Zytologie und Antigenprofil, weswegen man das ALCL in klinische Unterformen einteilt. So unterscheidet man das primär systemische, das primär kutane und das sekundäre ALCL. Desweiteren kommt es aber auch zu immunphänotypischen und morphologischen Überlappungen mit dem klassischen Hodgkin-Lymphom.

Klinisch zeichnet sich die systemische ALCLs als aggressive Lymphome aus, die besonders häufig zu Befall von extralymphatischen Geweben wie Haut, Knochenmark, Gastrointestinaltrakt und Lunge neigen. Insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen sprechen diese Lymphome auf eine aggressive Chemotherapie relativ gut an. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Prognose Alk-positiver ALCL im Vergleich zu Alk-negativen großzellig anaplastischen Lymphomen eher günstig ist¹⁸⁻²¹. Trotzdem spricht ein signifikanter Anteil von Patienten nicht ausreichend auf eine Chemotherapie an, so dass etwa 20-30 % der Patienten an Ihrer Erkrankung versterben²². Lymphome der primär kutanen ALCL haben eine sehr gute Prognose, da sie nur lokal auftreten, häufig spontan zurückgehen und CD30-negativ sind.

2.3.1 Der CD30-Rezeptor

Der Oberflächenrezeptor CD30 gehört zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptoren), einer Gruppe von mehr als zehn unterschiedlichen Rezeptoren^{23,24}. Einige TNF-Rezeptoren, wie Fas, CD30, TNFR1 oder TNFR2 kommen bivalente Rollen der Signalübertragung zu. Einerseits kann durch die Aktivierung dieser Rezeptoren die Proliferation der Zelle eingeleitet werden, andererseits kann es aber auch zur Einleitung der Apoptose führen. Dies geschieht in Abhängigkeit des Zellkontexts, des Differenzierungsstadiums, Transformationszustandes oder Typs der Zelle.

TNF-Rezeptoren sind Typ-I-Transmembranproteine, die in der extrazellulären Domäne drei bis vier cysteinreiche Regionen aufweisen²⁵, die an der Bindung von Liganden beteiligt sind²⁶⁻²⁸. Infolge der Ligandenbindung, kommt es zur Oligomerisierung der Rezeptorproteine²⁹. Neben membrangebundenen Rezeptorkomplexen gibt es auch lösliche Formen³⁰. Der CD30-Rezeptor ist ein 120 kD großes phosphoryliertes Transmembran-Glykoprotein^{31,32}, welches auf Chromosom 1 lokalisiert ist³³. Nach der Bindung eines Liganden bildet CD30 einen trimeren Komplex³⁴.

Die extrazelluläre Domäne von CD30 weist wie die meisten TNF-Rezeptoren sechs cysteinreiche Regionen auf²³. Bezüglich der intrazellulären Domäne gibt es aber Unterschiede zwischen CD30 und weiteren Mitgliedern seiner Familie³⁵. So fehlt dem CD30-Rezeptor die sogenannte Todesdomäne, welche über die Aktivierung der Caspasen die Apoptose der Zelle einleitet^{36,37}. Dies geschieht über das TRADD (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Typ1 assoziierte Todesdomäne) Protein, welches mit der Todesdomäne interagiert, den programmierten Zelltod einleitet und die NfκB-Komplexe aktiviert³⁸. TRADD bindet desweiteren das Protein FADD (Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne) und ist in den Fas-induzierten Zelltodsignalweg involviert, der über Procaspase 8-Aktivierung abläuft^{39,40}. In etwa 50% der ALCL-Fälle findet sich eine NPM-ALK Translokation t(2;5), wobei das Protein Nucleophosmin (NPM) an die anaplastische Lymphomkinase ALK fusioniert ist.

2.3.2 NPM – Nucleophosmin

NPM ist ein 32 kD großes Phosphoprotein, welches auf Chromosom 5 lokalisiert ist. Es enthält mehrere funktionelle Domänen: a.) ein nukleäres Translokationssignal (NLS), b.) eine Bindungsstelle für Metallionen und Aminosäurecluster (MB/AC) und c.) Oligomerisierungsdomänen am C- und N-terminalen Ende⁴¹. Aufgrund des nukleären Translokationssignals findet sich NPM hauptsächlich im Zellkern und ist an der Zusammensetzung und Regulation der Ribosomen beteiligt^{42,43}. Da NPM nicht ausschließlich im Zellkern, sondern auch zytoplasmatisch vorkommt, wird davon ausgegangen, dass NPM auch an Transportvorgängen zwischen Zellkern und Zytoplasma beteiligt ist⁴⁴. NPM oligomerisiert mit sich selbst⁴⁵ und mit dem Fusionsprotein NPM-ALK (siehe 2.3.4), was zur nukleären Lokalisation des NPM-ALK Proteins führt^{43,46}. Der starke, ubiquitäre NPM Promotor führt zu einer erhöhten NPM-ALK Expression in Lymphomzellen und die Oligomerisierung, die durch NPM vermittelt wird, resultiert in einer konstitutiven

Aktivierung von NPM-ALK. Neuere Ergebnisse konnten zeigen, dass Nucleophosmin den Tumorsuppressor Arf bindet und das Protein in Nucleolus transportiert^{47,48}. Dadurch wird die Wachstumsregulierende Funktion von Arf und die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 unterdrückt. Abgesehen von Fusionkinasen, gibt es auch NPM Frameshift-Mutation, die zu einer Delokalisierung von NPM ins Zytoplasma führt und in einer Untergruppe von AML-Patienten berichtet wird⁴⁹.

2.3.3 ALK – Anaplastische Lymphom Kinase

ALK auf Chromosom 2 kodiert für ein 177 kD großes Protein und setzt sich aus einer extrazellulären und transmembranen Domäne (TM), sowie einer intrazytoplasmatischen Tyrosinkinase (TKD) zusammen. Aufgrund seiner 57% Homologie zur Leukozyten Tyrosin Kinase (LTK) ordnet man ALK den Insulin-Rezeptortyrosinkinasen zu^{50,51}. ALK wird vornehmlich im neuronalen Gewebe exprimiert^{50,52}. Im hämatopoetischen Gewebe konnte das Protein nicht nachgewiesen werden. Dieses limitierte Expressionsmuster findet sich beim Menschen und der Maus^{53,54}. Die Tatsache, dass die stärkste ALK-Expression im neonatalen Gehirn zu finden ist legt eine Rolle für diesen Rezeptor in der Entwicklung des Gehirns nahe. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Expression von ALK teilweise mit der Expression der Neurotrophinrezeptoren, die für neuronales Wachstum und Differenzierung zuständig sind, überlappt⁵⁵.

2.3.4 Das Fusionsprotein NPM-ALK

In etwa 40-60% des ALCL findet man auf molekularer Ebene eine chromosomale Translokation t(2;5)(p23;q35), welche zur Expression des 80-kD Fusionsproteins NPM-ALK führt⁵⁶⁻⁵⁸. Dieses besteht aus dem N-terminalen Abschnitt des nukleären Phosphoproteins Nucleophosmin (NPM; 1-117aa) und dem C-terminalen Teil der intrazellulären Domäne der Rezeptortyrosinkinase Anaplastische Lymphom Kinase (ALK; 1058-1620aa)^{58,59}. Die Oligomerisierungsdomäne von NPM trägt dazu bei, dass NPM stabile Di-, Tri- und Oligomere formt⁴⁵. NPM ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, was wiederum von Bedeutung für das Fusionsprotein NPM-ALK ist. Im Gegensatz zu NPM wird ALK gewebsspezifisch in Nerven- und embryonalem Gewebe exprimiert^{52,58}. Durch die Fusion des N-terminalen Parts von NPM an den C-terminalen Teil von ALK kommt es zur ubiquitären Expression der

Tyrosinkinase, somit auch in lymphatischem Gewebe. Zudem leitet die Oligomerisierungsdomäne von NPM die Homodimersierung des Fusionsproteins ein und ahmt dadurch die Oligomerisierung von ALK nach Ligandenbindung nach. Dies führt wiederum zur gegenseitigen Phosphorylierung (sog. Autophosphorylierung) und damit zur Aktivierung der Kinase⁵⁹ (siehe Abb. 1). Während die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor nur vorübergehend besteht, ist die zuvor beschriebene Oligomerisierung nicht reguliert und initiiert eine konstitutive Aktivität der onkogenen Rezeptortyrosinkinase. NPM-ALK besitzt 21 mögliche Stellen der Autophosphorylierung, an welche z.B. Moleküle binden können, die sog. Phosphotyrosinbindungsdomänen (PTB) enthalten, welche wiederum bei der Aktivierung verschiedener promotogener Signalwege eine Rolle spielen. Das reziproke ALK-NPM Fusionsgen wird nur minimal transkribiert und spielt bei der molekularen Pathogenese der ALCL wahrscheinlich keine Rolle⁶⁰⁻⁶².

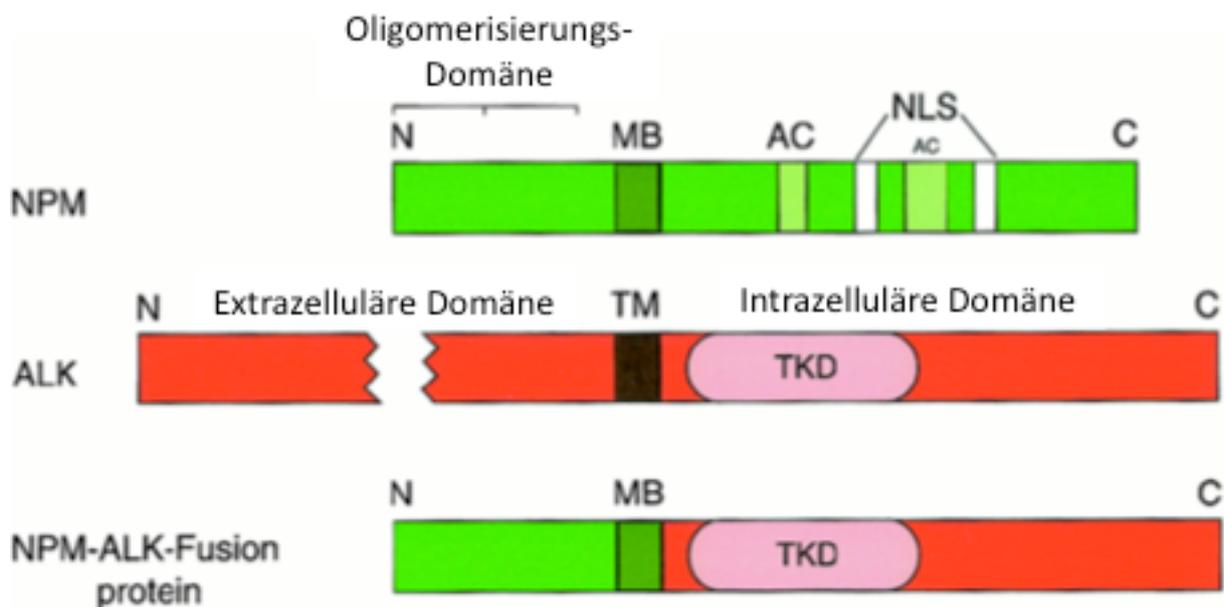


Abb. 1) Schematische Übersicht über die t(2;5) Translokation

Das Protein NPM zeichnet sich durch seine Oligomerisierungsdomäne, seiner Metallbindungsdomäne (MB) und seinem nukleären Lokalisationssignal (NLS) aus. Im intrazytoplasmatischen Teil von ALK befindet sich die Tyrosinkinasedomäne (TKD). Bei der t(2;5) Translokation verbindet sich der N-terminale Anteil von NPM mit dem der C-terminalen Domäne von ALK (Wössmann, 2003).

In vitro Experimente konnten zeigen, dass das Fusionsprotein NPM-ALK in der Lage ist Fibroblasten und Lymphozyten zu transformieren⁴³. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass retrovirale Infektion von Mäuseknochenmark mit NPM-ALK und anschließender Transplantation in letal bestrahlte Mäuse die Lymphomentwicklung in diesen Tieren induziert⁶³. Es ist daher davon auszugehen, dass NPM-ALK eine bedeutende Rolle für die Pathogenese des ALCLs spielt⁶⁴.

2.3.5 NPM-ALK aktivierte Signalkaskaden

Das Fusionsprotein NPM-ALK aktiviert verschiedenste Proteine, die hauptsächlich an der Proliferation beteiligt sind bzw. antiapoptotische Wirkung haben (siehe Abb. 2). Unter Ihnen befindet sich PLC γ ^{65,66}, PI3-Kinase⁶⁶⁻⁶⁹, Jak3⁷⁰⁻⁷², Stat3⁷³⁻⁷⁸, Stat5^{79,80}, Foxo3a⁸¹ und Src⁸² neben weiteren Proteinen. Es konnte gezeigt werden, dass Tyrosin 664 des Fusionsproteins entscheidend für die Bindung von PLC γ an NPM-ALK ist. Wird die Aminosäure an dieser Stelle mutiert, zeigt sich eine deutliche Transformationsdefizienz *in-vitro*, welche durch die Überexpression von unmutiertem NPM-ALK wiederhergestellt werden konnte. Diese Beobachtung zeigt, dass PLC γ für die promotogenen Eigenschaften von NPM-ALK unbedingt benötigt wird. Der PI3K / Akt Signalweg und die damit verbundene Phosphorylierung und Inaktivierung von Bad, einem proapoptotischen Molekül, trägt ebenso zum Überleben der Zellen bei. Durch die Bindung zwischen der regulatorischen Untereinheit p85 von PI3K über zwei SH2 Domänen mit aktivierten Tyrosinkinase kommt es zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit p110 und damit zur Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (PI), PI4-Phosphat (PI4P) und PI4,5-Phosphat⁸³. Die daraus resultierenden 3-Phosphoinositide können über eine Pleckstrin Homologie (PH) Domäne die Serin / Threonin Kinase AKT binden und aktivieren und dadurch proapoptotische Signalkaskaden inhibieren⁸⁴. Dies konnte auch im Kontext mit der Tyrosinkinase NPM-ALK gezeigt werden⁶⁶. Über AKT wird auch der Transkriptionsfaktor Foxo3a phosphoryliert und degradiert⁸⁵, wodurch die Proliferation NPM-ALK positiver Zellen eingeleitet und der programmierte Zelltod unterdrückt wird. Durch Inhibierung der PI3 Kinase mit Wortmannin oder LY294002 konnte Apoptose in ALCL Zelllinien induziert werden⁶⁷, was die Bedeutung des antiapoptotischen PI3K-Signalwegs im großzellig-anaplastischen Lymphom unterstreicht. Die Adaptormoleküle IRS-1, Grb2 und SHC binden über Phosphotyrosin-Bindungs- (PTB) Domänen direkt an NPM-ALK⁵⁹, die ihrerseits RAS rekrutieren und aktivieren. NPM-ALK Mutanten, bei denen die

Rekrutierung von IRS-1 und SHC defekt ist, zeigen in NIH3T3 transfizierten Zellen trotzdem Transformationspotenzial, so dass die Wichtigkeit dieses Signalweges zumindest *in-vitro* nicht essentiell zu sein scheint⁶⁵. Es wurde gezeigt, dass die Januskinase Jak3 den Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert⁸⁶. In ALCL-Zelllinien führte die Inhibierung von Jak3 zur reduzierten Phosphorylierung von Stat3, wodurch es zur Einleitung der Apoptose kommt. Dies steht im Widerspruch zu einer anderen Publikation, in der die These aufgestellt wird, dass STAT3 ein direktes Substrat von NPM/ALK sein könnte, da eine Jak3-Bindungsdefiziente NPM/ALK-Variante in der Lage war STAT3 zu phosphorylieren⁷³. Die Bedeutung von STAT3 und STAT5 scheint auch wesentlich für die Lymphomagenese zu sein. Retrovirale Infektion NPM-ALK positiver Zellen mit einer dominant-negativen STAT5B Mutante inhibierte die antiapoptotische Aktivität von NPM-ALK⁷⁹.

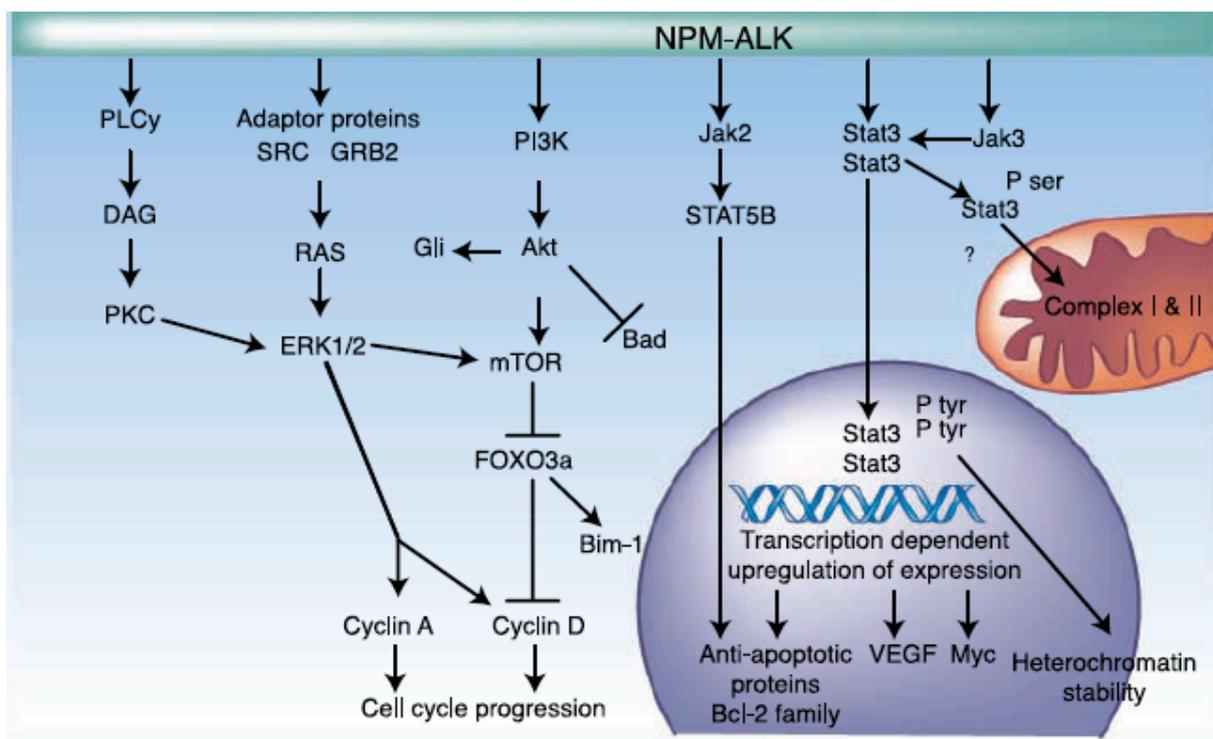


Abb. 2) Darstellung der durch NPM-ALK aktivierten Signalwege

Eine Übersicht der wichtigsten Signalwege, die durch das konstitutiv aktive NPM-ALK aktiviert werden (Mosse, 2009).

2.3.6 ALK Fusionspartner

Bis lang sind mehrere ALK-Fusionspartner bekannt⁸⁷⁻⁹⁸ (siehe Abb. 3), die jedoch keinen Einfluss auf den klinischen Phänotyp einer ALK-positiven ALCL zu haben scheinen^{89,95}. Mit Ausnahme von MSN-ALK und MYH9-ALK enthalten alle anderen chimären ALK-Fusionen

denselben C-terminalen Anteil von ALK (von 1058-1620 bp). Dennoch ist allen ALK-Fusionsproteinen folgende Eigenschaften gemein: a.) Ein N-terminaler Fusionspartner, dessen Promotor ubiquitär aktiv ist, wodurch das Fusionstranskript in vielen Zellen exprimiert wird und b.) Der ALK Fusionspartner weist eine Oligomerisierungsdomäne auf, wodurch ALK durch Autophosphorylierung konstitutiv aktiv wird und somit konstitutive ALK Kinaseaktivität aufweist⁴³. Die Selbstassoziiierung der ALK Fusionsproteine mithilfe der Oligomerisierungsdomäne des Fusionspartners imitiert die Liganden-vermittelte Aggregation und Aktivierung des natürlichen ALK Rezeptors, also den normalen Mechanismus, der die ALK Aktivität steuert. Durch die Autoaggregation der Fusionspartner ist diese Aktivität aber nicht mehr kontrolliert und zelluläre Signalkaskaden werden dadurch kontinuierlich aktiviert⁵⁹. Dies wiederum führt zur neoplastischen Transformation der Zelle. Die Fusionspartner TPM3, TPM4 und CLTC finden sich neben der Erkrankung des großzellig anaplastischen Lymphoms auch bei den entzündlichen, myofibroblastischen Tumoren (IMT)^{91,98,99}.

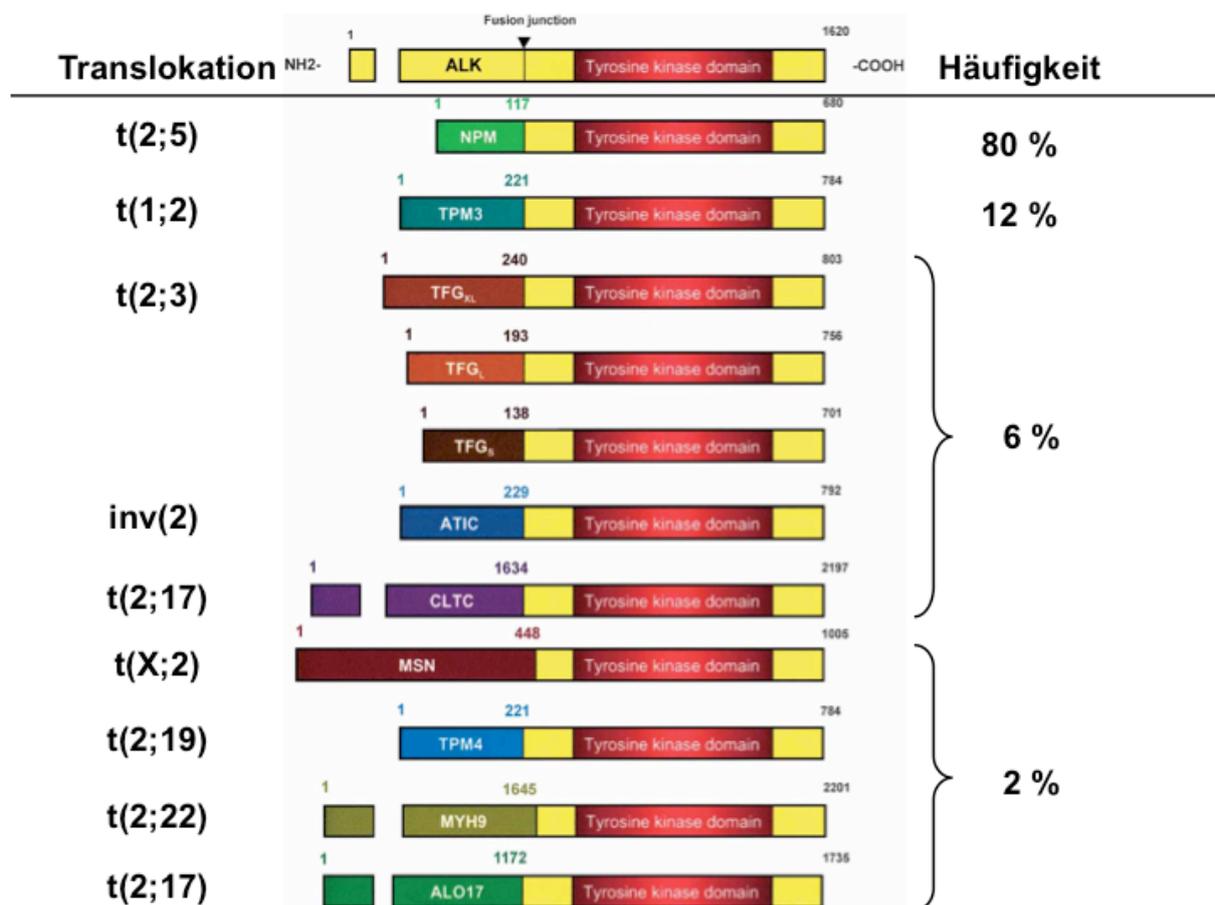


Abb. 3) Übersicht über die verschiedenen ALK-Fusionspartner

In der Abbildung sind die relevantesten ALK-Fusionspartner und deren Häufigkeit bei ALCL-Erkrankungen abgebildet (Wössmann, 2003).

In kürzlich veröffentlichten Studien wurde gezeigt, dass ALK-Fusionen auch zu weiteren Erkrankungen führen können. Die EML4-ALK Translokation wurde in etwa 10% der Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungentumoren identifiziert¹⁰⁰. Die Relevanz dieser Fusion konnte in einem transgenen Mausmodell bestätigt werden, in welchem die Tiere Adenokarzinome in den Lungen ausbildeten¹⁰¹.

2.3.7 NPM-ALK im Tiermodell

Kurz nach der Identifizierung der onkogenen Tyrosinkinase NPM-ALK, als Produkt das für die t(2;5) Translokation kodiert¹⁰², wurde wenige Jahre später ein murines NPM-ALK-Tumormodell beschrieben¹⁰³. Die Transduktionseffizienz des retroviralen Infektions-/Transplantations-Modells war jedoch niedrig. Zwar wiesen die Mäuse eine Lymphom-ähnliche Erkrankung mit einer Latenzzeit von mehr als sechs Monaten auf, doch zeigten die Tumoren ausnahmslos einen B-Zell-Phänotyp. Wenige Zeit später wurden verbesserte NPM-ALK Infektions- / Transplantations-Modelle mit höherer Transduktionseffizienz beschrieben, aber nicht eine dem ALCL entsprechenden Phänotyp^{63,104}. Es konnte erneut eine Lymphom-ähnliche Erkrankung mit einer Latenzzeit von wenigen Wochen induziert werden, doch handelte es sich bei den Mäusen histologisch um eine maligne Histiozytose. Dies liegt mitunter daran, dass bei den bisherigen Mausmodellen Gesamt-Knochenmark infiziert wurde, wodurch sich die eigentliche Zielzelle der NPM-ALK Translokation nicht eindeutig bestimmen lässt. Das ist insofern von Bedeutung, als dass die ALCL Entität einen T-Zell Hintergrund aufweist und ein adäquates Mausmodell diese Linienspezifität berücksichtigen sollte. Bei weiteren Mausmodelle wurde NPM-ALK transgen exprimiert. Zum einen unter Kontrolle des CD4-Promotors, wodurch NPM-ALK vorwiegend in T-Zellen exprimiert wird. Zum anderen unter dem vav-Promotor, wobei die Expression des Onkogens in hämatopoetischen Zellen eingeleitet wird. Es zeigte sich jedoch erneut kein ALCL-typischer Phänotyp, auch wenn es durch Verwendung des CD4-Promotors gelang, in einer transgenen Mauslinie reproduzierbar, aber nicht mit 100% Penetranz, T-Zell-Lymphome zu induzieren^{105,106}, welche jedoch kein CD30-Antigen exprimierten. Daher gilt es die Frage nach der eigentlichen Zielzelle der NPM-ALK vermittelten Transformation, die Rolle des Zellkontextes, als auch die Rolle der eng mit der Erkrankung vergesellschafteten Expression des CD30-Moleküls zu beantworten. Um dies zu erreichen ist es notwendig, eine linienspezifische Expression von NPM-ALK *in vivo* zu etablieren.

2.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines Lymphom-Modells in Mäusen, welches das beim Menschen beobachtete großzellig-anaplastischen Lymphom repräsentiert. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung, um die Funktion von NPM-ALK für die Tumorentstehung zu bestimmen und um potentielle molekulare Therapien, wie Kinase-Inhibitoren, in einem relevanten *in vivo* Modell zu testen. Humane großzellig-anaplastische Lymphome zeigen in der Mehrzahl der Fälle Charakteristika von T-Zellen und sind durch eine starke Oberflächenexpression des CD30-Antigens (Ki-1) gekennzeichnet. Wie bereits erwähnt, konnte ein in unserem Labor etabliertes retrovirales Infektions- / Transplantations-Modell der NPM-ALK-induzierten Lymphomagenese zeigen, dass die Expression von NPM-ALK in murinen Knochenmarks (KM) - Zellen abhängig vom retroviralen Titer zu histiozytären oder plasmazytoiden Tumoren, nicht aber zu T-Zell-Neoplasien führt⁶³. Die möglichst genaue Rekonstruktion der humanen Erkrankung im Mausmodell ist aber von größter Bedeutung für die Analyse der molekularen Pathogenese. Da bisher kein entsprechendes Mausmodell des ALCL existiert, wird im folgenden Projekt versucht, dass bereits bestehende murine Modell der ALCL weiter zu optimieren und eine linienspezifische Expression von NPM-ALK zu erreichen. Ziel ist es, in der Maus ein System zu etablieren, in dem NPM-ALK linienspezifisch in verschiedenen Differenzierungsstadien aktiviert und so z.B. gezielt in verschiedenen Zellen exprimiert werden kann, um eine dem menschlichen ALCL phänotypisch homologe Erkrankung zu etablieren. Dies könnte die Frage beantworten, ob NPM/ALK in der Lage ist Zellen zu transdifferenzieren, wie es zum Beispiel beim Hodgkin-Lymphom der Fall ist. In dieser Entität ist die Ursprungszelle eine B-Zelle, die während ihrer Transformation typische B-Zellmarker verliert und T-Zellrezeptoren exprimiert¹⁰⁷. Von entscheidender Bedeutung zur Beantwortung dieser Fragestellung und für den Phänotyp der ALCL scheint die korrekte spatio-temporäre Expression von NPM-ALK zu sein. Eine zentrale Rolle für diesen Ansatz spielt hierbei das Cre / loxP Rekombinase-System. Das Prinzip der CRE-lox-Rekombinierung wird derzeit schon sehr erfolgreich *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt, um z.B. konditionell einzelne Gene in der Maus auszuschalten. Mit dem Knock-in-Modell in dieser Arbeit wird die Zell-spezifische Expression von NPM-ALK durch die Auswahl von Knochenmark-Spendermäusen, die Cre unter der Kontrolle eines linienspezifischen Promotors exprimieren erreicht, indem der NPM-ALK-Expressionskassette eine von loxP-Stellen flankierte Stopkassette vorgeschaltet wird. Dadurch erfolgt die Rekombination und damit die

Expression von NPM-ALK nur in den Zellen, in denen der jeweilige Promotor aktiv ist und Cre exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde ein entsprechendes Konstrukt kloniert, das zusätzlich über eine internal ribosomal entry-site (IRES) die Koexpression des green fluorescent protein (EGFP) ermöglicht, so dass die Zellen, die mit dem Vektor infiziert wurden, leicht mittels FACS oder Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können¹⁰⁸. Die gezielte Expression von NPM-ALK in verschiedenen Zielzellen kann weiterhin einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Pathophysiologie des ALCL leisten. Da diese Methode prinzipiell auch auf andere Gene angewandt werden kann, ergibt sich darüber hinaus ein weites Feld an Anwendungsmöglichkeiten, das in verschiedenen Bereichen der hämatologischen Forschung von Nutzen sein kann.

Desweiteren bietet sich die Möglichkeit, neue molekulare Therapieformen bei dieser Lymphomentität zu evaluieren. Aufgrund der Tatsache, dass das ALCL auslösende Onkogen eine Tyrosinkinase ist, bietet sich die Möglichkeit an, diese mit spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren zu behandeln. Solche Compounds müssen vor ihrem klinischen Einsatz getestet werden, wofür sich ein ALCL imitierendes Mausmodell hervorragend eignen würde. Die erfolgreiche Entwicklung eines ALK spezifischen Kinaseinhibitors würde nicht nur Anwendung finden, um rezidivierende Patienten zu behandeln, sondern auch Kindern und Jugendlichen, die mehrheitlich von der ALCL betroffen sind, als Alternative zur intensiven und toxischen Chemotherapie zur Verfügung stehen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
5-Fluorouracil (5-FU, Ribofluor®)	Ribosepharm GmbH, München
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Fluka, Deisenhofen
Glycerol-2-phosphat	Aldrich Chemical Company, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Hank's balanced salt solution (HBBS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Iscove's modified DMEM (IMDM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Lipofectamine	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen

3.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur

DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Diphtherietoxin	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
Hygromycin B, 50mg/ml in PBS	Clontech, Palo Alto, CA, USA
IMDM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Muriner, rekombinanter Stammzellfaktor (SCF)	R&D Systems, Wiesbaden
Murines, rekombinantes Interleukin (IL)-3	R&D Systems, Wiesbaden
Murines, rekombinantes Interleukin (IL)-6	R&D Systems, Wiesbaden
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5%	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Neomycin, G418	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Opti-MEM®I, Serum-reduziertes Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNAClean™	Hybaid, Milford, MA, USA
RPMI 1640, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zeocin, 100 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme:

<i>DpnI</i> , 20 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
<i>EcoRI</i> , 100 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
<i>HindIII</i> , 20 U/μl	Roche, Mannheim
<i>HpaI</i> , 10 U/μl	Roche, Mannheim
<i>NheI</i> , 5 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
<i>PmeI</i> , 10 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach

Polymerasen:

<i>Pfu-Turbo</i>	Statagene, La Jolla, USA
AMV Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Alkalische Phosphatase:	
<i>CIAP</i> , 20-30 U/μl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Proteinasen:	
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Pronase E	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

3.1.4 Antikörper

Anti- β -Aktin (AC-15), monoklonal, Maus IgG1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Alk (Alk 11)	Stephan Morris, Memphis, USA
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus CD4 (L3T4), PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD8a (53-6.7), Ly-2, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD11b (M1/70), Mac1, Integrin α M chain, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD16/CD32 (2.4G2), Fc γ III/II Receptor, Ratte IgG (Maus BD Fc Block™)	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD30 (mCD30.1), PE-konjugiert, Ratte	ebioscience, Frankfurt a.M.
Anti-Maus CD45 (30-F11), LCA, Ly-5, PE-Cy5-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD45/B220 (RA3-6B2), B220, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD90.2 (53-2.1), Thy-1.2, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus Ly-6G (Gr-1)/Ly-6C (RB6-8C5), Gr-1, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Phospho Alk (pY1604), monoklonal, Rabbit	epitomics, California, USA
Anti-Phospho-Tyrosin (4G10), monoklonal, Maus IgG	Upstate Biotechnology, N. Y., USA
Anti-Phospho-Tyrosin (pY20), monoklonal, Maus IgG	PharMingen, San Diego, USA

3.1.5 Zelllinien

Suspensionszellen:

Ba/F3	murine pre-B-Zelllinie
HDLM-2	humane Hodgkin-Zelllinie
JB6	humane ALCL Zelllinie
Karpas 299	humane ALCL Zelllinie
Sudhl-1	humane ALCL Zelllinie

YAC-1 murine CD30-positive Zelllinie

Adhärente Zellen:

NIH3T3 murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie
 ΦNX-Eco (Phoenix E) retrovirale ecotrope Verpackungs-Zelllinie (Helfervirus-frei);
 293T (humane embryonale Nierenkarzinom)-Zellen, stabil transfiziert mit Moloney *GagPol-IRES-Lyt2* Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promotors (Selektion mit Hygromycin B) und Moloney *ecotropic envelope* Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors (Selektion mit Diphtherietoxin)

Die Zelllinie Ba/F3 und NIH3T3 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bereich Menschliche und Tierische Zellkulturen) in Braunschweig bezogen. Die Verpackungs-Zelllinie Phoenix E wurde uns von Gary P. Nolan, Stanford, USA zur Verfügung gestellt. Die Suspensionszelllinie YAC-1 wurde von Dr. Ursula Strobl Helmholtz-Zentrum, München zur Verfügung gestellt.

3.1.6 Vektoren und DNA-Konstrukte

Vektoren:

pcDNA 3.1/Zeo(+) Ampicillin, Zeocin Invitrogen, Leek, Niederlande
 MSCV MigR1 Ampicillin J. Miller/ W. Pear, Philadelphia, USA
 (Pear *et al.*, 1998)

DNA-Konstrukte:

hNPM/ALK in pcDNA 3.1/Zeo(+)
 hNPM/ALK KN in pcDNA 3.1/Zeo(+)
 hNPM/ALK in MSCV MigR1
 hNPM/ALK KN in MSCV MigR1
 loxP-Stop-loxP-EGFP in MSCV (MSE)
 loxP-Stop-loxP-NPM/ALK-IRES-EGFP in MSCV (MSNAIE)

3.1.7 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5 α TM F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Epicurian ColiTM XL-1Blue Supercompetent Cells <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB</i> , <i>lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, Heidelberg

3.1.8 Tyrosinkinaseinhibitoren

4SC-203 (SC71710) Alk-Inhibitor	4 SC Company, München
---------------------------------	-----------------------

3.1.9 Oligonukleotide für die RT-PCR

RT-PCR mCD30 3' 5'-CAATGAAGACGGGAAGTGCACA-3'

RT-PCR mCD30 5' 5'-CTCCAGAACAGTGGAGTTTGCA-3'

GAPDH 3' 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'

GAPDH 5' 5'-CCATCACCATCATCCAGGAG-3'

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

3.1.10 Primer für die Genotypisierung

Cre-Primer 3' 5'-GCTGCCACGACCAAGTG-3'

Cre-Primer 5' 5'-TCGCCATCTTCCAGCAG-3'

3.1.11 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rainbow Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Braunschweig

3.1.12 Mäuse und tierexperimentelle Materialien

Mausstamm:

Balb/C	Harlan Winkelmann GmbH, Borchon
C57Bl6	Harlan Winkelmann GmbH, Borchon
SCID-beige	Charles River, Sulzfeld

Tierexperimentelle Materialien:

Animal Bedding Fibre	Altromin GmbH, Lage-Lippe
Caesium 137- Strahlenquelle (33300 GBq)	Buchler GmbH, Braunschweig
Discardit™ II Spritze, steril	Becton-Dickinson, Heidelberg
EDTA-Kapillaren (20µl)	Sarstedt, Mümbrecht
Falcon™ Zellsieb (100 µm)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Global Rodent Breeding (25 kGy bestrahlt)	Harlan Teklad, Blackthorn, England
Infrarotlampe	Royal Philips Elektronik, Hamburg
Käfigsystem	Thoren, PA, USA
Microlance™ Injektionskanüle, steril (27G 3/4)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Objektträger (ISO Norm 8037/1)	Roth, Karlsruhe
S-Monovette®, EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Sub-Q, sterile PP Spritze, 1ml, 26G 1/2	Becton-Dickinson, Heidelberg
Vet abc Blood Counter	Scil, Viernheim

3.1.13 Molekularbiologische Kitsysteme

CellTiter® Aqueous Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, WI, USA
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Spin Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Penzberg
Rediprime® II DNA Labelling System	Amersham Biosciences, Braunschweig
Titan One Tube RT-PCR Kit	Roche, Penzberg

3.1.14 Standard Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Kodak, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
Elisa Reader Emax	MolecularDevices, Ebersberg
Entwickler Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
IBI geneZapper 450/2500 Elektroporator	Eastman Kodak, New Haven, USA
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät IKAMG RH	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter Ø32	Beckman, Fullerton, USA
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydewang, Dänemark
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hoefer, San Fransisco, USA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

3.1.15 Standard Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in A.d.
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	10% Methanol 10% Essigsäure in A.d.
Basales Knochenmarksmedium (BBMM):	325 ml IMDM 150 ml FCS 25 ml BSA (10% in IMDM) 5 ml L-Glutamin- Lösung (200mM) 100 µM 2-Mercaptoethanol 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
DNA-Probenpuffer (10-fach):	50% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 0,5 M EDTA in A.d.
FACS-Puffer:	1% BSA in PBS
Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl in A.d. mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert
LB-Medium (fest):	1,5% Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl , 5 mM EDTA 0,5% Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
RBC (Red Blood Cell)-Puffer:	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃

	0,1 mM Na ₂ EDTA, pH7.3 in A.d.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4% SDS in A.d.
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycin in A.d.
SSC-Puffer (20-fach):	0,3 M Natriumcitrat/HCl (pH 7,0) 3 M NaCl
Prästimulationsmedium:	BBMM 10 ng/ml mL-3 12 ng/ml mL-6 50 ng/ml mSCF
SOC-Medium:	2% Bacto-Trypton 0,55% Bacto-Hefeextrakt 0,5% 1M NaCl 0,5% 1M KCl in A.d. mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert 1% 2M Glukose (frisch zugegeben) 1% 2M MgCl ₂ (frisch zugegeben) sterilfiltriert (0,2µm Filter)
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH 8) in A.d.
TNE-Puffer:	10 mM Tris (pH 8) 100 mM NaCl 1 mM EDTA

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d. 20% Methanol in A.d.
Trenngelbuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4% SDS in A.d.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.2.1.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen ermöglichen die sequenzspezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA. Dabei entstehen abhängig vom verwendeten Enzym komplementäre, überhängende Enden (*sticky ends*) oder stumpfe Enden (*blunt ends*). Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in *Units* (U) angegeben. Eine *Unit* entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig zu schneiden. Eine quantitative Spaltung der DNA wird sichergestellt, indem die Restriktionsnukleasen im Überschuss zugesetzt werden. Um die DNA in definierte Fragmente zu zerlegen, wird sie mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in der vom Hersteller empfohlenen Pufferlösung inkubiert. Die für das jeweilige Enzym optimierten Inkubationsbedingungen werden vom Hersteller angegeben. In der Regel erfolgt die Inkubation bei 37°C für 2 h. Nach erfolgter Reaktion wird das Enzym durch Erhitzen auf 65°C denaturiert oder durch Aufreinigung im Agarosegel 3.2.1.4 aus dem Reaktionsansatz entfernt.

3.2.1.2 5'-Dephosphorylierung von DNA

Wird für die Linearisierung von Plasmiden nur ein Restriktionsenzym eingesetzt, liegt die Vektor-DNA nach dem Verdau mit identischen Restriktionserkennungssequenzen an 5'- und 3'- Ende vor. Diese werden von der Ligase bevorzugt religiert, ohne ein DNA-Fragment einzufügen. Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe verhindert die Religation des Klonierungsvektors, wodurch die Effizienz der Klonierung erheblich verbessert wird, da eine Ligation dann nur zwischen den freien 5'-Phosphatgruppen der Fremd-DNA und den 3'-OH-Enden des Plasmids möglich ist. Die Hydrolyse der freien 5'-Phosphatreste wird von der alkalischen Phosphatase *CIAP* katalysiert. Die Dephosphorylierung kann direkt im Restriktionsansatz durchgeführt werden, indem dieser mit 10-fachem Dephosphorylierungspuffer und A.d. verdünnt und mit 2-5 U Phosphatase versetzt wird. Die Inkubation erfolgt 1 bis 2 h bei 37°C. Anschließend wird das Enzym durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min inaktiviert.

3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer: 0,4 M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA in A.d.

DNA-Probenpuffer: 50% (m/V) Glycerol, 0,5% (m/V) Bromphenolblau, 0,5 M EDTA in A.d.

Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode für die Auftrennung, Identifizierung, Reinigung und präparative Isolierung von linearen DNA-Fragmenten. Unter den gelelektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen im Rückgrat der Nucleinsäuren ionisiert, so dass die Polydesoxynucleotide als Polyanionen vorliegen. Die DNA-Fragmente wandern somit im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist und ihre Beweglichkeit weitgehend von der Molekülgröße bzw. -länge abhängt. Agarose, ein aus Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid, bildet nach Aufkochen in Pufferlösung beim anschließenden Abkühlen eine Matrix aus, die bewirkt, dass kleinere DNA-Fragmente leichter und schneller durch sie hindurch wandern als größere. Durch Variation der Agarosekonzentration können unterschiedliche Trennbereiche erzielt werden. Mit niedrigprozentigen Gelen lassen sich größere DNA-Fragmente separieren, während hochprozentigere Gele der Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente dienen. Die Zugabe DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid, ermöglicht die Visualisierung der DNA-Fragmente nach Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm. Zur Größenbestimmung müssen bei der elektrophoretischen Trennung Größenstandards (DNA-Molekulargewichtsmarker) mit aufgetrennt werden.

Für die Herstellung eines Agarosegels wird die Agarose in TAE-Puffer vorsichtig aufgekocht, bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlen auf 50°C wird die Lösung mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt und auf einem Gelträger mit Taschenschablone ausgegossen. Bei Raumtemperatur erstarrt das Gel innerhalb von 30-60 min. Die Auftrennung der mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Fragmente erfolgt in einer mit TAE-Puffer gefüllten DNA-Elektrophoresekammer durch Anlegen einer Spannung von 20-210 V. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Nucleinsäuremoleküle visualisiert und fotografisch dokumentiert oder zur präparativen Isolierung 3.2.1.4 ausgeschnitten.

3.2.1.4 Extraktion von Nucleinsäuren aus Agarose-Gelen

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten können diese nach elektrophoretischer Auftrennung mit einem Einmalskalpell unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Um Veränderungen der DNA in Form von Strangbrüchen und

Dimerbildungen zu vermeiden, wird eine UV-Quelle mit geringer Bestrahlungsstärke verwendet und die Expositionszeit der DNA in UV-Licht möglichst gering gehalten. Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgt nach dem Protokoll des „QIAquick® Gel Extraction Kit“. Die DNA wird je nach erwünschter Konzentration mit 20-50µl Elutionspuffer oder A.d. von der Säule eluiert und bei -20°C gelagert.

3.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt werden. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen in wässriger Lösung bei 280 nm liegt, ist es außerdem möglich, durch eine Messung der Extinktion E bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung zu überprüfen. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit. Je größer der Quotient aus spezifischem (E_{260}) zu unspezifischem Signal (E_{280}) ist, desto reiner ist die Nukleinsäureprobe. Ist der Quotient kleiner als 1,8, so liegen Verunreinigungen vor. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,0 handelt es sich um eine weitestgehend reine Nukleinsäurelösung. Die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Extinktion beträgt eins ($E_{260}=1$) für doppelsträngige DNA der Konzentration 50 µg/ml und einzelsträngige RNA der Konzentration 40 µg/ml in H₂O. Die Konzentrationsbestimmung der verwendeten Nukleinsäuren erfolgt mit dieser Methode.

3.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle wird die linearisierte Vektor-DNA mit dem Restriktionsfragment der Fremd-DNA kovalent verknüpft. Das Schließen der Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende wird von der ATP-abhängigen T4-Ligase katalysiert. Vektor- und Fragment-DNA liegen bei der Ligation in einem Verhältnis von 1:3-1:7 vor. Die Menge der eingesetzten DNA wird photometrisch bestimmt oder mittels Gelelektrophorese abgeschätzt. Die Ligation wird nach dem Protokoll des „Rapid DNA Ligation Kit“ durchgeführt. Als Kontrolle dient ein Ansatz mit gleicher Menge an linearisiertem Vektor ohne einzufügende Fremd-DNA. Nach erfolgter Ligation kann die rekombinante DNA zur Transformation von kompetenten Bakterien 3.2.2.3 eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.1.7 Isolierung genomischer DNA aus murinen Zellen

TNE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA

Pronase E: 10 mg/ml Pronase E in 10 mM Tris und 10 mM NaCl (Selbstverdau: 1h; 37°C)

Proteinase K: 10 mg/ml in A.d.

Aufschlusspuffer: 1ml TNE-Puffer; 10 µl Proteinase K; 25 µl Pronase E; 100 µl SDS 10%

Für die Extraktion genomischer DNA aus murinen Zellen werden 10-20 x 10⁶ Zellen in 20-50 µl PBS resuspendiert und der Suspension 500 µl Aufschlusspuffer zugesetzt. Der Ansatz wird zunächst 2 h bei 37°C und anschließend bei 56°C über Nacht schüttelnd (500 Upm) inkubiert. Am nächsten Tag wird die Lösung mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, stark gevortext und anschließend bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen und die darin gelöste DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 2 Volumina eiskaltem Ethanol (100%) gefällt. Die DNA wird zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Sedimentvolumen in 50-500 µl A.d. aufgenommen. Die Konzentration kann, wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben, bestimmt werden. Die so gewonnene DNA wurde z.B. zur Genotypisierung der Mäuse verwendet

3.2.1.8 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgt nach der Vorschrift des „RNAClean™“-Systems, welches auf einer von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode basiert¹⁰⁹. Hierbei werden jeweils 10⁷ Zellen mit der „RNAClean™“-Lösung versetzt und durch Vortexen in Lösung gebracht. Die Lösung kann für spätere Verarbeitung bei -80°C gelagert werden. Nach Zugabe von Chloroform und starkem Vortexen bildet sich eine Suspension, die nach 5-minütiger Inkubation auf Eis in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge für 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert wird. Der wässrige Überstand wird abgenommen, mit eiskaltem Isopropanol versetzt und zur Fällung der RNA bei -20°C 15 min inkubiert. Die präzipitierte RNA wird bei 4°C abzentrifugiert und das Sediment nach Waschen mit Ethanol (70%) und Trocknen in 10-50 µl Wasser aufgenommen. Da RNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse ist, wird sie bei -80°C gelagert. Die erhaltene RNA wurde wie in 3.2.1.11 beschrieben in cDNA umgeschrieben und anschließend zur RealTime-Analyse (siehe 3.2.1.12) eingesetzt.

3.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist es möglich, *in vitro* Nukleotidsequenzen enzymatisch zu vervielfältigen¹¹⁰. Die PCR beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen DNA-Strang durch semikonservative Replikation zu verdoppeln und ihrer Thermostabilität. Zu Beginn jedes Amplifikationszyklus wird die doppelsträngige Matrizen-DNA (*Template*) durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, so dass beim anschließenden Abkühlen auf die Anlagerungstemperatur Startermoleküle spezifisch an die Zielregion hybridisieren können (*annealing*). Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide (*Primer*) verwendet, welche die zu amplifizierende Region begrenzen. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase bei Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) den neuen DNA-Doppelstrang (*extension*). Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert. Die thermostabile, aus dem marinen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* gewonnene *Pfu*-Polymerase besitzt neben der 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität eine 3'→5'-Exonuclease-Prüffunktion (*proofreading*)¹¹¹. Die *Pfu*-Polymerase arbeitet mit einer höheren Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase, da sie aufgrund ihrer Exonucleaseaktivität am 3'-Ende falsch eingebaute Nucleotide entfernt und an deren Stelle das richtige Nucleotid einsetzt. Durchgeführt wird die PCR in einem Thermozykler, dessen automatische Steuerung ein individuell programmierbares zyklisches Temperaturprogramm regelt. Neben der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente können Mutationen an doppelsträngiger DNA vorgenommen werden, die in Punktmutation, Deletion oder Insertion einzelner oder mehrerer Aminosäuren resultieren. Außerdem ist es möglich, durch PCR-Mutagenese neue Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in die Matrizen-DNA einzuführen.

3.2.1.10 PCR-Mutagenese

Die PCR-Mutagenese wird unter Verwendung des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ durchgeführt. Die für den Austausch von Basenpaaren eingesetzten Primer sind komplementär zueinander. Die auszutauschende Sequenz befindet sich in der Mitte der 25 bis 40 Basenpaare langen Oligonukleotide. Optimale Primer haben einen GC-Anteil von mindestens 40% und eine Schmelztemperatur von 78°C (10°C über der optimalen Reaktionstemperatur für die *Pfu*-Polymerase). Da die Primer eine entgegengesetzte Orientierung aufweisen und sich an der gleichen Stelle im Plasmid anlagern, werden nur

ringförmige Matrizen effizient amplifiziert. PCR-Ansatz:

5 µl 10x Reaktionspuffer
 50 ng dsDNA-Matrize
 125 ng 3'-Primer
 125 ng 5'-Primer
 2,5 mM dNTP-Mix
 2,5 U *Pfu*-DNA-Polymerase
 ad 50 µl A.d.

Vor dem ersten Zyklus wird eine Denaturierung durchgeführt, um zu gewährleisten, dass alle Matrizenmoleküle einzelsträngig vorliegen. Nach dem letzten Zyklus schließt sich ein zehnmütiger Polymerisationsschritt an, um der Polymerase zu ermöglichen, alle synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen. Die zu wählende Zyklenzahl hängt von der Art der einzuführenden Mutation ab. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer.

Ablauf der PCR-Reaktion:

1x	95°C, 30 sec
16-18x	95°C, 30 sec (Denaturierung)
	55-62°C, 1 min (Hybridisierung)
	68°, 2 min/kb Matrizen-DNA (Polymerisation)
1x	68°C, 10 min

Nach Ablauf der gesamten Reaktion weisen alle Amplifikate die durch die eingesetzten Primer festgelegte Mutation auf. DNA-Moleküle, die mittels PCR vervielfältigt wurden, sind im Gegensatz zu *in vivo* amplifizierten DNA-Plasmiden nicht methyliert. Um die methylierte Matrizen-DNA aus dem Gemisch zu entfernen, wird dieses für 1 h bei 37°C mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* inkubiert, die ausschließlich methylierte DNA schneidet. Anschließend wird die mutierte Plasmid-DNA mit dem „QIAquick® Spin Purification Kit“ aufgereinigt. Für die Transformation werden „Epicurian Coli™ XL-1 Blue“- Bakterien eingesetzt. Dieser Bakterienstamm ist in der Lage, die nicht ligierten Stellen der amplifizierten Plasmide („nicks“), die durch Anheftung der Polymerase bei der Mutagenese entstanden sind, zu reparieren. Außerdem fehlen diesem Stamm die Restriktionssysteme, die nicht methylierte DNA abbauen würden. Die Transformation erfolgt wie in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben. Zur Bestätigung der erfolgreichen Mutagenese wird von der Firma „GATC-Biotech, Konstanz“ eine Sequenzanalyse durchgeführt.

3.2.1.11 Reverse-Transkriptase PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Es erfolgt zuerst eine cDNA-Einzelstrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf

folgt eine PCR mit spezifischen Primern, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Für die Einzelstrangsynthese können Oligo(dT)- oder „Random“-Primer eingesetzt werden. Die 15 bis 20 bp langen Oligo(dT)-Primer hybridisieren im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA. „Random“-Primer sind Hexanucleotide mit einer statistischen Basenzusammensetzung. So können sie entsprechend ihrer Sequenz an den verschiedensten Stellen eines mRNA-Moleküls hybridisieren und damit eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten. Außerdem ist es möglich, bereits für die cDNA-Synthese spezifische Primer zu verwenden.

Für die RT-PCR wird das „Titan One Tube RT-PCR Kit“ eingesetzt. Dieses beinhaltet einen Enzymmix, der es erlaubt, die reverse Transkription und die PCR nacheinander in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Für die Einzelstrangsynthese werden dieselben spezifischen Primer wie für die anschließende PCR verwendet. Nach 30-minütiger RT-Reaktion bei 50°C folgt eine PCR mit 35 Zyklen. Die Produkte werden zur Analyse auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, mittels UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert.

3.2.1.12 Quantitative Real time PCR (RTQ-PCR)

Die RTQ-PCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR 3.2.1.9, ermöglicht aber zusätzlich eine Quantifizierung. Hierfür wird zu dem Reaktionsansatz ein DNA-Farbstoff (SYBR[®]Green) zugegeben. Nach Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes an doppelsträngige DNA, nimmt die Fluoreszenz zu und ist somit proportional zur Menge an PCR-Produkt. Die Fluoreszenz wird am Ende jedes Elongationsschrittes gemessen. Die RTQ-PCR wurde nach Herstellerangaben des „Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG“ durchgeführt und auf einem ABI Prism 7700[®] analysiert. Zur Quantifizierung wurden die erhaltenen Daten auf das Kontrollgen GAPDH oder β -Aktin normiert. Verwendete Primer siehe 3.1.9

3.2.2 Arbeiten mit Bakterien

3.2.2.1 Kulturbedingungen

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% NaCl; 0,5% Bacto-Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert; pH 7,0

LB-Agarplatten: 1,5% Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert

Ampicillin-Stammlösung (1000x): 50 mg/ml in A.d., sterilfiltriert

Das Luria-Bertani (LB)- Medium wird entsprechend der Vorschrift angesetzt. Mit Natronlauge wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird das Medium autoklaviert. Das Selektionsmedium enthält zusätzlich 50 µg/ml Ampicillin. Die Anzucht einer Bakterienkultur sollte in Gegenwart eines Antibiotikums stattfinden, um sicherzustellen, dass nur Zellen wachsen können, die ein Resistenz-vermittelndes Plasmid enthalten. Flüssigkulturen werden bei 37°C mit 250 Upm geschüttelt. Für Kulturplatten werden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (m/V) Bactoagar zugesetzt. Nach Abkühlen auf 50°C und Zusatz des entsprechenden Antibiotikums werden die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen.

3.2.2.2 Kompetente Bakterien

Nicht behandelte Bakterienzellen nehmen zirkuläre Fremd-DNA nur in geringem Maße auf. Um Bakterien effizient transformieren zu können, muss deshalb die Bakterienwand durch chemische oder physikalische Behandlung durchlässig gemacht werden. Die auf diese Art behandelten Bakterien werden als „kompetent“ bezeichnet. Kompetente Bakterien müssen bei –80°C gelagert und immer auf Eis aufgetaut werden, da sie sonst die Fähigkeit verlieren DNA aufzunehmen. Die verwendeten Stämme DH5α und Epicurian XL1-Blue wurden bereits kompetent erworben.

3.2.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

SOC-Medium: 2% Bacto-Trypton; 0,55% Bacto-Hefeextrakt; 0,5% 1M NaCl; 0,5% 1M KCl in A.d. mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt; autoklaviert

1% 2M Glukose (frisch zugegeben); 1% 2M MgCl₂ (frisch zugegeben); sterilfiltriert

Durch kurzzeitige Hitzebehandlung kann Vektor-DNA in chemisch kompetente Bakterien eingeschleust werden. Dazu werden 50 µl des kompetenten Bakterienstamms auf Eis aufgetaut, mit 0,5 µg Plasmid-DNA (Retransformation) oder 5 µl Ligationsansatz 3.2.1.6 vorsichtig gemischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Durch die Kälte lagern sich die Plasmide an der Zellwand an. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 37°C (*DH5α*) bzw. 42°C (*Epicurian XL1-Blue*) für 45 Sekunden. Durch die schlagartige Erwärmung werden die

Plasmide in die Zelle aufgenommen. Danach inkubiert man die Bakterien 2 min auf Eis. Eine Retransformation wird anschließend direkt auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen, während mit Ligationsansatz transformierte Bakterien zunächst für 1 h bei 225 Upm und 37°C in SOC-Medium inkubieren. Die Bakterien werden bei 3000 Upm zentrifugiert und der Überstand bis auf 50 µl verworfen. Das Sediment wird in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die anschließende Inkubation der Platten bei 37°C sollte 12-16 h nicht überschreiten, da sich bei längerer Inkubation Satellitenkolonien bilden können. Durch das auf dem Plasmid befindliche β -Lactamasegen sind nur erfolgreich transformierte Bakterienzellen in der Lage, auf ampicillinhaltigem Nährboden Kolonien zu bilden.

3.2.2.4 Kultivierung der transformierten Bakterien

Die durch die Transformation entstandenen Kolonien werden zur Anreicherung in LB-Medium mit Ampicillin kultiviert. Dazu impft man das Medium mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte an und lässt die Bakterienkultur über Nacht bei 37°C und 225 Upm schütteln. Anschließend kann die Vektor-DNA wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben isoliert werden.

3.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi Präparation)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Kulturen erfolgt je nach erwünschter DNA-Menge mit unterschiedlichen Präparationskits. Kleinere Mengen (<20 µg), die nur zu analytischen Zwecken benötigt werden, können mit Hilfe des „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ isoliert werden. Dazu impft man den Klon, der das zu amplifizierende Plasmid enthält in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum an und kultiviert die Bakterien über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C. Mit dem „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ können bis zu 500 µg Plasmid-DNA gewonnen werden, indem man den entsprechenden Klon nach 1-4 h Vorkultur in 200 ml LB-Selektionsmedium überimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wird bei 5000 Upm 5 min abzentrifugiert und das Sediment dem entsprechenden Protokoll folgend aufgearbeitet.

3.2.2.6 Induktion und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Induktion: LB-Amp-Medium; NETN-Puffer; 1mM IPTG

Aufreinigung: 10mg/ml Lysozym; Glutathion-Sepharose

Zur Herstellung rekombinanter Fusionsproteine wird das Glutathion S-Transferase Genfusionssystem verwendet. GST ist ein 26 kDa großes Enzym, das die Reduktion der Disulfidbrücken im oxidierten Glutathion zu jeweils freien SH-Gruppen katalysiert. Die Besonderheit von GST ist die sehr hohe Affinität zu seinem Substrat. Zunächst wird die cDNA des zu exprimierenden Proteins in den pGEX Vektor kloniert. Die Expression des Fusionsgens erfolgt nach Induktion des Promoters mit dem Lactose Analog IPTG. Das rekombinante GST-Fusionsprotein akkumuliert im Zytoplasma der Bakterien. Durch Aufschluss der Bakterien und anschließender Affinitätschromatographie kann es einfach und schnell aufgereinigt werden. Dabei ist Glutathion an einer Sepharose-Matrix immobilisiert, an das das Fusionsprotein über den N-terminalen GST Teil binden kann. Alle anderen Proteine, die in dem Bakterienlysat vorhanden sind, werden durch Waschen beseitigt.

Die Expression des entsprechenden Fusionsproteins erfolgt in *BL21*. Dazu werden diese zunächst mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert. Ein Klon wird in einer 5-ml Übernachtkultur in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Zur Proteinexpression wird diese Vorkultur in 200 ml LB-Amp-Medium überführt. Wenn die Bakterien ihre logarithmische Wachstumsphase erreicht haben ($OD_{600} \sim 0,4-0,6$) wird die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mM IPTG für zwei Stunden induziert. Die Bakterien werden im Anschluss bei 4000 Upm und 4°C für 10 min sedimentiert und in 2 ml NETN-Puffer pro 50 ml Bakterienkultur resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird für mindestens 15 min bei -80°C gelagert, um die Zellen durch einen Aggregationswechsel aufzubrechen. Nach Auftauen der Bakterien auf Eis, wird zu diesen 100 µg/ml Lysozym gegeben. Das Enzym spaltet glykosidische Bindungen in den Zuckerketten des Peptidoglukangerüsts der Bakterienzellwand und bewirkt so ihren Abbau. Nach einer 30 minütigen Inkubation erfolgt eine Ultraschallbehandlung (10 Impulse bei 50%), die sehr effizient Zellen aufschließt. Zudem wird die DNA unter diesen Bedingungen fragmentiert. Im folgenden Zentrifugationsschritt (4°C, 14000 Upm; 20 min) wird die unlösliche Proteinfraction (Pellett) von der löslichen (Überstand) getrennt. Der Überstand, der das GST-Fusionsprotein beinhaltet, wird mit 30 µl Glutathion-Sepharose *Beads* versetzt. Nach halbstündiger Inkubation auf dem Rollrad bei 4°C kann an die Sepharose gebundenes Protein durch Zentrifugation sedimentiert werden.

Durch dreimaliges waschen des Pellets mit NETN-Puffer werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die *Beads* werden anschließend in 100 µl NETN-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert. Zur Überprüfung der Qualität und Quantität der Aufreinigung wird ein Aliquot der Probe in einem SDS-Gel 3.2.4.3 aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung visualisiert 3.2.4.4.

Zur Generierung eines spezifischen Antikörpers, wurde das aufgereinigte und quantifizierte GST-Protein zur Immunisierung von Kaninchen an die Firma Davids-Biotechnology gesendet. Nach der Immunisierung wurde das Serum der Kaninchen zu FACS- und Immunohistochemischen Experimenten verwendet.

3.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

3.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

DMEM-Kulturmedium: DMEM; 10% FCS

RPMI-Kulturmedium: RPMI 1640, 2mM Glutamin; 2% Penicillin/Streptomycin-Lösung;10% FCS

Zytokin: murines IL-3

Alle Zelllinien werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Die adhärenenten Zelllinien NIH3T3 und Phoenix E werden in DMEM-Kulturmedium in liegenden Zellkulturflaschen kultiviert. Bei 90%-iger Konfluenz werden die Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung durch enzymatischen Abbau vom Boden abgelöst. Dazu wäscht man die Zellen vorsichtig mit sterilem PBS, versetzt sie anschließend mit einigen Tropfen der Trypsin/EDTA-Lösung und inkubiert die Zellen 1-5 min bei 37°C. Die Inkubationszeit sollte nicht überschritten werden, da die Zellen sonst durch Anverdau der Zellmembran Schaden nehmen können. Nach sichtbarem Ablösen der Zellen werden diese mit Medium abgespült und 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Durch das im Medium enthaltene FCS und die Verdünnung wird das Trypsin inaktiviert. Danach werden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt. NIH3T3-Zellen werden auf diese Weise alle 4-6 Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Da Phoenix E-Zellen sehr empfindlich auf zu geringe und zu hohe Zelldichte reagieren, müssen diese jeden Tag auf die Hälfte verdünnt werden.

Die Suspensionszelllinien Ba/F3, als auch die humanen Lymphomzelllinien werden alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Diese Linien wachsen in RPMI-Kulturmedium

in stehenden Zellkulturflaschen. Lediglich BaF/3 benötigen als Wachstumsfaktor 0,2 ng/ml murines IL-3.

3.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium (2-fach): 20% DMSO; 80% FCS

Zellen können zur dauerhaften Lagerung tiefgefroren werden. Bei Bedarf werden die Dauerkulturen wieder aufgetaut und weiterkultiviert.

Von einer dichten Zellsuspension wird 1 ml entnommen, in einem Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen Einfriermedium vermischt und sofort bei -80°C eingefroren. Für längere Lagerung können die Zellen nach 12 h in flüssigen Stickstoff überführt werden.

3.2.3.3 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem flüssigen Stickstoff wird dieses sofort in ein 37°C -Wasserbad überführt und die Zellen darin aufgetaut. Die Zellsuspension wird vorsichtig in Kulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation wird das enthaltene DMSO entfernt. Für die Kultivierung werden die Zellen anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen werden diese mit Trypanblau inkubiert und in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopiert. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und erscheinen im mikroskopischen Bild hell, während tote Zellen und Zelltrümmer mit Trypanblau tiefblau gefärbt werden.

Gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0,5%-igen Trypanblaulösung werden gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden 4 Großquadrate ausgezählt, wobei man nur vitale, nicht angefärbte Zellen berücksichtigt. Die Zellkonzentration (Zellzahl pro ml Zellsuspension) wird ermittelt, indem man die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert.

3.2.3.5 Methoden zur Einbringung von Fremd-DNA in Zellen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen, wie beispielsweise die liposomale Transfektion (Lipofektion), die Elektroporation oder die

retrovirale Transduktion. Die jeweils verwendete Transfektionsmethode ist sowohl von der zu transfizierenden Zelllinie, als auch von deren weiteren Verwendung abhängig. So eignet sich die Lipofektion (siehe 3.2.3.5.1), um Plasmid-DNA transient, d.h. vorübergehend, in adhärenente Zellen einzubringen, während Suspensionszellen effizienter durch Elektroporation (siehe 3.2.3.5.2) transfiziert werden können. Um ohne Selektion eine stabile Integration der DNA in das Zellgenom zu erreichen, transduziert man die Zielzellen retroviral (siehe 3.2.3.5.3.).

3.2.3.5.1 Lipofektion adhärenenter Zellen

Lipofectamine™ 2000

Opti-MEM®I, Serum reduziertes Medium

Bei der Lipofektion verwendet man kationische Lipide, um die negativ geladenen DNA-Moleküle zu binden und in die Zellen einzuschleusen. Die Komplexe verschmelzen mit der lipophilen Zellmembran oder werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen.

Lipofectamine™ 2000 wird für die Transfektion der Virus-Produktions-Zelllinie Phoenix E verwendet. Dafür werden die Zellen am Vorabend so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 90-95% aufweisen. Auf einer 60 mm Kulturschale plattiert man 2×10^6 Phoenix E Zellen aus und kultiviert diese über Nacht. Die hohe Dichte ist vor allem dann notwendig, wenn Retrovirus generiert werden soll. Für die Transfektion einer 60 mm Platte werden jeweils 500 µl Opti-MEM®I mit 20 µl Lipofectamine™ 2000 in einem Reaktionsgefäß und mit 10 µg Plasmid-DNA in einem anderen Reaktionsgefäß gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Ansätze werden miteinander vermischt und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das Medium auf den Zellen gewechselt, indem man das alte Medium absaugt und durch 3 ml frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt. Anschließend wird der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. Für proteinbiochemische Untersuchungen können die Zellen 24-48 h nach der Transfektion geerntet und weiterverarbeitet oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert werden. Für die Gewinnung von Retroviren muss das Transfektionsmedium nach 24 h gewechselt werden und die Zellen werden weiter in Kultur gehalten.

3.2.3.5.2 Elektroporation

Elektroporationsmedium: RPMI 1640; 25% FCS

Bei der Elektroporation werden Zellen in einer DNA-haltigen Lösung einem kurzen Stromstoß

ausgesetzt, der für eine kurze Zeit in der Cytoplasmamembran Poren erzeugt^{112,113}. Durch diese Poren kann Plasmid-DNA sowohl passiv durch Diffusion als auch elektrophoretisch in die Zelle gelangen¹¹⁴.

Die in Suspension wachsenden Zelllinien Ba/F3 und Lymphomzelllinien werden durch Elektroporation und anschließende Selektion stabil mit Plasmid-DNA transfiziert. Dafür werden 5×10^6 exponentiell wachsende Zellen aus der Kultur entnommen, bei 1200 Upm 5 min zentrifugiert und in 400 μ l Elektroporationsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine Biorad-Elektroporationsküvette (0,4 cm) überführt und mit 20 μ g Plasmid-DNA versetzt. Anschließend werden die Zellen zweimal bei 400 Volt und 950 μ F für 5 msec elektroporiert. Für die Weiterkultivierung überführt man die Zellen in 5 ml RPMI-Kulturmedium mit IL-3. Nach 48 h wird mit der Selektion begonnen. Bei Verwendung des Vektors pcDNA 3.1/Zeo (+) kann diese mit 0,5 mg/ml Zeocin erfolgen. Da das Plasmid MSCV MigRI kein Resistenzgen für die Selektion in eukaryotischen Zellen enthält, können MigRI elektroporierte Zellen nur durch durchflußzytometrisches Sortieren (FACSort) der EGFP-positiven Zellen oder Faktorentzug selektioniert werden. Proliferation und Überleben der murinen Zelllinien Ba/F3 ist abhängig von IL-3. Wird den Zellen das Zytokin entzogen, gehen diese in Apoptose¹¹⁵. Onkogene sind in der Lage, diese Zelllinien zur IL-3-Unabhängigkeit zu transformieren. Somit können Zellen, welche erfolgreich mit einem Onkogen transfiziert wurden, von nicht transfizierten Zellen durch Faktorentzug getrennt werden.

3.2.3.5.3 Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion

Das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen mit Hilfe von Retroviren wird als retrovirale Transduktion bezeichnet. Retroviren sind in der Lage, ihr einzelsträngiges RNA-Genom nach Infektion einer Zielzelle in komplementäre doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Das virale Hüllprotein (*envelope*) besteht aus einem Transmembranprotein und einem Oberflächenprotein, welches spezifisch mit dem Virusrezeptor an der Oberfläche der Zielzelle interagiert und somit die Virusaufnahme vermittelt. Die Anwesenheit eines geeigneten Rezeptors auf der Zielzelle legt fest, ob die Zelle von dem Virus infiziert werden kann. Das ecotrope Oberflächenprotein interagiert mit einem Aminosäure-Transporterprotein, das nur von Mauszellen exprimiert wird¹¹⁶, was bedingt, dass durch Viruspartikel mit ecotropem Hüllprotein nur murine Zellen transduziert werden können. Die Virusverpackungszelllinie Phoenix E trägt ein retrovirales Provirus, das die für die viralen Proteine kodierenden Gene enthält. Transfiziert man diese Zellen mit

einem retroviralen Vektor, der neben dem zu transduzierenden Gen das Verpackungssignal ψ enthält, produzieren die Zellen retrovirale Partikel, die in das Kulturmedium sezerniert werden.

Um Retrovirus zu generieren, werden Phoenix E-Zellen, transfiziert. 24 h nach der Lipofektion wird das Transfektionsmedium abgenommen und durch 3 ml DMEM-Kulturmedium ersetzt. Der retrovirale Überstand wird 36 und 48 h nach der Transfektion gesammelt, filtriert (0,45 μm) und bei 4°C gelagert. Da die Hüllproteine ecotroper Viren sehr empfindlich gegenüber mechanischer und thermischer Belastung sind, sollte der retrovirale Überstand nicht erwärmt oder eingefroren werden. Der Virustiter kann wie in Kapitel 3.2.3.8 beschrieben bestimmt werden. Die Transduktion von murinen Zielzellen durch Retrovirus erfolgt durch Inkubation der Zellen mit retroviralem Überstand, welchem zuvor 4 $\mu\text{g/ml}$ Polybren zugesetzt wurde. Das Polykation Polybren verbessert die Interaktion zwischen viralem Oberflächenprotein und zellulärem Virusrezeptor, wodurch eine höhere Transduktionseffizienz erzielt wird^{117,118}. Die Transduktionseffizienz kann nach zwei Tagen durchflusszytometrisch bestimmt werden (siehe 3.2.3.7.).

3.2.3.6 Selektion der Virusverpackungszelllinie

Wie bereits beschrieben, trägt die Verpackungszelllinie Phoenix E ein retrovirales Provirus und stellt somit die viralen Strukturproteine und Enzyme zur Verfügung. Werden die Zellen über längere Zeit kultiviert, kann das zum Verlust des Provirus führen, wodurch die Verpackungseffizienz geringer wird. Die proviralen Gene beinhalten als Selektionsmarker Resistenz vermittelnde Gene für Hygromycin und Diphtherietoxin. Um eine Verringerung des retroviralen Titers zu vermeiden, wird die Zelllinie regelmäßig selektioniert. Dazu werden die Zellen nach 4-6 Wochen Kultur eine Woche unter Zusatz von 300 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin und 2 $\mu\text{g/ml}$ Diphtherietoxin zum DMEM-Kulturmedium kultiviert.

3.2.3.7 Durchflusszytometrische Messung der EGFP-Expression (FACS-Analyse)

Die Transfektionseffizienz kann durchflusszytometrisch bestimmt werden, wenn der zur Transfektion verwendete Vektor für ein fluorochromes Protein kodiert. Bicistronische Vektoren tragen neben dem zu untersuchenden Gen ein zweites Gen, das z.B. für ein Fluorochrom kodiert. Bei dem verwendeten Plasmid MSCV MigRI handelt es sich hierbei um das für das grün fluoreszierende Protein EGFP kodierende Gen. Zwischen den Genen befindet sich die Sequenz für eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES). Beide Gene

werden zu einer gemeinsamen mRNA transkribiert. Von diesem Transkript erfolgt die parallele Translation der beiden Gene zu einzelnen Proteinen, wobei die IRES die Translation des zweiten Gens vermittelt. Somit exprimieren alle erfolgreich transfizierten Zellen zusätzlich EGFP und können darüber im Durchflusszytometer (FACScan) detektiert werden.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, dass die Elektronen der Fluorochrome, angeregt durch einen Argon-Laser, auf ein höheres Energieniveau gehoben werden und unter Abgabe von Energie in Form von Licht spezifischer Wellenlänge auf ihr Ursprungsniveau zurückfallen. Die Zellen fließen einzeln in einem Trägerstrom durch ein Rohr, wobei das emittierte Licht von einem Detektor erfasst wird. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Menge des Fluorochroms. Somit können auch Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens gezogen werden. Zusätzlich werden über die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (im „Forward-Scatter“, FS) und die Granularität der Zelle (im „Sideward-Scatter“; SS) gewonnen.

Um den Anteil der EGFP-positiven Zellen nach Lipofektion, Elektroporation oder retroviraler Transduktion zu bestimmen, werden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in PBS aufgenommen, durch ein Zellsieb ($40 \mu\text{m}$) pipettiert und im Durchflusszytometer gemessen. Der Anteil der EGFP-positiven Zellen wird nach der Messung als Punktwolkendiagramm oder Histogramm dargestellt.

3.2.3.8 Titerbestimmung

Der Virustiter im Überstand der Virusverpackungszelllinie Phoenix E wird mittels standardisierter retroviraler Transduktion der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 bestimmt. Dazu werden für jeden zu titrierenden Überstand drei Schalen einer 6-Schalen-Zellkulturplatte mit jeweils $2,5 \times 10^4$ NIH3T3-Zellen beschickt. Nach der durchschnittlichen Verdopplungszeit der Fibroblasten (ca. 14 h) erfolgt die Titerbestimmung in einer Verdünnungsreihe. Der retrovirale Überstand wird im Verhältnis von 1:20, 1:200 und 1:500 mit $4 \mu\text{g/ml}$ Polybren-haltigem DMEM-Kulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 48-72 h wird die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt. Die Berechnung der Einzeltiter (infektiöse retrovirale Partikel pro ml) erfolgt durch Multiplikation von 5×10^4 (Zellzahl bei Infektion) mit dem Verdünnungsfaktor (20, 200 oder 500) und dem prozentualen Anteil der EGFP-positiven Zellen der jeweiligen Verdünnungsstufe. Der Virustiter (CFU/ ml, *colony forming units*/ ml, infektiöse retrovirale Partikel/ ml) entspricht dem Mittelwert der drei unabhängig ermittelten Einzeltiter.

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1 Herstellung von Zellysaten

Lysis-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/ 10 ml A.d

SDS-Probenpuffer: 1 M Tris/HCl, pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycin in A.d. (2xfach)

Nach Zentrifugation der zu lysierenden Zellen wird das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Herstellung von Zellysaten wird das Sediment in frisch hergestelltem, eiskaltem Lysis-Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (14.000 Upm, 20 min, 4°C) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wird die Lösung 10 min bei 95°C gekocht. Nach kurzer Zentrifugation kann das Proteingemisch durch SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.4.3) aufgetrennt werden. Alternativ dazu können vor Zugabe des Probenpuffers durch Immunpräzipitation (siehe 3.2.4.2) einzelne Proteine aus dem Lysat isoliert werden.

3.2.4.2 Immunpräzipitation

Lysis-Puffer

Protein A-Sepharose-Lösung/ Protein G PLUS- Agarose

Spezifische Antikörper

SDS-Probenpuffer (2-fach)

Durch Immunpräzipitation können einzelne Proteine aus einem Zellysat isoliert werden. Dabei bindet ein spezifischer Antikörper ein Antigen des zu präzipitierenden Proteins. Die Präzipitation erfolgt durch Adsorption des Antikörper-Protein-Konjugats an Sepharose-gekoppeltes Protein A bzw. Agarose-gekoppeltes Protein G (Protein A/G-Beads). Aufgrund der Masse der Sepharose/Agarose lassen sich die Komplexe durch Zentrifugation aus dem Lysat separieren.

Die Zellen werden wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben in 1 ml Lysispuffer lysiert und zur Abtrennung der Zelltrümmer 20 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 20 µl Protein A/G-Beads versetzt und 30 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert, um unspezifisch an Protein A/G bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Die Beads werden bei 14.000 Upm abzentrifugiert und verworfen. Der verbleibende Überstand wird mit 2 µg des spezifischen Antikörpers versetzt und bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert. Als

Negativ-Kontrolle kann die Hälfte des Lysats mit der gleichen Menge eines unspezifischen Antiserums gleichermaßen behandelt werden. Anschließend werden die Lysate mit 30 µl Protein A/G-Lösung bei 4°C 30 min auf dem Rollrad inkubiert. Die gebundenen Immunkomplexe werden 2 min bei 14.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und dreimal mit jeweils 500 µl Lysis-Puffer gewaschen. Das verbleibende Sediment wird mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt, um die präzipitierten Proteine zu denaturieren und sie von den *Beads* abzulösen. Nach kurzer Zentrifugation können die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese weiterverarbeitet werden.

3.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

Sammelgel: 5% Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS in A.d.

Die Wandergeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld hängt von ihrer Größe, Form und elektrischen Ladung ab. Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese (SDS-DISK-PAGE) werden die Proteine bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer denaturiert und durch den Zusatz des anionischen Detergens SDS die Eigenladung der Proteine dahingehend verändert, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen¹¹⁹. Niedermolekulare Thiole bewirken eine Reduktion der Disulfidbrücken in den Polypeptiden. Somit werden Proteine bei der SDS-PAGE ausschließlich nach ihrer molaren Masse aufgetrennt. Im diskontinuierlichen System passieren sie zunächst das Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und des Sammelgels bewirkt eine Fokussierung des Proteingemisches im Sammelgel. Beim Einwandern der Proteine in das Trenngel, das eine geringere Porengröße und einen höheren pH-Wert als das Sammelgel besitzt, werden die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt. Der Auftrennungsbereich der Proteine kann durch Variation der Trenngelporengröße, also durch variierende Polyacrylamid-Konzentration (5-15%), festgelegt werden.

Für die Herstellung eines Polyacrylamidgels wird das Trenngel je nach gewünschter Auftrennung der Proteine mit 5-15% Polyacrylamid-Lösung angesetzt, luftblasenfrei in die Gelvorrichtung gegossen und mit etwa 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels, wird das Methanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Probestaschen eingesetzt. Nachdem das Sammelgel

polymerisiert ist, wird der Kamm entfernt und das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend wird die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die vorbereiteten hitzedenaturierten Proteine (aus den Kapiteln 3.2.4.1 und 3.2.4.2) werden in die Probestaschen gefüllt und durch Anlegen einer Spannung (25-120 Volt) aufgetrennt. Ein Molekulargewichtsmarker, der aus farbstoffmarkierten Proteinen definierten Molekulargewichts besteht, wird zum Molekulargewichtvergleich auf einer Spur des Gels aufgetragen. Nach dem Lauf wird das Gel aus der Kammer entnommen und die Proteine werden, wie in Kapitel 3.2.4.5 beschrieben, auf eine PVDF-Membran transferiert.

3.2.4.4 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Coomassie-Färbelösung: 0,25% Brilliant Blau; 45% Methanol; 10% Essigsäure in A.d.

Coomassie-Entfärbelösung: 45% Methanol; 10% Essigsäure in A.d.

Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der Proteine unspezifisch anfärbt. Dabei lagert sich der Farbstoff an basische Aminosäuren an. Proteine werden im SDS Gel aufgetrennt und darin nachgewiesen, indem das Gel für 30 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend so lange in Entfärbelösung inkubiert wird, bis die Proteinbanden klar erkennbar sind.

3.2.4.5 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol in A.d.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran unter Verwendung des „Wet-Blot“-Verfahrens. Die zugeschnittene PVDF-Membran wird mit Methanol benetzt und in Transferpuffer überführt. Das SDS-Gel wird in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale luftblasenfrei auf die Membran gelegt und zwischen zwei Schichten Cellulosefilterkarton (*Whatman-Paper*) eingespannt. Anschließend werden die Schichten entsprechend der Polung der Apparatur (Membran zur Anode, Gel zur Kathode weisend) in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt unter ständiger Kühlung bei konstantem Stromfluss (1000 mA). Die Dauer des Transfers ist abhängig von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine.

3.2.4.6 Immunchemischer Nachweis von transferierten Proteinen

PBS-Tween-(PBST)-Puffer: 0,1% Tween 20 in PBS

Blockier-Puffer: 10% Trockenmilchpulver (entfettet) in PBS-Tween-Puffer; 5% BSA in PBS-Tween-Puffer

Bei der Immunfärbung werden Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert und mittels eines Chemolumineszenz-Systems nachgewiesen. Dazu wird die Membran unmittelbar nach dem Transfer in PBST-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C in Blockier-Puffer inkubiert. Das Blockieren dient dazu, überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Da einige Milchproteine in phosphorylierter Form vorliegen und somit eine Reaktion mit phosphospezifischen Antikörpern eingehen können, wird bei Detektion phosphorylierter Proteine Blockier-Puffer mit BSA verwendet. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird entsprechend der Angaben des Herstellers in Blockier-Puffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgt innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Nach Inkubation mit Primärantikörper wird die Membran dreimal 10 min mit PBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend inkubiert man die Membran bei Raumtemperatur mit einem gegen die schwere und leichte Kette des Primärantikörpers gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine weitere Stunde. Die Membran wird daraufhin zweimal mit PBST-Puffer sowie einmal mit PBS gewaschen und zur Detektion mit Chemolumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert. Das Substrat wird durch die Peroxidase zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt. Das erzeugte Signal wird auf einen Hyperfilm übertragen und dokumentiert.

3.2.4.7 Entfernen gebundener Antikörper von der Membran

Amidoschwarz-Entfärbelösung: 10 % Essigsäure; 10 % Methanol in A.d.

Um die an eine Membran gebundenen Antikörper zu entfernen, wird die Membran zweimal 15 min mit Amidoschwarz-Entfärbelösung schüttelnd inkubiert und anschließend mit A.d. gewaschen. Eine auf diese Weise behandelte Membran kann erneut, wie in Kapitel 3.2.4.5 beschrieben, geblockt und mit Antikörper inkubiert werden.

3.2.5 Biologische Untersuchungen

3.2.5.1 Messung der proliferativen Aktivität

Über eine Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen kann die Proliferation von Zellen quantitativ bestimmt werden. Das gelbe Substrat MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazoliumsalz) wird von metabolisch aktiven Zellen zu einem braunen Formazan reduziert, dessen Absorptionsmaximum bei 490 nm liegt. Die durch Absorptionsmessung bei 490 nm bestimmte Menge des Produkts ist direkt proportional zur Anzahl der proliferierenden Zellen.

Die Messung der proliferativen Aktivität erfolgt nach der Vorschrift des „CellTiter®Aqueous Cell Proliferation Assay“-Systems. Dazu werden die Zellen in Flachboden-96-Loch-Mikrotitrerrplatten in einem Volumen von 100 µl pro Kavität kultiviert. Die Zellzahl pro Loch ist abhängig von der eingesetzten Zelllinie und der Dauer der Messung. Für jeden Messzeitpunkt wird eine Platte angesetzt. Der Leerwert wird in Kavitäten bestimmt, die nur mit Medium ohne Zellen beschickt sind. Um die proliferative Aktivität der Zellen zu messen, werden zum jeweiligen Messzeitpunkt 40 µl MTS (10 mg/ml) pro Loch zugegeben und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 490 nm gemessen.

3.2.6 Tiermodell

3.2.6.1 Präparation von Knochenmarkzellen aus Spendermäusen

Basales Knochenmarksmedium (BBMM): 325 ml IMDM; 150 ml FCS; 25 ml BSA (10% in IMDM);
5 ml L-Glutamin-Lösung (200mM); 100µM 2-Mercaptoethanol;
2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung

Zur Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark männlicher C57bl6-Mäuse, wird diesen 5-Fluorouracil (150 mg/kg) intravenös verabreicht ¹²⁰. Nach 4 Tagen werden die Spendermäuse durch zervikale Dislokation getötet und Femur und Tibia beider Beine chirurgisch entnommen. Anschließend wird das Knochenmark mit BBMM unter Verwendung einer Injektionskanüle (27G 3/4) aus den Knochen gespült und durch ein Zellsieb der Porenweite 100 µm pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zentrifugation erfolgt bei 1000 Upm für 6 min.

3.2.6.2 Prästimulation von murinen Knochenmarkzellen

Prästimulationsmedium: BBMM; 10 ng/ml mL-3; 12 ng/ml mL-6; 50 ng/ml mSCF

Retrovirale Transduktion ist ausschließlich bei sich teilenden Zellen möglich. Deshalb ist es notwendig, die Knochenmarkzellen vor der Infektion zu stimulieren. Dazu werden diese direkt nach der Präparation in Prästimulationsmedium aufgenommen und ca. 20 h bei 37°C kultiviert.

3.2.6.3 Retrovirale Transduktion der Knochenmarkzellen

Vor Infektion der Knochenmarkzellen wird der durch Transfektion der Virusverpackungszelllinie Phoenix E gewonnene retrovirale Überstand titriert. Für die Knochenmarkinfektion eignen sich retrovirale Überstände, deren Virustiter über 1×10^5 CFU/ml liegt. Der retrovirale Gentransfer in die Knochenmarkzellen wird mit Hilfe der „Spin“-Infektion durchgeführt. Bei dieser Methode werden die prästimulierten Zellen nach Zentrifugation in BBMM (1/4 des Gesamtvolumens) aufgenommen und die Zellsuspension mit retroviralem Überstand (3/4 des Gesamtvolumens) vermischt. Nach Supplementierung des Gemisches mit 10 ng/ml mL-3, 12 ng/ml mL-6, 50 ng/ml mSCF und 4 µg/ml Polybren wird der Infektionsansatz in eine 12-Schalen-Mikrotitrierplatte verteilt und diese bei 1200 x g und 32°C 90 min zentrifugiert („Spin“-Infektion). Anschließend werden die Zellen bei den üblichen Bedingungen weiterkultiviert. Die „Spin“-Infektion wird insgesamt viermal im Abstand von 12 h durchgeführt, wobei vor jedem Zentrifugationsschritt Medium, retroviraler Überstand und Supplemente erneuert werden. Nach weiterer 12-stündiger Inkubation bei 37°C werden die Zellen zentrifugiert, in HBSS resuspendiert und transplantiert (siehe 3.2.6.4.). Vor Transplantation der Empfängermäuse mit den transduzierten Zellen, wird der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.2.6.8.).

3.2.6.4 Knochenmarktransplantation

Die 6 - 8 Wochen alten, weiblichen C57Bl6- Empfängermäuse werden vor der Knochenmarktransplantation mit einer Dosis von 850 rad (8,5 Gy) letal bestrahlt. Durch diese myeloablative Bestrahlung ist gewährleistet, dass deren Hämatopoese nach der Transplantation ausschließlich von den Spenderzellen ausgeht. Die Transplantation erfolgt durch intravenöse Injektion der Knochenmarkzellen in die Schwanzvene der Mäuse. Um eine Rekonstitution der Tiere zu erreichen, sollte eine Mindestanzahl von 200.000

Knochenmarkszellen pro Maus transplantiert werden. Eine Rekonstitution der letal bestrahlten, transplantierten Mäuse ist nach etwa 10 Tagen zu erwarten.

3.2.6.5 Überwachung der transplantierten Mäuse

Um die Entwicklung einer hämatologischen Erkrankung zu erkennen und den Verlauf einer solchen zu überwachen, wird ab dem Zeitpunkt der Rekonstitution in regelmäßigen Abständen peripheres Blut aus der Schwanzvene abgenommen und analysiert.

Ein Blutbild wird aus 20 µl peripherem Blut erstellt. Um Gerinnung zu verhindern, entnimmt man das Blut mit einer EDTA-beschichteten Kapillare. Zur Analyse wird es in das Blutbildgerät (VetABC-Blood-Counter) überführt. Ein Tropfen peripheres Blut wird verwendet, um einen Blutausstrich anzufertigen. Hierbei wird das Blut auf die untere Hälfte eines Glasobjektträgers getropft und mit der Kante eines zweiten Trägers ausgestrichen. Für Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop werden die Ausstriche direkt nach Anfertigung verwendet. Lichtmikroskopische Untersuchungen werden nach Pappenheimfärbung durchgeführt. Die Blutausstriche wurden freundlicherweise vom „Hämatologischen Routinelabor“ gefärbt.

Für eine durchflusszytometrische Immunphänotypisierung des peripheren Bluts werden 100-200 µl Blut in ein EDTA-gefülltes Röhrchen abgenommen und die Erythrozyten durch hypotone Lyse entfernt (siehe 3.2.6.6.).

3.2.6.6 Hypotone Lyse von Erythrozyten

RBC (Red Blood Cell)-Puffer: 150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA, pH7.3 in A.d.

Das frisch entnommene periphere Blut wird im zehnfachen Volumen RBC-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Durch den hypotonen Puffer schwellen die Erythrozyten an und lysieren. Nach Zentrifugation (1000 Upm, 8 min) wird der Überstand verworfen und das Sediment, das die Leukozyten enthält, mit PBS gewaschen.

3.2.6.7 Aufbereitung von Organen transplantiertter Mäuse

Nach Versterben der Mäuse infolge einer hämatologischen Erkrankung, werden diese auf pathologische Veränderungen der Organe untersucht. Nach Eröffnen von Abdomen und Thorax erfolgt eine Splenektomie und das Entfernen von Femur und Tibia. Falls weitere Organe (Thymus, Lymphknoten, etc.) pathologisch vergrößert sind oder sich Tumoren gebildet haben, werden auch diese entnommen. Alle Gewebe und Organe werden gewogen

und vermessen und bis zur weiteren Verarbeitung in HBSS aufbewahrt. Die Knochenmarkzellen werden, wie in Kapitel 3.2.6.1 beschrieben, gewonnen. Von allen Organen wird ein kleiner Teil zur späteren histologischen Untersuchung in Formaldehyd-Lösung (4% in PBS) konserviert. Der Rest wird mit einem Skalpell zerkleinert und zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen durch ein 100 µm Zellsieb gespült. Ein Teil der so gewonnenen Zellen wird durchflusszytometrisch immunphänotypisiert, während die verbleibenden Zellen für spätere Analytik viabel kryokonserviert werden (siehe 3.2.3.2.).

3.2.6.8 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen

FACS-Puffer: 0,1% BSA in PBS

Bei der Immunphänotypisierung werden zellspezifische Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten spezifischen Antikörpern markiert und in einem Durchflusszytometer analysiert. Da die Antikörper spezifische Antigene erkennen, ist die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Antigendichte auf der jeweiligen Zelle. Durch Kombination mehrerer mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelter Antikörper können molekularbiologische Klassifizierungen vorgenommen werden.

Zur Phänotypisierung werden die aufgearbeiteten Zellen (z.B. aus dem Kapitel 3.2.6.7) in FACS-Puffer aufgenommen und in eine 96-Loch-Mikrotitrationsplatte verteilt. Pro spezifischem Antikörper und Zellart verwendet man eine Vertiefung. Das Volumen pro Kavität beträgt 200 µl, bei einer Zellzahl von 100.000. Die Fc-Block™-Lösung und alle Antikörperlösungen werden im Verhältnis von 1:10 mit FACS-Puffer verdünnt eingesetzt. Jedem Loch werden zum Maskieren unspezifischer Bindungsstellen 3 µl Fc-Block™-Lösung zugesetzt. Nach Zugabe von 3 µl des CyChrome™-gekoppelten CD45-Panleukozytenmarkers pipettiert man jeweils 3 µl der Phycoerythrin (PE)-gekoppelten, spezifischen Antikörper zu. Der Ansatz inkubiert unter Ausschluss von Licht mindestens 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Platte bei 4°C und 1450 Upm 5 min zentrifugiert, und die Zellen werden dreimal mit jeweils 200 µl FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen werden in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Vor der Analyse im Durchflusszytometer wird jedem Ansatz 1 µg/ml Propidiumiodid zugesetzt, um den Ausschluss toter Zellen in der Auswertung zu ermöglichen.

Die Auswertung erfolgt wie in Abb. 4) schematisch dargestellt.

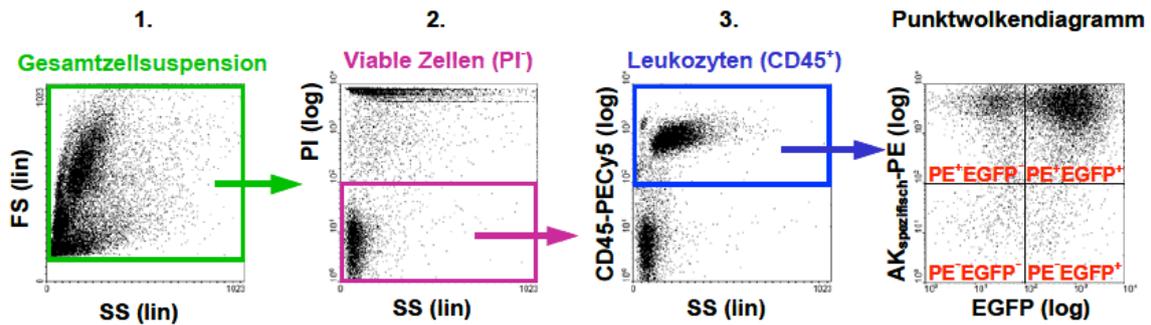


Abb. 4) Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen

Zur Generierung der Punktwolkendiagramme mit Auftragung der EGFP-Expression auf der X- und PE-Fluoreszenz auf der Y-Achse durchlaufen die Zellen folgende Ausschlusskriterien: 1.) Die Gesamtzellsuspension geht in die Analyse von Größe (Forward Scatter; FS) und Granularität (Sideward Scatter; SC) ein. Dort werden Zelldubletten und -trümmer ausgeschlossen. 2.) Tote Zellen verlieren ihre Membranintegrität und können deshalb mit Propidiumiodid (PI) gefärbt werden. Im zweiten Schritt werden nur die viablen Zellen, welche keine PI-Fluoreszenz zeigen ausgewählt (rosa). 3.) In die eigentliche Analyse gehen letztendlich nur die Leukozyten ein. Dazu werden die Zellen mit dem CyChrome™-gekoppelten Panleukozytenmarker (anti CD45) gefärbt. Anschließend werden die hämatopoetischen Zellen in einem Punktwolkendiagramm analysiert. Zellen die positiv für einen PE-gekoppelten Antikörper sind befinden sich im oberen linken Quadranten. EGFP-positive Zellen akkumulieren im unteren rechten Quadrant. Doppel-positive Zellen finden sich im oberen rechten Abschnitt. Zellen, die für beides negativ sind, im unteren linken Quadrant.

lin: lineare Darstellung; log: logarithmische Darstellung; -: negativ; +: positiv.

Eine Liste der verwendeten FACS-Antikörper findet sich unter 3.1.4. Ein Auszug und die entsprechende Subpopulation, die von dem PE-gekoppelten Antikörper erkannt wird sind in folgender Tabelle:

Verwendeter FACS-Antikörper	Subpopulation
CD45 (30-F11)	Hämatopoetische Zellen
CD4 (L3T4)	Hauptsächlich T-Zellen
CD8a (53-6.7), CD11b (M1/70),	Hauptsächlich T-Zellen Monozyten, Granulozyten
CD30 (mCD30.1) bzw. selbstgeneriert	Aktivierte T-Zellen
B220 (RA3-6B2)	B-Zellen
CD90.2 (53-2.1), Thy-1.2	T-Zellen, natürliche Killerzellen
Gr-1/Ly-6C (RB6-8C5),	Granulozyten

Abb. 5) Liste der verwendeten FACS-Antikörper und die detektierte Subpopulation

3.2.6.9 Xenograft-Modell

Bei einem Xenograft-Modell handelt es sich um eine Transplantation, wobei körperfremde Zellen (Spender gehört zu einer anderen Art) in einen immunsupprimierten Organismus eingebracht werden. Im speziellen werden SCID beige Mäuse, bei welchen eine schwere Schädigung der B- und T-Zell Lymphozytendifferenzierung und –funktion, als auch eine natürliche Killerzellen Defizienz vorliegt mit $5-10 \times 10^6$ Karpas299 Zellen s.c. transplantiert. Dadurch bildet sich unter der Haut ein Tumor, dessen Volumen mit Hilfe einer Schublehre und der Formel: $V = a \times b \times b / 2$ berechnet wird. Wobei a der Länge und b der Breite des Tumors entspricht.

Anschließend werden die unterschiedlichen Mäusegruppen entweder mit dem ALK-Inhibitor (4SC) bzw. einem Placebo behandelt. Hierzu werden 32 mg/kg Körpergewicht i.v. appliziert und parallel dazu das Gewicht der Mäuse gemessen. Kommt es zu einem 25 prozentigen Gewichtsverlust, wird die Behandlung eingestellt, bis wieder das Ausgangsgewicht erreicht ist.

3.2.6.10 Syngene / Serielle Transplantation

Bei einer syngenem bzw. seriellen Transplantation sind der Spender- und der Empfängerorganismus genetisch identisch. Im folgenden werden entweder eine Tumorgewebssuspension oder eine mit einem Onkogen transduzierte Zelllinie in sublethal bestrahlte Mäuse (450 rad) i.v. transplantiert. Es wurden hierzu 250.000 Alk-positive Milzzellen in C57Bl6-Mäuse bzw. 1×10^4 Alk-exprimierende Ba/F3-Zellen in Balb/c-Mäuse injiziert.

3.2.7 Statistische Auswertung

Alle Untersuchungsergebnisse werden auf ihre Signifikanz überprüft. In den Diagrammen ist entweder die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken dargestellt oder es wird die statistische Signifikanz in einem zweiseitigen Student'schen T-Test überprüft. Dabei sind Resultate eindeutig signifikant, wenn $p \leq 0,05$ ist.

4 Ergebnisse

4.1 Bisherige Alk-positive Mausmodelle

Das großzellig-anaplastische Lymphom (ALCL) zeichnet sich vor allem durch seinen CD30-positiven T-Zell- bzw. Null-Zell- Phänotyp aus, bei dem bereits T-Zellrezeptor Rearrangements zu finden sind^{12,13,121}. Bislang konnte kein Mausmodell etabliert werden, welches diese Kriterien erfüllt. Weder die retrovirale Knochenmarksinfektion mit NPM-ALK und anschließende Transplantation^{63,103}, noch die transgene Expression von NPM-ALK unter einem spezifischen Promotoren führte zu einer CD30-positiven T-Zellerkrankung^{104-106,122,123}. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass abhängig vom jeweiligen Virustiter sich unterschiedliche Phänotypen etablieren⁶³. Bei einem geringen Virustiter entwickelte sich, wie zuvor bereits beschrieben, ein plasmazytoider Phänotyp mit einer Latenz von etwa 12 – 16 Wochen. Der Grund hierfür ist jedoch unklar. Bei einem hohen Virustiter erkrankten die Tiere hingegen bereits nach 2 – 4 Wochen (siehe Abb. 6) und zeigten einen histiozytären / myeloiden Phänotyp mit Infiltration des KM, der Milz, der Lymphknoten und anderen extranodalen Organen.

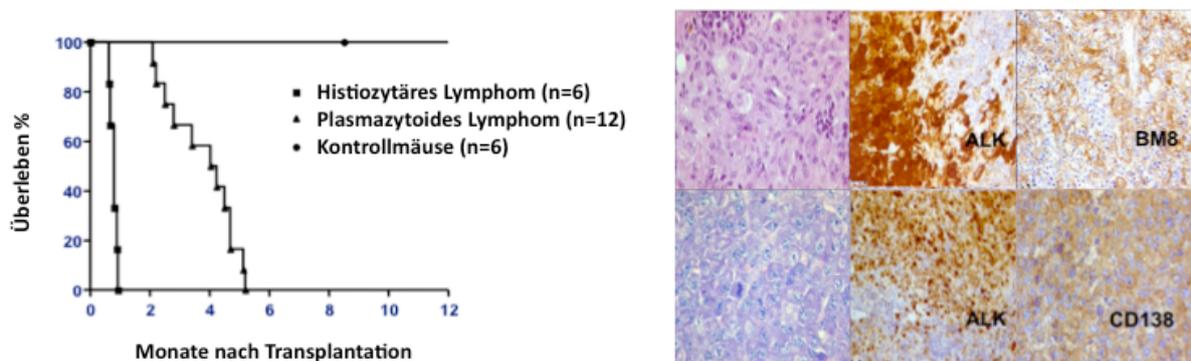


Abb. 6) Kaplan-Meier Überlebenskurve und immunohistochemische Färbungen eines retroviralen Infektions- / Transplantationsmodells mit NPM-ALK

Infektion von murinem KM mit einem hohen viralen Titer führt zu einer raschen Erkrankung der Tiere innerhalb weniger Wochen (links). Phänotypisch zeigen sich histiozytäre bzw. myeloide Lymphome (rechts). ALK: Anaplastische Lymphoma Kinase; BM8: Pan Makrophagen Marker; CD138: Plasmazellen Marker (Miething et al. 2003)

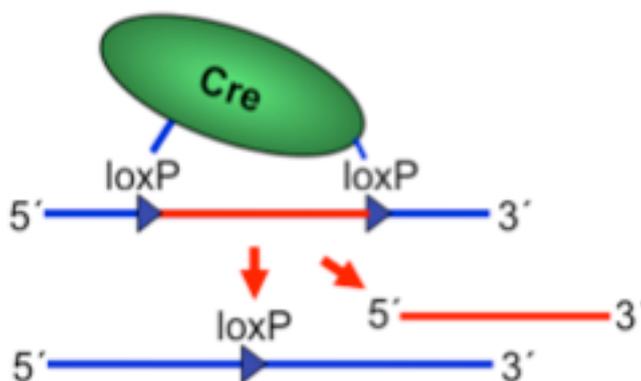
Die Ursache hierfür könnte sein, dass durch den Retrovirus hauptsächlich myeloide Zellen und zu einem geringen Anteil die eigentliche Ursprungszelle der ALCL infiziert wurden, so dass die myeloiden Zellen schneller transformierten und diese Tatsache zu dem

beschriebenen Phänotyp führt. Aber auch bei diesem Modell fehlte die für eine humane ALCL typische Expression von CD30, Perforin, Granzyme B oder T-Zellrezeptoren.

Um aus allen diesen Versuchen eine genaue Wiedergabe der humanen ALCL in einem murinen System zu übertragen, scheint vor allem der Ursprungszelle, also die Zelle in der die Translokation und Expression von NPM-ALK stattfindet, eine entscheidende Bedeutung zu zukommen¹²⁴.

4.2 Das translationale Stopkonstrukt MSCV-Stop-EGFP (MSE)

Um die Expression eines Gens in Abhängigkeit des Zellkontexts kontrollieren zu können, wird in einem murinen LTR-tragenden Expressionsvektor (MSCV) eine von loxP-Stellen flankierte translationale Stopkassette inseriert. Diese Kassette enthält die translationale Abbruchsequenz „tga“ in allen drei Leserastern und garantiert somit eine Termination der Translation unabhängig davon, in welchem Raster die Translation gestartet wird. Der translationale Stop ist auch deshalb von großer Bedeutung, da ein transkriptionaler Stop die Virusproduktion in den Zellen inhibiert und somit keine Viruspartikel produziert werden können¹²⁵. Durch Infektion dieses Vektors in Zellen, welche die Cre-Rekombinase exprimieren, erfolgt eine Rekombination und damit zur Deletion der Stopkassette und somit zur Expression 3'-liegender Gene (Abb. 7).



loxP = homologe Rekombinationsstelle

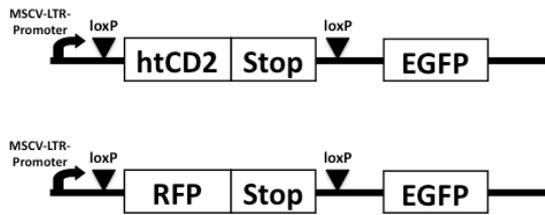
Abb. 7) Das Cre-loxP System

Das Enzym Cre-Rekombinase entstammt ursprünglich dem Bakteriophagen P1. Es erkennt sog. loxP-Stellen im Genom. Die Sequenz zwischen zwei loxP-Stellen wird durch Cre herausgeschnitten und die entstehenden Enden rekombiniert.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde zuerst ein MSCV-Vektor entwickelt, der eine Stopkassette enthält und dem der Fluoreszenzmarker EGFP nachgeschaltet ist (MSE). Eine erfolgreiche Rekombination kann somit durchflusszytometrisch gemessen werden (siehe Abb. 8)). Als Markergene, die die Anwesenheit des Stopkonstruktes nachweisen, wurde zum einen der humane CD2-Rezeptor (htCD2), zum anderen das rot-leuchtende Fluoreszenzgen RFP verwendet (Abb. 8). Beide MSCV-Stop-EGFP (MSE) Konstrukte wurde in NIH3T3/MSCV - bzw. NIH3T3/MSCV-Cre - Zellen transfiziert. Durch die Expression der Cre-Rekombinase wird die translationale Stopkassette deletiert und EGFP exprimiert. Dadurch ergibt sich eine Rechtsverschiebung im FITC-Kanal zwischen NIH3T3-Zellen die kein Cre zu solchen die Cre exprimieren (Abb. 8).

Allerdings konnte dies nur im Zusammenhang mit dem MSE(RFP) Konstrukt gezeigt werden. Es kam in Cre-exprimierenden Zellen zu einer Induktion von über 57% an grünen Zellen. Im Falle des MSE(htCD2) Konstruktes zeigte sich bereits eine EGFP-Expression in Abwesenheit der Cre-Rekombinase (ca. 50%) und signalisiert somit eine unerwünschte Durchlässigkeit der Stopkassette. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass das als Marker verwendete htCD2 wie gewünscht in Cre-neaktiven Zellen exprimiert wird und somit das Vorhandensein der Stopkassette anzeigt (Abb. 8). Interessanterweise konnte dies nicht für den Marker Red Fluorescent Protein gezeigt werden. Dessen Fluoreszenz konnte in Zellen ohne Cre durchflusszytometrisch nicht detektiert werden (Abb. 8). Diese Ergebnisse legen daher nahe, dass neben den drei Stopcodons der Stopkassette noch weitere Mechanismen vorhanden sein müssen, um eine Expression nachgeschalteter Gene zu unterdrücken. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass sich die Faltung der RFP mRNA negativ auf deren Expression auswirkt^{126,127}. Verantwortlich hierfür ist die Konsensus Ribosomenbindungsseite (RBS), die dazu neigt mit sich selbst zu dimerisieren, wodurch es zu einer Basenpaarbindung innerhalb der RBS kommt und die Translation des roten Fluoreszenzproteins (RFP) inhibiert wird. Daher ist stark anzunehmen, dass neben der translationalen Stopkassette noch weitere Mechanismen wichtig für den Abbruch der Translation und der nachgeschalteten Gene sind. Dies würde die Undurchlässigkeit der Stopkassette und die fehlende RFP-Expression in Abwesenheit der Cre-Rekombinase erklären.

a.)



5' - atgctatgtaatggttacgcttcgtatcactgactgactgaggt -3'
 atgctatgtaatggttacgcttcgtatcactgactgactgaggt

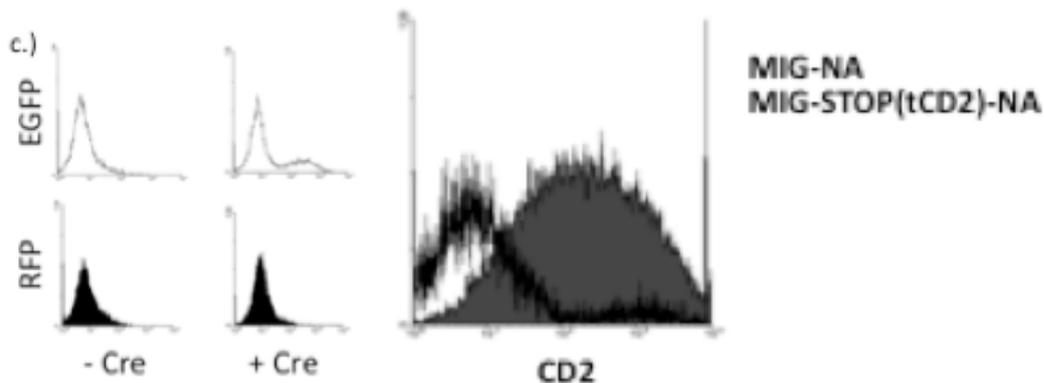
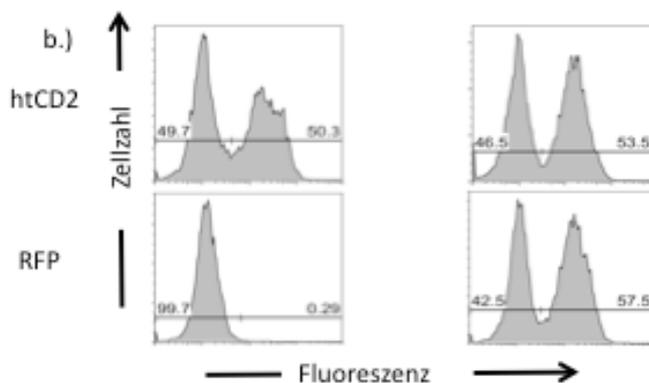


Abb. 8) Das Konstrukt MSCV-Stop-EGFP (MSE)

- Die Stopkassette besteht aus einem Marker, entweder dem trunkierten humanen CD2 (htCD2; oben) oder dem roten Fluoreszenzprotein (RFP; unten), gefolgt vom translationalen Stop, der sich in allen drei reading frames befinden. Die Kassette ist von zwei loxP-Stellen flankiert. Downstream befindet sich das grüne Fluoreszenzprotein EGFP. Die Expression des Konstruktes erfolgt durch den viralen LTR-Promotor.
- NIH3T3 (links) und NIH3T3/MSCV-Cre (rechts) Zellen wurden mit beiden MSE-Vektoren transfiziert. Die Rekombination kann durchflusszytometrisch anhand der EGFP Expression ermittelt werden
- FACS Analyse der NIH3T3 Zellen die mit den MSE-Konstrukten transfiziert wurden. Links: EGFP bzw. RFP-Expression in der An- oder Abwesenheit von Cre. Rechts: Die Expression des htCD2 in MSE transfizierten Zellen.

4.3 Der Stopvektor zur zellspezifischen Expression eines Onkogens – MSNAIE

Anschließend wurde in den Kontrollvektor MSE ein weiteres Gen inseriert. Downstream der Stopkassette wurde das Onkogen NPM-ALK und im Anschluß daran eine IRES-Sequenz gefolgt von EGFP eingefügt (MSNAIE; Abb. 9). Da der Stop translational ist, wird das gesamte Konstrukt zwar transkribiert, jedoch die Translation von NPM-ALK unterdrückt. Die IRES-Sequenz wiederum erlaubt den Eintritt von Ribosomen und es kommt dadurch unabhängig von der Stopkassette zur Expression von EGFP. Dadurch können die positiv infizierten Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden.

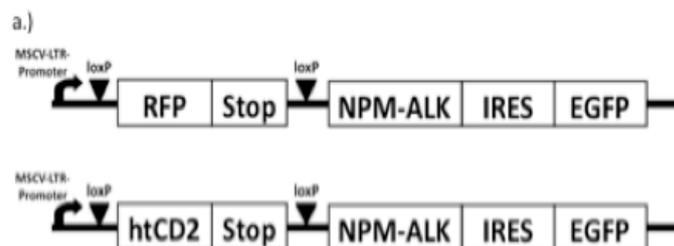
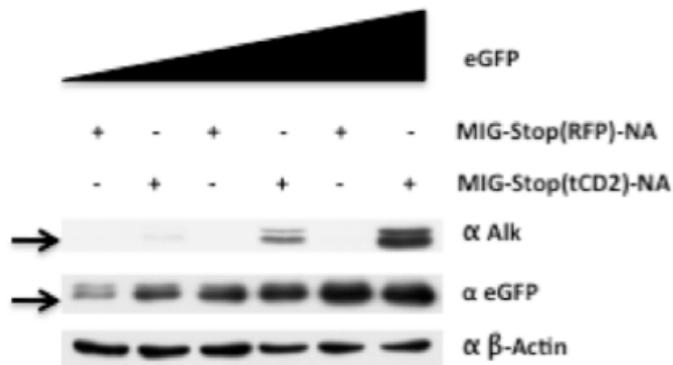


Abb. 9) Das Konstrukt MSCV-Stop-NPM/ALK-IRES-EGFP (MSNAIE)

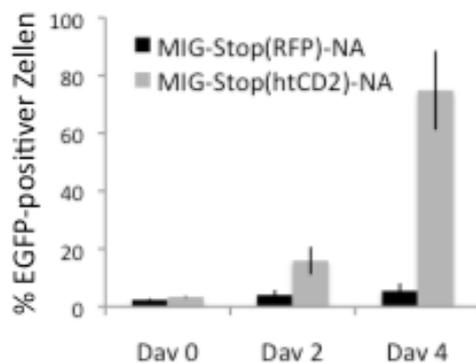
Dem MSNAIE-Vektor wurde zusätzlich noch das Onkogen NPM-ALK zugefügt. Um die EGFP-Expression unabhängig zu steuern wurde eine IRES-Sequenz vorgeschaltet.

Zur Überprüfung der Funktionalität des MSNAIE-Vektors wurde die Pre-B-Zelllinie Ba/F3 mit den zwei unterschiedlichen Konstrukten transfiziert. Dazu wurden steigende Mengen an DNA eingesetzt, um die Stringenz der Stopkassette zu überprüfen. Da die Zellen kein Cre exprimieren, sollte die Stopkassette die Translation des Onkogens NPM-ALK unterdrücken. In Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die mit der RFP kodierenden Kassette transfiziert wurden, keine NPM-ALK Expression aufweisen, auch nicht bei hoher Expression des Konstrukts (erkennbar an der EGFP-Expression). Wohingegen alle Klone der htCD2-positiven Kassette eine NPM-ALK Expression, abhängig von der Transfektionseffizienz, zeigen (Abb. 10) und somit die Durchlässigkeit des htCD2-Konstruktes in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Mengen widerspiegeln.

a.)



b.)



c.)

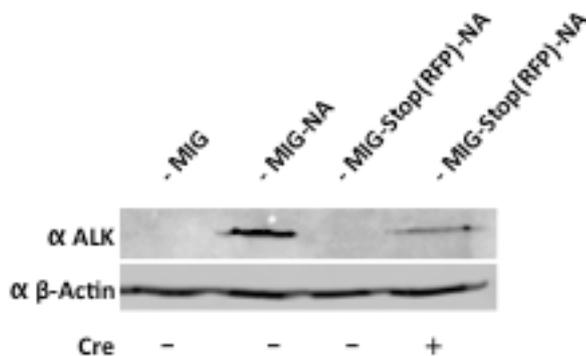


Abb. 10) Funktionalität des MSNAIE-Konstruktes

- ALK- bzw. Aktin Blot von Ba/F3-Zellen, die mit zwei unterschiedlichen Stop-Konstrukten transfiziert wurden. Dabei wurden steigende DNA-Mengen eingesetzt, um die Stringenz der Stopkassette zu überprüfen. Die EGFP-Blots geben die Transfektionseffizienz wieder.
- Durchflusszytometrische Messung der EGFP-Expression der Ba/F3-Zellen direkt nach Infektion mit dem MSNAIE-Vektor und 48h bzw. 96h nach IL-3 Entzug.
- Western Blot von Ba/F3 Zellen, die mit dem MSNAIE (RFP)-Konstrukt und anschließend mit Leervektor oder einem Cre-exprimierenden Vektor transfiziert wurden. Kontrollzellen: Ba/F3 Mig (negativ); Ba/F3 Mig NPM/ALK (positiv)

In einem weiteren Versuch wurden murine Ba/F3-Zellen mit den MSNAIE-Konstrukten infiziert und deren EGFP-Expression im Durchflusszytometer gemessen (Abb. 10). Es wurde 48h und 96h nach IL-3 Entzug erneut gemessen. Da Ba/F3 Zellen IL-3 abhängig sind und NPM-ALK transformierte Zellen ohne Wachstumsfaktoren viabel bleiben, sollte theoretisch die Viabilität der MSNAIE transfizierten Zellen zurückgehen, bei gleichbleibender EGFP-Expression, da keine Selektion ausgeübt wird. Die EGFP-Level der MSNAIE(RFP) transfizierten Zellen bleiben über den gesamten Zeitraum gleich (7%). Daraus lässt sich der Rückschluss ziehen, dass das Onkogen aufgrund der Stopkassette nicht exprimiert wurde und die Stopkassette die Translation erfolgreich unterbrechen konnte. Ganz im Gegensatz zum MSNAIE(htCD2)-Konstrukt. Hier nimmt die EGFP-Expression zu. Demzufolge wird auch in diesen Zellen NPM-ALK exprimiert und der IL-3 Entzug fördert die Transformation der Zellen, was sich entsprechend an der Zunahme der grünen Zellen ablesen lässt. Die Expression des Onkogens kann auch induziert werden (Abb. 10). Hierfür wurden murine Ba/F3-Zellen zuerst mit dem MSNAIE (RFP)-Konstrukt und anschließend mit einem Leervektor (MSCV) oder einem Cre-exprimierenden Vektor transient infiziert. Lediglich in den Cre-positiven Zellen lässt sich im Western Blot NPM-ALK nachweisen. Als Kontrolle dienten parentale ALK-negative Ba/F3-Zellen bzw. Zellen, die NPM-ALK überexprimieren. Aufgrund der vorliegenden Daten wird im folgenden ausschließlich die RFP kodierende Stopkassette verwendet und mit MSNAIE beschrieben.

Zusammengenommen bestätigen die Ergebnisse die Funktionalität der translationalen Stopkassette *in vitro* und machen daher einen Einsatz *in vivo* sinnvoll.

4.4 Das retrovirale Infektions- / Transplantationsmodell

Das murine, retrovirale Infektions- / Transplantationsmodell dient unter anderem zur Untersuchung potenzieller Onkogene *in vivo*. Myeloablativ bestrahlte Mäuse werden mit retroviral transduzierten Knochenmarkszellen transplantiert. Dadurch kann der Einfluss des transduzierten Gens auf die Hämatopoese genauer analysiert werden. In Abb. 11) ist die Vorgehensweise dieser Transplantation schematisch dargestellt. Retroviren, die die Information des zu transduzierenden Gens tragen, werden mit Hilfe der Phoenix E Zelllinie erzeugt.

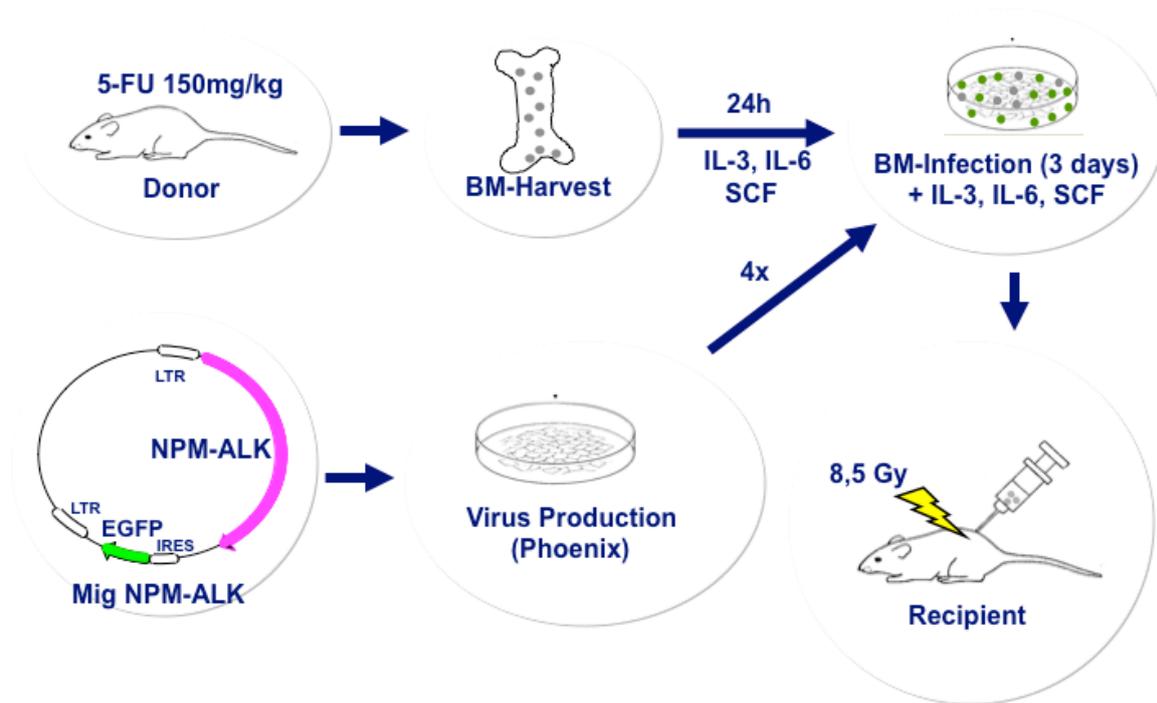


Abb. 11) Schematische Darstellung des retroviralen Infektions- / Transplantationsmodells

Der bicistronische Vektor MSCV MigRI enthält neben dem zu untersuchenden Gen ein zweites Gen, welches z.B. für ein fluorochromes Protein kodiert. Hierbei handelt es sich um das grün fluoreszierende Protein EGFP. Dazwischen befindet sich eine Sequenz für die interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES; internal ribosomal entry site). Zwar werden beide Gene als ein gemeinsames mRNA Transkript synthetisiert, die Translation beider Gene zu einzelnen Proteinen erfolgt hingegen parallel, wobei die IRES Sequenz die Translation des zweiten Gens induziert. Dadurch exprimieren alle erfolgreich transfizierten Zellen zusätzlich EGFP, welches mittels Durchflusszytometrie (FACScan) überprüft werden kann (siehe 3.2.3.7.). Desweiteren enthält der Vektor MSCV MigRI auch retrovirale LTR-Sequenzen ein Verpackungssignal, welches die Bildung von Retroviren initiiert.

Der MSCV MigRI Vektor wird in Phoenix-E Zellen transfiziert und der Mediumüberstand der die Viruspartikel enthält gesammelt. Die Transfektionseffizienz der Phoenix-E Zellen wird mittels FACScan (EGFP-Expression) analysiert und zur weiteren Qualitätsprüfung titriert. Mithilfe dieser Methode wird die Anzahl der infektiösen Viruspartikel bestimmt. Parallel hierzu werden die Knochenmarkspendenden Mäuse mit 5-Fluoruracil (5-FU) vorbehandelt, um anschließend angereicherte Vorläuferzellen der Hämatopoese aus dem Knochenmark der Tiere zu isolieren. Die gesammelten retroviralen Überstände werden nun zur Transduktion von murinem Knochenmark verwendet. Im Anschluss an die Infektion werden die infizierten

KM-Zellen durchflusszytometrisch mit Hilfe des Fluoreszenzmarker EGFP gemessen. Die Empfängermause wurden vor der Transplantation myeloablativ mit 850 rad bestrahlt und mit einer festen Anzahl an transduzierten Zellen transplantiert. Die neu gebildeten hämatopoetischen Zellen stammen ausschließlich von den transduzierten Spenderzellen.

4.5 Retroviraler Gentransfer

Die zuvor beschriebene Methode wurde mit den Konstrukten Mig NPM-ALK, MSE (MSCV-Stop-EGFP) und MSNAIE (MSCV-Stop-NPM/ALK-IRES-EGFP) durchgeführt. Als Spenderknochenmark dienten C57Bl6-Mäuse, die entweder wildtypischen Ursprungs waren oder die Rekombinase Cre transgen unter dem LysM-, GrzmB-, Cd4- oder Lck-Promoter exprimierten. Exemplarisch wird im folgenden die Erzeugung eines NPM-ALK tragenden Retrovirus (MSNAIE), dessen Titration und die Messung der Transduktionseffizienz dargestellt (Abb. 12). Die Transfektionseffizienz der Virus produzierenden Zelllinie Phoenix E wurde mittels FACS-Analyse berechnet. Der in das Medium sezernierte Virus wurde als Mediumüberstand abgenommen, um damit in einer Verdünnungsreihe (1:20; 1:200; 1:500) NIH3T3 Zellen zu infizieren. Der errechnete Virustiter enthält die Information, wie viele Viruspartikel pro ml im retroviralen Überstand enthalten sind und ermöglicht somit die Planung, wie viele Knochenmarkszellen eingesetzt werden können, um eine ausreichende Transduktion der Zelle zu garantieren. Um eine möglichst hohe Infektion zu erhalten, wurden pro verwendeter Knochenmarkszelle 1 - 10 Viruspartikel berechnet (multiplicity of infection; MOI von 1 – 10). Nach der Transduktion der Knochenmarkszellen mit dem entsprechenden Virus wird die Infektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Hauptaugenmerk liegt hierbei auf den frühen Vorläuferzellen, die sich durch geringe Granularität (SS; Sideward scatter) und überdurchschnittlicher Größe (FS; Forward scatter) auszeichnen. Diese Population wird auf ihre EGFP-Expression und damit Transduktionseffizienz überprüft und spiegelt die Anzahl der Zellen wieder, die das transduzierte Konstrukt exprimieren. Hierdurch kann gewährleistet werden, dass in jedem durchgeführten Experiment eine exakt definierte Anzahl an transduzierten Zellen transplantiert werden kann. Die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen, die für eine erfolgreiche Rekonstitution benötigt werden sollte einen Wert von 200.000 Zellen nicht unterschreiten.

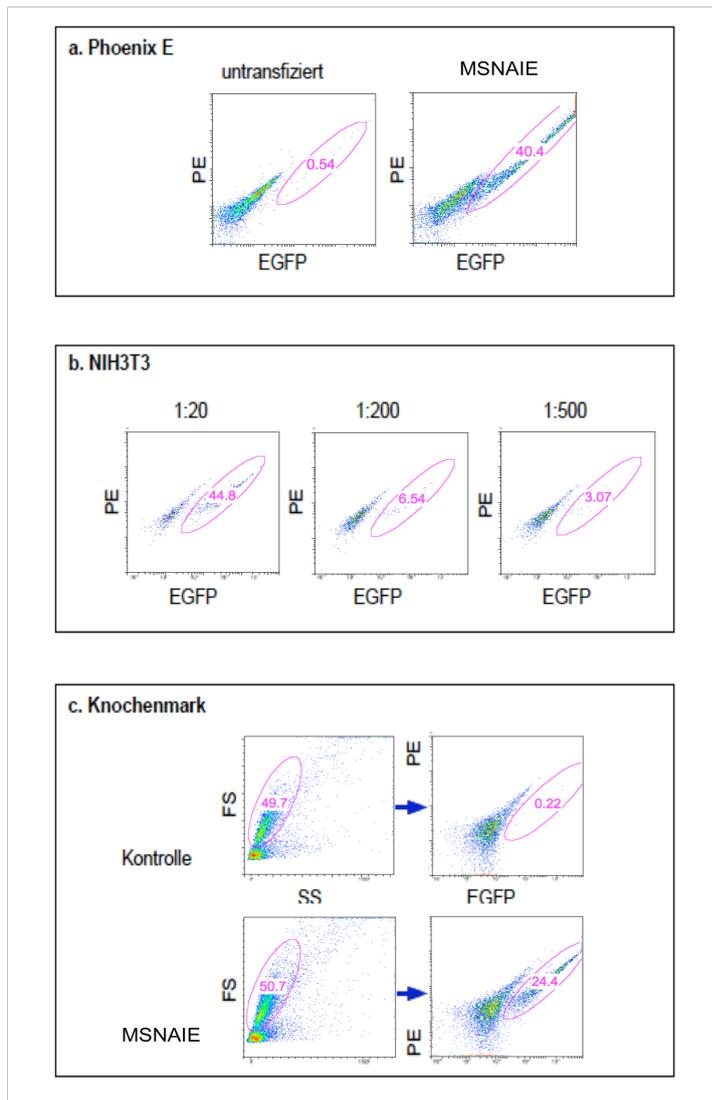


Abb. 12) Generierung eines NPM-ALK tragenden Retrovirus und anschließende Infektion murinen Knochenmarks

NPM-ALK positive Zellen sind mittels durchflusszytometrischer Analyse anhand ihrer EGFP-Expression detektierbar.

- Vergleich der nicht transfizierten Virusproduktionszelllinie Phoenix E mit MSNAIE transfizierten Zellen. Die Transfektionseffizienz ist durch eine Rechtsverschiebung der Zellpopulation erkennbar.
- Bestimmung des Virustiters durch Transduktion von NIH3T3-Zellen. Der von Phoenix E produzierte Virus wurde durch Kollektivierung des Mediumüberstandes gewonnen, um damit in einer Verdünnungsreihe (1:20; 1:200; 1:500) NIH3T3-Zellen zu infizieren. Die Berechnung des viralen Titers erfolgt wie in 3.2.3.8 beschrieben.
- Bestimmung der Transduktionseffizienz von murinem Lck-Cre Knochenmark. Im FS/SS Scatter wird ein Gate auf die frühen Vorläuferzellen gesetzt, die verantwortlich für die Rekonstitution des hämatopoietischen Systems in den bestrahlten Mäusen sind (linkes Bild). Anschließend wird diese Population auf den Anteil an NPM-ALK positiven Zellen hin untersucht (rechtes Bild).

4.6 Übersicht der NPM-ALK Transplantationsexperimente

Es ist zwar bekannt, dass das Onkogen NPM-ALK Lymphome in einer Vielzahl von Mausmodellen hervorrufen kann ^{63,103-106,128}, bislang ist jedoch kein Mausmodell beschrieben, dass zu einem CD30-positiven T-Zell Lymphom (sog. Alkom) führt. Da die Mehrzahl der ALCL Fälle zumindest auf genomischer Ebene einen T-Zell-Phänotyp aufweist, ist diese Tatsache jedoch von entscheidender Bedeutung und daher sollte ein entsprechendes Mausmodell diese Linienspezifität auch widerspiegeln. Unklar ist auch, in welcher Zelle die t(2;5) Translokation auftritt bzw. ob diese sogar zur Transdifferenzierung der Zielzelle führt. So wie es bei der Entität des Hodgkin-Lymphoms anzutreffen ist, bei dem die ursprüngliche Zelle eine B-Zelle ist, aber im Laufe ihrer malignen Entwicklung ihren B-Zellcharakter verliert und hingegen typische T-Zellmarker wie CD30 exprimiert ¹²⁹. Die Suche nach der Ursprungszelle der ALCL ist aus diesem Grund sehr weitreichend und muss sich nicht alleine auf eine T-Zelle beziehen. Daher wird versucht, dass NPM-ALK Onkogen mithilfe des MSNAIE-Vektors in verschiedenen Zelltypen *in vivo* zu exprimieren. Um diese linienspezifische Expression zu gewährleisten, wird Knochenmark (KM) von Spendermäusen, welches Cre unter einem linienspezifischen Promotor exprimiert, retroviral mit dem Stopvektor infiziert und das KM anschließend über die Schwanzvene in letal bestrahlte Mäuse transplantiert (Abb. 13).

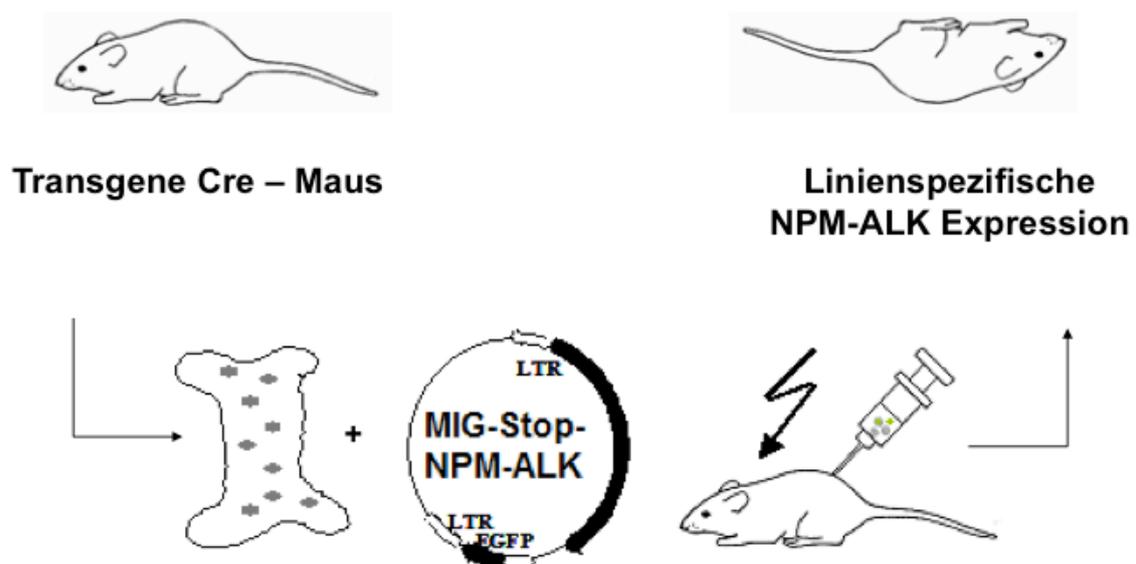


Abb. 13) Das retrovirale Knochenmarksinfektions- / Transplantationsmodell
Knochenmark von transgenen Cre-Mäusen wird mit dem MSNAIE Vektor infiziert und anschließend in letal bestrahlte Mäuse transplantiert.

Da die Ursprungszelle in welcher die Translokation von NPM-ALK stattfindet bis jetzt noch nicht identifiziert wurde, wurden verschiedene Cre-transgene Knochenmarkszellen retroviral mit dem MSNAIE-Konstrukt infiziert und anschließend transplantiert (Abb. 14). Um eine möglichst große Bandbreite an verschiedenen Zelltypen abzudecken, wurde zum einen die LysM-Cre Maus ausgewählt, um eine Expression des Onkogens im myeloiden Kompartiment zu untersuchen und um festzustellen, ob NPM/ALK in der Lage ist, in diesen Zellen T-Zellrezeptoren hoch zuregulieren (Transdifferenzierung). Des weiteren wurden GrzmB-Cre Mäuse verwendet, da dieses Protein vor allem in zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird und ein weiterer Marker für die Entität der ALCL ist. CD4-Cre Mäuse wurden eingesetzt, da CD4 ein typischer Marker für reife T-Zellen ist und die malignen Zellen der ALCL einen T-Zell-Phänotyp haben. Um auch noch nicht ausgereifte T-Zellen zu berücksichtigen, falls die Translokation des Onkogens als sehr frühes Ereignis in der T-Zellentwicklung eintreten sollte, wurden Lck-Cre Mäuse benutzt.

Cre-transgenes Knochenmark	Retrovirales Konstrukt	Anzahl transplantiertes Mäuse	transplantiertes Gesamtknochenmark	Hiervon NPM-ALK exprimierendes Knochenmark
LysM-Cre	MSNAIE	4		
GrzmB-Cre	MSNAIE	8		
CD4-Cre	MSNAIE	11	300.000 - 600.000	40.000 – 100.000
Lck-Cre	MSNAIE	9	400.000 – 500.000	40.000 – 100.000

Abb. 14) Übersicht der MSNAIE-Transplantationsexperimente

4.6.1 Promotoranalysen der verwendeten Cre-Mäuse

Um die Promotoraktivität der unter Abb. 14) aufgeführten Cre-transgenen Mäuse ausführlich zu charakterisieren, wurde Knochenmark dieser Mäuse mit dem Kontrollvektor MSE infiziert und anschließend in letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Die Rekombinase Cre deletiert somit in dem Zellkompartiment die Stopkassette, in dem sie unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors exprimiert wird. Daraufhin kommt es zur Translation des

Fluoreszenzmarker EGFP. Den transplantierten Tieren wurde wiederholt Blut abgenommen und dieses durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 15).

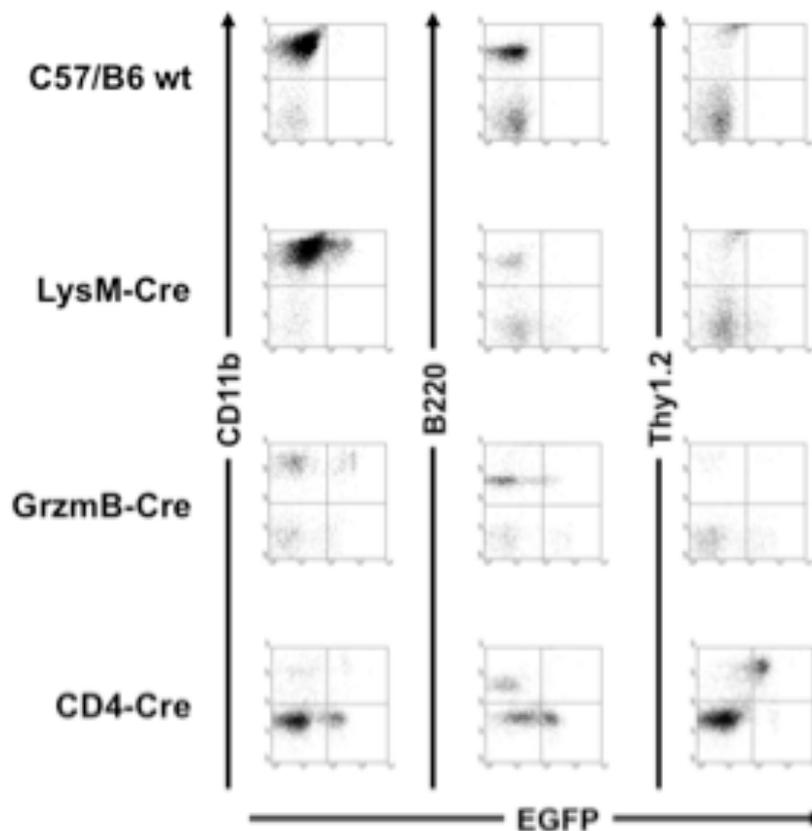


Abb. 15) FACS-Analyse des peripheren Bluts von Mäusen, die mit MSE infizierten KM-Zellen verschiedener Spendermäuse transplantiert wurden

Nach der Erylyse wurde das Blut mit PE-markierten Antikörpern gegen myeloide (CD11b), B- (B220) und T-Zellen (Thy1.2) gefärbt und die PE- bzw. EGFP-Expression gemessen

In den Cre-negativen Kontrollmäusen C57/B6 kam es erwartungsgemäß zu keiner EGFP-Expression in allen untersuchten Kompartimenten. Die LysM-Cre transplantierten Mäuse zeigten naturgemäß ein deutliches EGFP-Signal in myeloiden, CD11b-positiven Zellen. Bemerkenswerter Weise wiesen die GrzmB-Cre Mäuse auch in diesem Zelltyp eine EGFP-Expression aus, obwohl davon auszugehen war, dass dieser Promotor ausschließlich in zytotoxischen T-Zellen aktiv sein sollte. Daher ist anzunehmen, dass GranzymeB auch in myeloiden Zellen exprimiert wird oder, dass die transgene GrzmB-Cre Maus einen teilweise durchlässigen Promotor besitzt. Eine Analyse des CD4-Cre Promotors erzielte ähnliche Resultate. Neben der EGFP-Expression in Thy1.2-positiven T-Zellen, konnte auch hier eine geringe Population an grünen, CD11b-positiven Zellen detektiert werden.

4.6.2 LysM-Cre transgene Knochenmarks-Spendermäuse

Bei diesen Mäusen wird die Cre-Rekombinase vom LysM-Promotor exprimiert, der ausschließlich in myeloiden Zellen aktiv ist¹³⁰. Das LysM-Cre KM wurde retroviral mit dem MSNAIE Vektor infiziert und damit letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Die so generierten Mäuse entwickelten eine schnelle und aggressive Erkrankung nach etwa zwei Monaten mit einer 100% Penetranz (Abb. 16). Betroffen von der Erkrankung waren hauptsächlich die Milz, das periphere Blut, als auch die Leber. Die Cre-negativen Kontrollmäuse, die mit MSNAIE infiziertem Wildtyp-KM transplantiert wurden, zeigten keine Zeichen einer Krankheit innerhalb eines Beobachtungszeitraums von acht Monaten. Ein deutlicher Hinweis, dass der MSNAIE-Vektor auch *in vivo* die Expression des Onkogens aufgrund der Stopkassette unterdrückt.

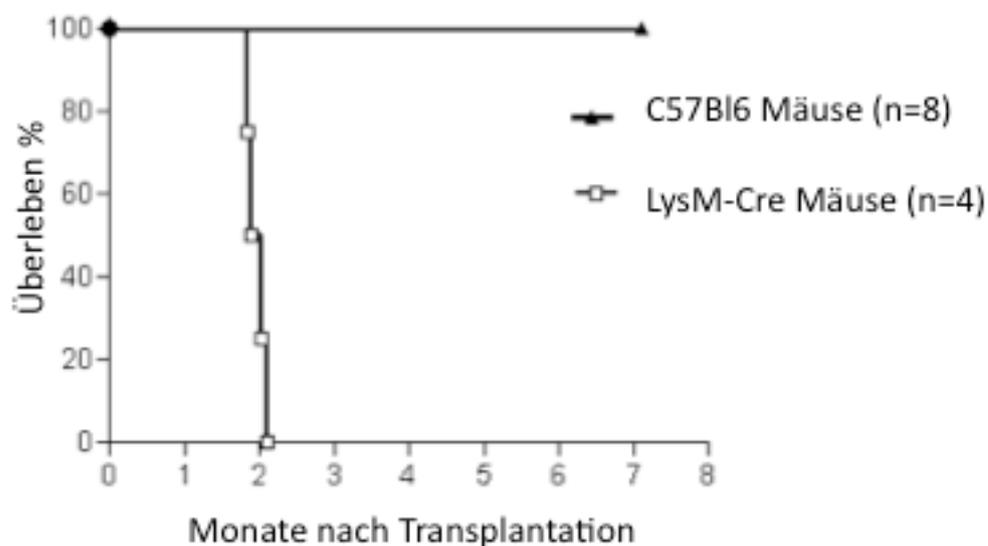


Abb. 16) Kaplan-Meier Überlebenskurve der Wildtyp bzw. LysM-Cre Mäuse

Cre-negatives bzw. LysM-Cre KM wurde mit dem MSNAIE-Vektor infiziert und damit letal bestrahlte Mäuse transplantiert.

Die FACS-Analyse des peripheren Blutes (PB) lässt eine klare doppelpositive Population für CD11b und EGFP (Quadrant rechts oben) erkennen (Abb. 17). Dies zeigt den myeloiden Charakter der Erkrankung. Das von der Krankheit betroffene myeloide Kompartiment spiegelt die gerichtete Expression NPM-ALKs wieder, welches durch die Aktivität der Cre-Rekombinase, kontrolliert durch den LysM-Promotor, zur Deletion der Stopkassette und somit zur Translation des Onkogens führt. Somit wurde bestätigt, dass das MSNAIE-Konstrukt auch *in vivo* funktionell ist, denn die gerichtete Expression von NPM-ALK in

myeloiden Zellen führt zu einer myeloiden Erkrankung. Ein weiterer, wichtiger Rückschluß hieraus ist, dass NPM-ALK nicht zu einer Transdifferenzierung myeloischer Zellen führt und daher die Ursprungszelle des großzellig anaplastischen Lymphoms wahrscheinlich keine Zelle myeloiden Ursprungs ist.

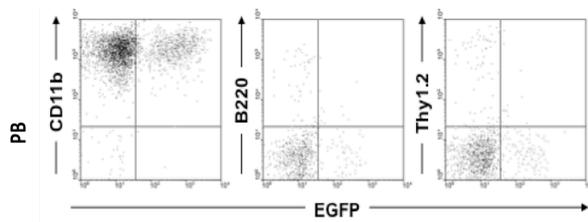


Abb. 17) FACS-Analyse des LysM-Cre Knochenmarks- / Transplantationsmodells

Peripheres Blut einer Maus, die mit MSNAIE infiziertem LysM-Cre KM transplantiert wurde. Die Proben wurden als Einzelzellsuspension mit PE-markierten Antikörpern gegen myeloide Zellen (Cd11b), B-Zellen (B220) und T-Zellen (Thy1.2) gefärbt und die EGFP- und PE-Expression analysiert.

4.6.3 GrzmB-Cre transgene Knochenmarks-Spendermäuse

Da ALCLs positiv für GranzymeB (GrzmB) sind, welches normalerweise in zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird, wurde in einem weiteren Transplantationsexperiment eine transgene GrzmB-Cre Maus als Knochenmarkspender verwendet¹³¹, um diese Zellen anschließend mit dem MSNAIE-Konstrukt retroviral zu infizieren und transplantieren. Es kam auch bei allen Tieren zu einer Erkrankung mit einer Latenzzeit von etwa einem Monat (Abb. 18).

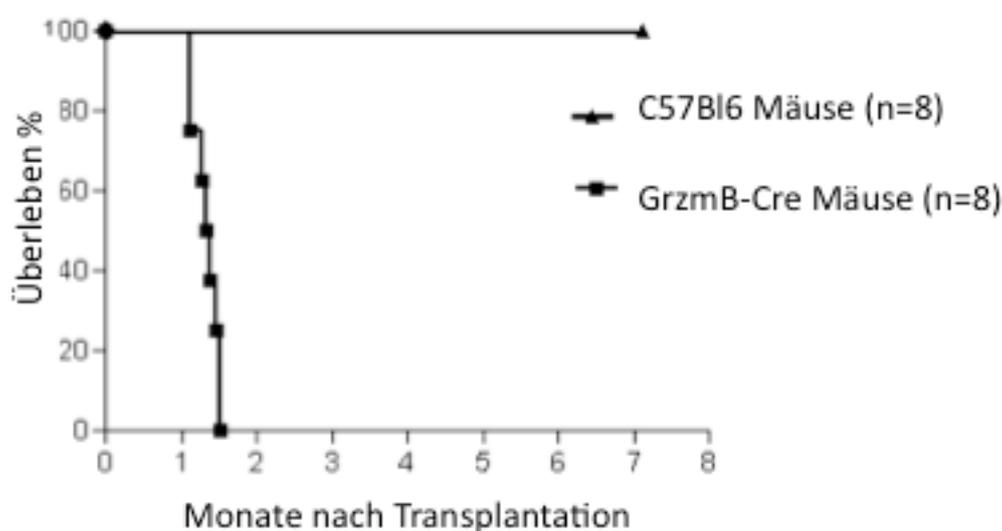


Abb. 18) Kaplan-Meier Überlebenskurve der Wildtyp bzw. GrzmB-Cre Mäuse

Cre-negatives bzw. GrzmB-Cre KM wurde mit dem MSNAIE-Vektor infiziert und damit letal bestrahlte Mäuse transplantiert.

Betroffen waren alle hämatologisch wichtigen Organe, wie Milz, Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Blut. Detaillierte FACS-Analysen ergaben einen gemischten myeloiden, lymphoiden Phänotyp der Erkrankung (Abb. 19) mit ausgeprägter NPM-ALK Expression (EGFP-positive Population) in den T-Zellen des Thymus und des Lymphknotens, als auch den myeloiden und weniger ausgeprägt in den lymphatischen Kompartimenten der Milz und des Knochenmarks.

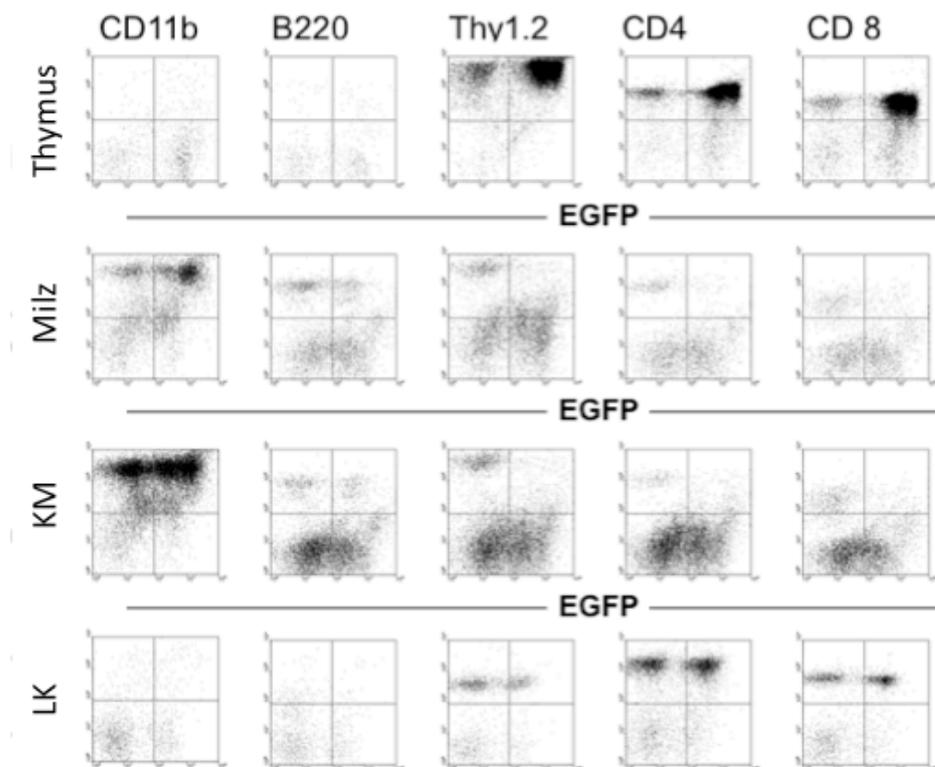


Abb. 19) FACS-Analyse des GrzmB-Cre Knochenmarks- / Transplantationsmodells

Repräsentative FACS-Analyse von Tumorgewebe entnommen aus einer Maus, die mit MSNAIE-infiziertem GrzmB-Cre KM transplantiert wurde. Die Proben wurden als Einzelzellsuspension mit PE-markierten Antikörpern gegen myeloide Zellen (CD11b), B-Zellen (B220) und T-Zellen (Thy1.2, CD4, CD8, CD30) gefärbt und die EGFP- und PE- Expression analysiert. LK = Lymphknoten; KM = Knochenmark

Jedoch steht dies nicht im Widerspruch zur Hypothese das NPM-ALK nicht zur Transdifferenzierung führt. Sie wird dadurch bestärkt, dass der GrzmB-Promotor nicht nur in lymphatischen Zellen, sondern auch in myeloiden Zellen aktiv ist, wie zuvor gezeigt wurde (Abb. 15). Die gerichtete Expression von NPM-ALK in GrzmB-exprimierenden Zellen führt daher zu einem gemischten myeloiden, lymphatischen Phänotyp.

4.6.4 CD4-Cre transgene Knochenmarks-Spendermäuse

Als Konsequenz hieraus wurde im nächsten Transplantationsexperiment eine CD4-Cre transgene Knochenmarksspendermaus verwendet ¹³², die Cre im späten T-Zellstadium aktiviert. Die nach dem bereits bekannten Schema generierten Mäuse wurden innerhalb einer Zeitspanne von etwa vier Monaten krank (Abb. 20).

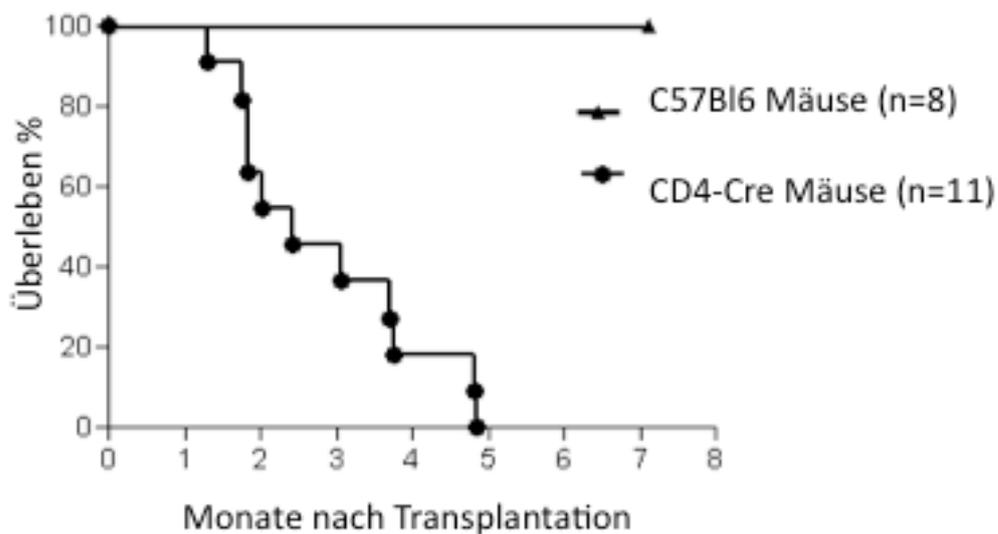


Abb. 20) Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Knochenmark verschiedener Mauslinien (Wildtyp und CD4-Cre) wurde mit dem MSNAIE Konstrukt infiziert und damit letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Mäuse, die Cre exprimierten, starben an den angegebenen Zeitpunkten.

Alle Tiere zeigten einen Befall der hämatopoetischen Organe. Insbesondere kam es zu stark vergrößerten Thymi und Lymphknoten. Die FACS-Analyse ergab einen vergleichbaren Phänotyp, wie zuvor für die GrzmB-Cre Mäuse beschrieben (Abb. 21). Eine Kombination aus NPM-ALK positiven T-Zellen des Thymus und myeloiden bzw. lymphoiden Zellen der Milz und des Knochenmarks. Allerdings konnte ebenso für die CD4-Cre transgenen Mäuse gezeigt werden, dass der Promotor auch im myeloiden Kompartiment aktiv ist, was somit den Phänotyp der transplantierten Mäuse erklärt.

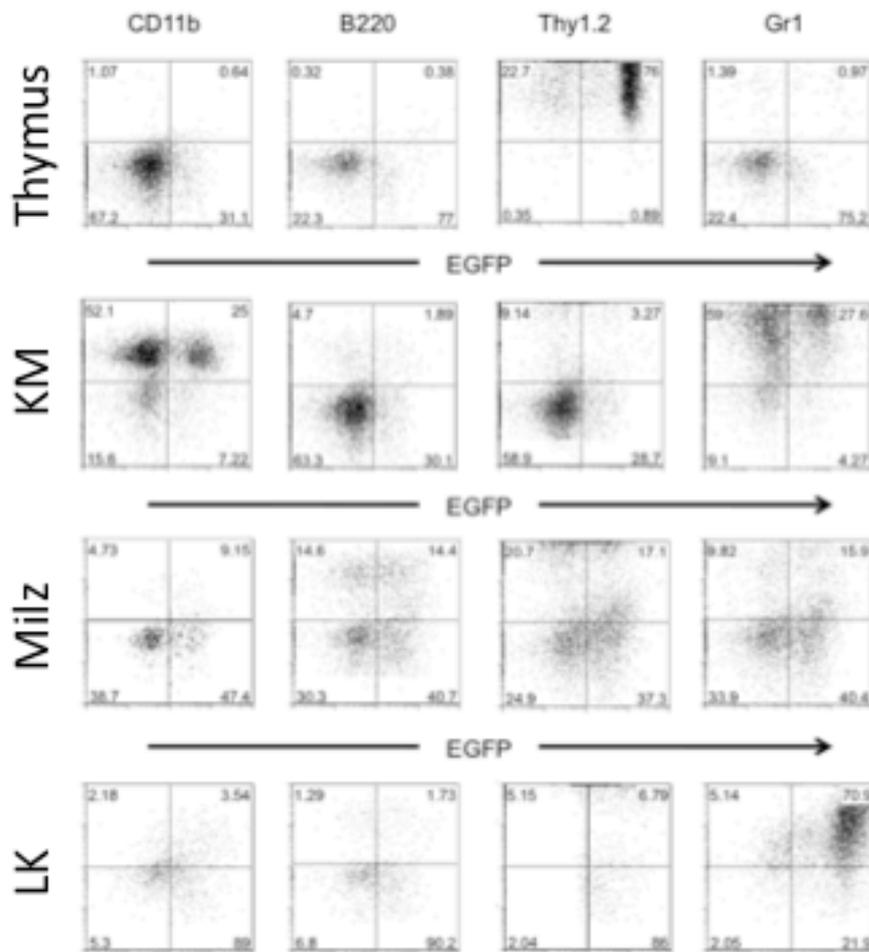


Abb. 21) Representative durchflusszytometrische Untersuchung einer CD4-Cre transplantierten Maus

Tumorgewebsproben wurden als Einzelzellsuspension mit PE-markierten Antikörpern gegen myeloide (CD11b, Gr1), B- (B220) und T- Zellen (Thy1.2, CD30) gefärbt.

Immunohistochemische Analysen bestätigten die im Durchflusszytometer erhaltenen Aussagen (Abb. 22). So zeigte sich eine maligne Zellinfiltration in der Milz, die positiv für den T-Zellmarker CD3 und Alk war und ein geringes Expressionslevel an CD30 aufwies.

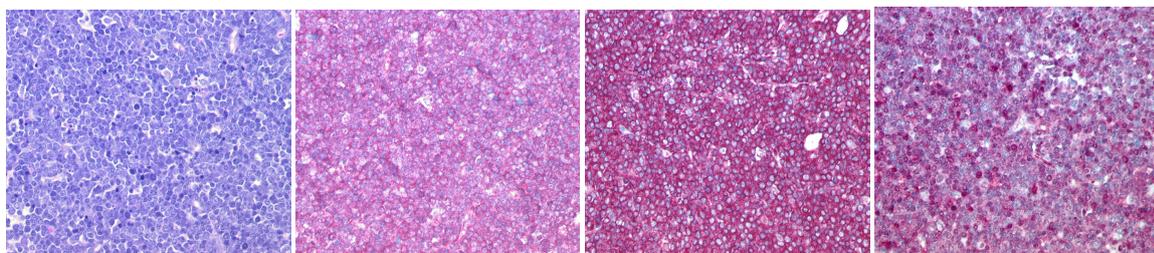


Abb. 22) Immunohistochemische Untersuchung der CD4-Cre transplantierten Mäuse
Milzgewebe von CD4-Cre transplantierten Mäusen wurde mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Färbungen von links: Heamtoxylin-eosin, CD3, ALK und CD30.

4.6.5 Lck-Cre transgene Knochenmarks-Spendermäuse

Da die CD4-Cre transplantierten Mäuse auch keinen reinen T-Zell Phänotyp aufwiesen, wurde in einem weiteren Transplantationsmodell eine Lck-Cre transgene Maus als KM-Spender verwendet¹³³. Cre wird hier in frühen T-Zellen exprimiert. Die so generierten Mäuse erkrankten alle ausnahmslos nach ungefähr fünf Monaten (Abb. 23).

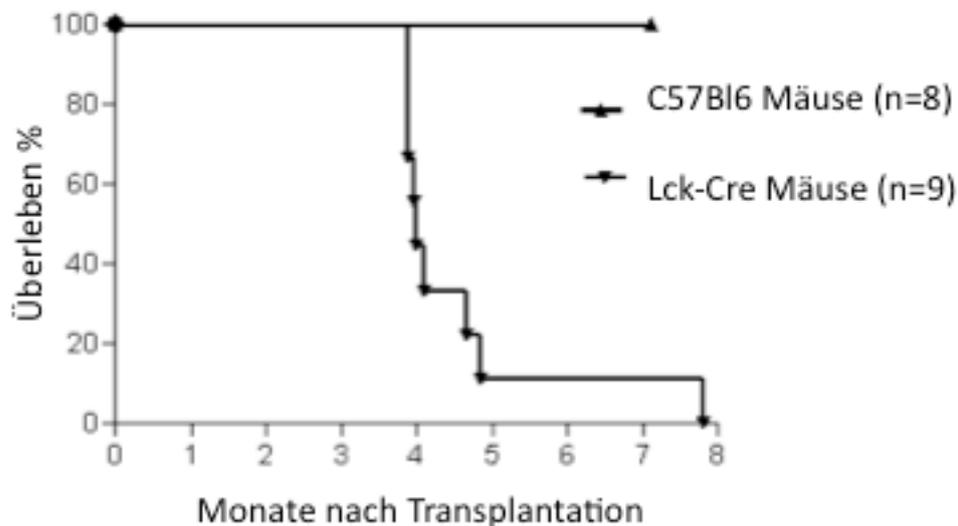


Abb. 23) Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Lck-Cre transplantierten Mäuse

Knochenmark verschiedener Mauslinien (Wildtyp und Lck-Cre) wurde mit dem MSNAIE Konstrukt infiziert und in letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Mäuse, die Cre exprimierten, starben an den angegebenen Zeitpunkten.

Es wurde mit diesen Mäusen ein Lymphom etabliert, welches einen systemischen Phänotyp aufweist. Hierbei kam es zu einer malignen Infiltration von Knochenmark, Lymphknoten, Thymi, Milz und Blut. Es handelt sich bei dieser Erkrankung also um kein Thymom (ausschließliche Infiltration des Thymus), wie es bei der transgenen CD4-Promotormaus beschrieben ist¹⁰⁵, sondern um ein Alkom (mehrere hämatopoetischen Organe sind betroffen), wie es bei der humanen ALCL zu finden ist. Diesmal zeigte die FACS-Analyse bei allen Mäusen einen reinen T-Zell Phänotyp. NPM-ALK Expression war in allen hämatopoetisch wichtigen Organen detektierbar. Eine vernachlässigbare kleine myeloide EGFP-positive Population befand sich in der Milz und im Knochenmark. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das Tumorgewebe aller Mäuse den Oberflächenrezeptor CD30 exprimiert, einen wichtigen Marker des großzelligen anaplastischen Lymphoms (Abb. 24).

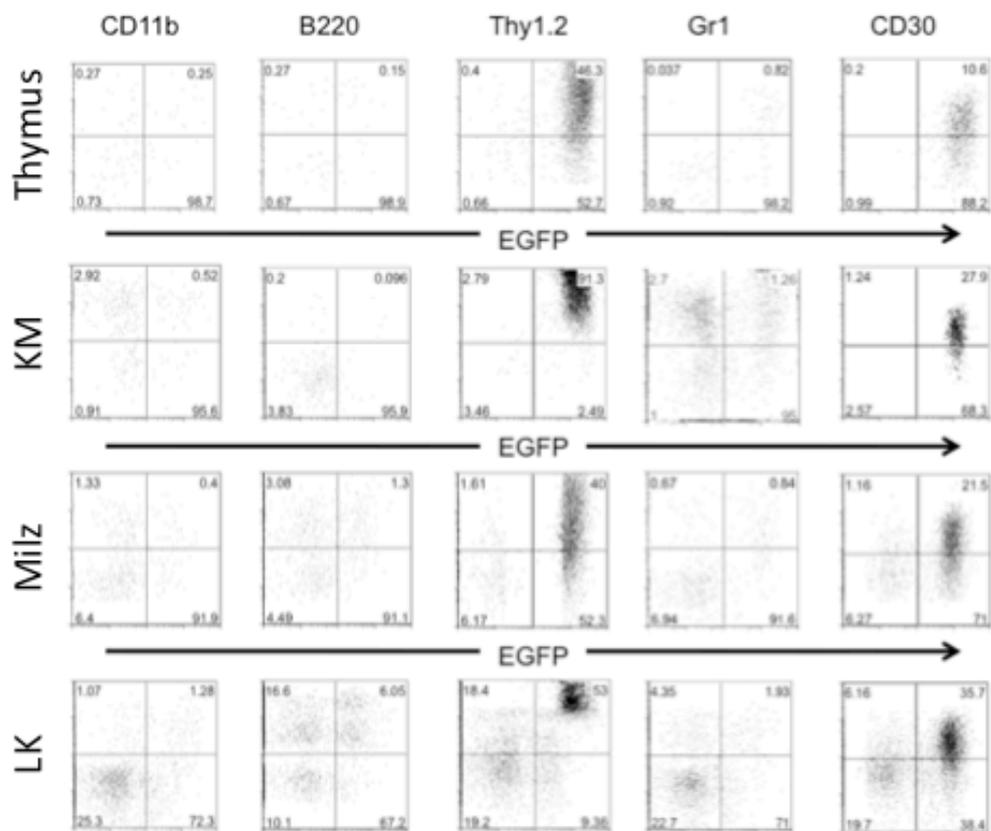


Abb. 24) Evaluation der MSNAIE infizierte Lck-Cre Mäuse

Neoplastische Gewebeproben wurden durchflusszytometrisch untersucht. Myeloide (CD11b, Gr1), B- (B220) und T- Zellen (Thy1.2, CD30) wurden indirekt über EGFP auf ihre NPM-ALK Expression hin überprüft.

Die Generierung dieses durchflusszytometrisch- und immunohistochemisch- verwendbaren CD30-Antikörpers wird in Kapitel 4.7 näher beschrieben.

Detaillierte Untersuchungen der malignen Zellen ergab, dass es sich zu einem großen Teil (30 – 80%) um doppelt negative (CD4- / CD8-) T-Zellen handelt. Diese Zellen wiederum sind positiv für den Marker CD44, aber negativ für CD25 (Abb. 25). Daraus ist zu schließen, dass es sich um sehr frühe T-Zellen handelt, die sich auf dem Weg vom Knochenmark in den Thymus befinden. Es finden sich jedoch wenig ausgereifte, einzelpositive Zellen (CD4+ oder CD8+), so dass NPM/ALK womöglich zu einer Blockierung in der Differenzierung dieser Zellen führt.

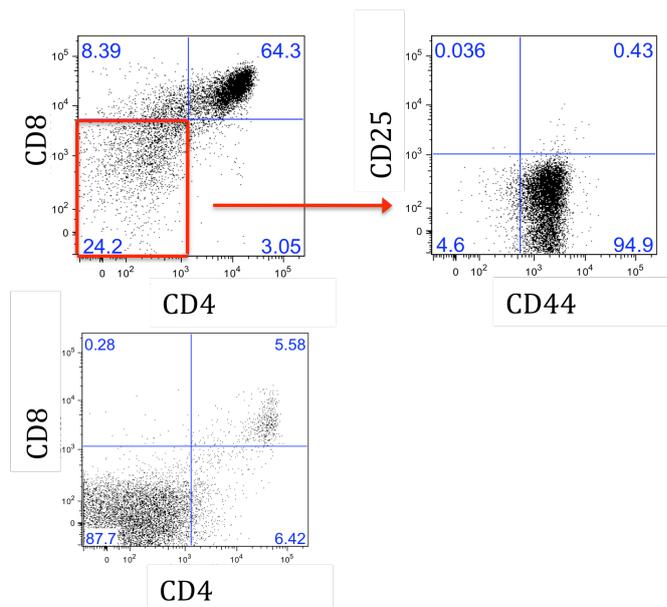


Abb. 25) Genauere Charakterisierung der malignen Zellen im Thymus

Einzelzellensuspensionen des Thymus wurden durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden zur genaueren Bestimmung des T-Zellreifestadiums die Antikörper CD4, CD8, CD25 und CD44 verwendet. Die doppeltnegativen Zellen (CD4⁻ / CD8⁻) waren zudem CD44⁺ und CD25⁻. Es handelt sich hierbei um eine multipotente Population an T-lymphoiden Progenitoren, die bereits das Knochenmark verlassen haben, um im Thymus weiter auszureifen.

Bestätigt wurde die hohe CD30-Expression auch immunohistochemisch (Abb. 26). In den Färbungen zeigte sich eine hohe Anzahl an CD30-positiven neoplastischen Milzzellen, wohingegen die Kontrollen weitestgehend negativ für CD30 sind. Die ALK-Färbung zeigt in den erkrankten Lck-Cre Mäusen ein charakteristisches nukleäres und zytoplasmatisches Expressionsmuster, da das NPM-ALK Fusionsprotein in der Lage ist als Heterodimer mit endogenem NPM in den Nucleus zu transferieren. Der T-Zellmarker CD3 spiegelt den T-Zell-Phänotyp der ALCL wieder und veranschaulicht, dass der Großteil der Tumorzellen T-Zell-Ursprung haben. Morphologisch erkennt man mittelgroße pleomorphe Zellen, was häufig bei der Entität der ALCL zu finden ist.

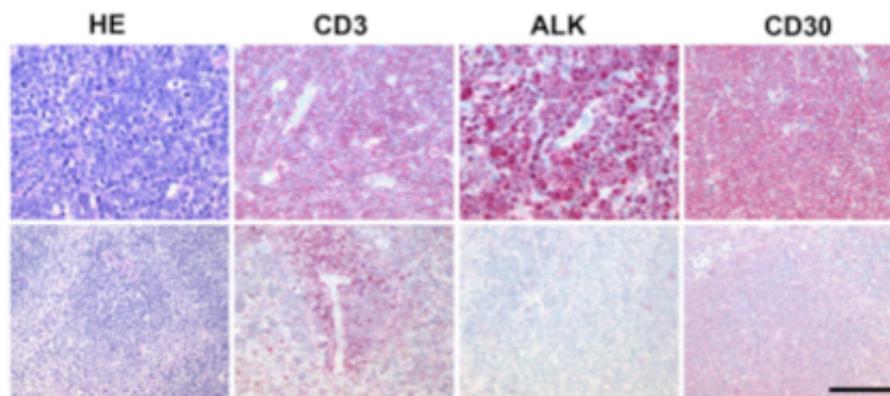


Abb. 26) Immunohistochemische Untersuchung der MSNAIE infizierten Mäuse

Die mit MSNAIE infizierten KM-Zellen (oben: Lck-Cre; unten: Wildtyp) transplantierten Mäuse wurden immunohistochemisch analysiert. HE: Hematoxylin-Eosin; CD3/CD30: T-Zell-Marker; ALK: Anaplastische Lymphoma Kinase

Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigen die zuvor gewonnenen Ergebnisse (Abb. 27). In der oberen Bildreihe zeigt sich, dass nur die T-Zellen (grün) positiv für ALK (rot) und somit der Tyrosinkinase sind. Die Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau) verdeutlicht die nukleäre bzw. zytoplasmatische Verteilung von NPM-ALK. In der unteren Bildreihe wird deutlich, dass der charakteristische Marker einer ALCL, der Oberflächenrezeptor CD30 in ALK-positiven Zellen koexprimiert wird.

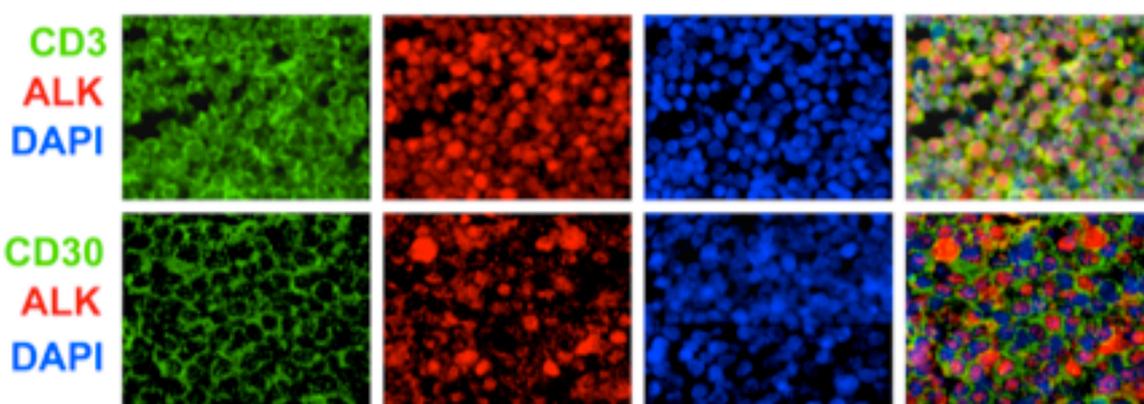


Abb. 27) Immunfluoreszenzbilder von MSNAIE infizierten und transplantierten Lck-Cre Knochenmark

Analyse der Verteilung von CD3 (grün; obere Reihe), CD30 (grün; untere Reihe), ALK (rot) und DAPI (blau). Übereinanderlegung (rechts außen).

Somit ist es wahrscheinlich, dass die Translokation von NPM-ALK zur Expression von CD30 führt und nicht umgekehrt CD30-positive Zellen den Ursprung der NPM-ALK Translokation

bilden. Des Weiteren lassen die bisherigen Ergebnisse den Rückschluss zu, dass die Translokation des Onkogens in einer T-Zelle stattfinden muss, da die Expression von NPM-ALK in einer T-Zell-Linie zu einem T-lymphoiden Phänotyp führt.

Weitere Untersuchungen zeigten eine deutliche Splenomegalie der MSNAIE-infizierten Lck-Cre bzw. CD4-Cre KM transplantierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Mit durchschnittlichen Milzgewichten von etwa 260 mg bei den Lck-Cre und circa 380 mg bei den CD4-Cre transplantierten und damit signifikant höher als die Kontrollen mit ungefähr 80 mg (Abb. 28).

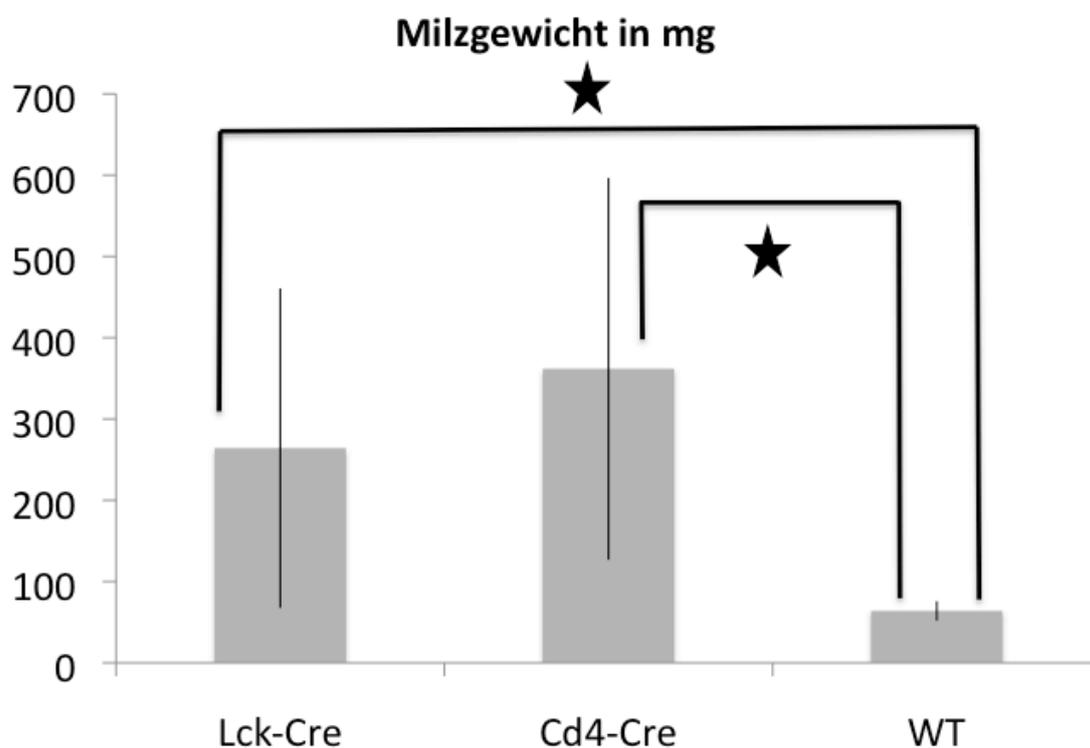


Abb. 28) Vergleiche der Milzgewichte

Die Milzgewichte der Lck-Cre- (n=9), CD4-Cre- (n=11) und Wildtyp (n=8)-Mäuse wurden miteinander verglichen. Statistische Signifikanz wurde mittels Studentischen T-Test festgestellt.

Auch weitere Organe der Lck-Cre Mäuse zeigten enorme Vergrößerungen im Gegensatz zu den Kontrolltieren. In Abb. 29) ist im oberen Bild ein Thymus einer mit MSNAIE-infizierten Lck-Cre Knochenmark transplantierten, Maus dargestellt mit einem Durchmesser von etwa 1,5 cm. Im Bild darunter ist ein normal entwickelter Thymus einer Kontrollmaus dargestellt, der deutlich kleiner ausfällt. Neben dem Thymus dieser Tiere waren auch die Lymphknoten stark vergrößert (Abb. 29). Die vergrößerten, lymphatischen Organe sind ein eindeutiges

Zeichen für eine starke Lymphomentwicklung und typisch für die ALCL.

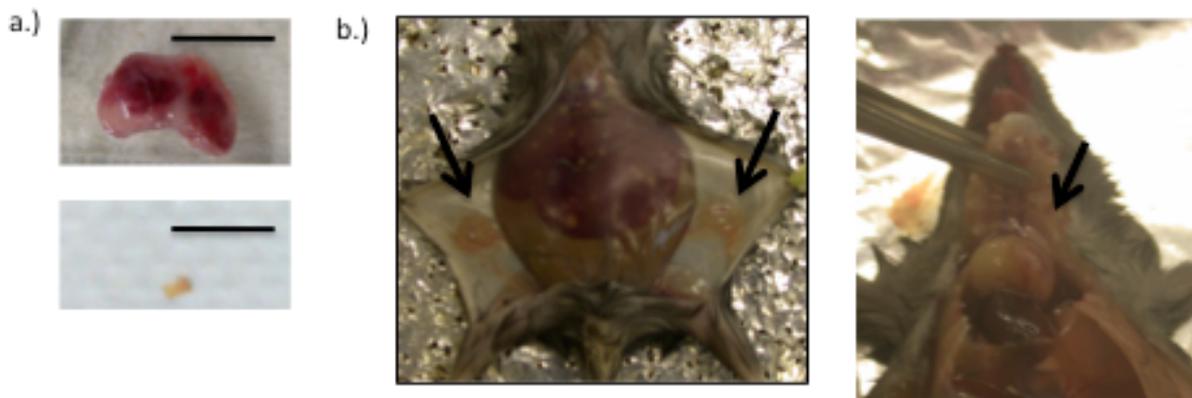


Abb. 29) Lymphatische Organe der Lck-Cre transplantierten Mäuse

- a.) Bild oben: Der Thymus einer mit Lck-Cre transplantierten, MSNAIE-infizierten Maus
 Bild unten: Im Vergleich der Thymus einer Wildtyp-Maus
 Maßeinheit entspricht 1 cm
- b.) Bild links: Vergrößerte inguinale Lymphknoten
 Bild rechts: Vergrößerter Thymus

In einem weiteren Experiment wurden maligne Milzzellen von primär erkrankten Mäusen in subletal bestrahlte Wildtyp-Mäuse seriell transplantiert (Abb. 30). Die Tiere erkrankten in einem Zeitraum von 1 – 2 Monaten, also wesentlich früher als die primär transplantierten Mäuse. Phänotypisch wiesen sie eine Infiltration aller hämatopoetischen Organe mit transformierten T-Zellen auf und entsprachen somit dem Erscheinungsbild der primär transplantierten Tiere. Die stark reduzierte Latenz bei der seriellen Transplantation spricht für eine Anreicherung der Zellen, die für eine Induzierung der Krankheit verantwortlich sind. Da in einem zweiten Versuch bei dem nur halb so viele Milzzellen transplantiert wurden, nur die Hälfte der Mäuse erkrankten, ist davon auszugehen, dass die Frequenz der potentiell Lymphom-initiiierenden Zellen sehr gering ist.

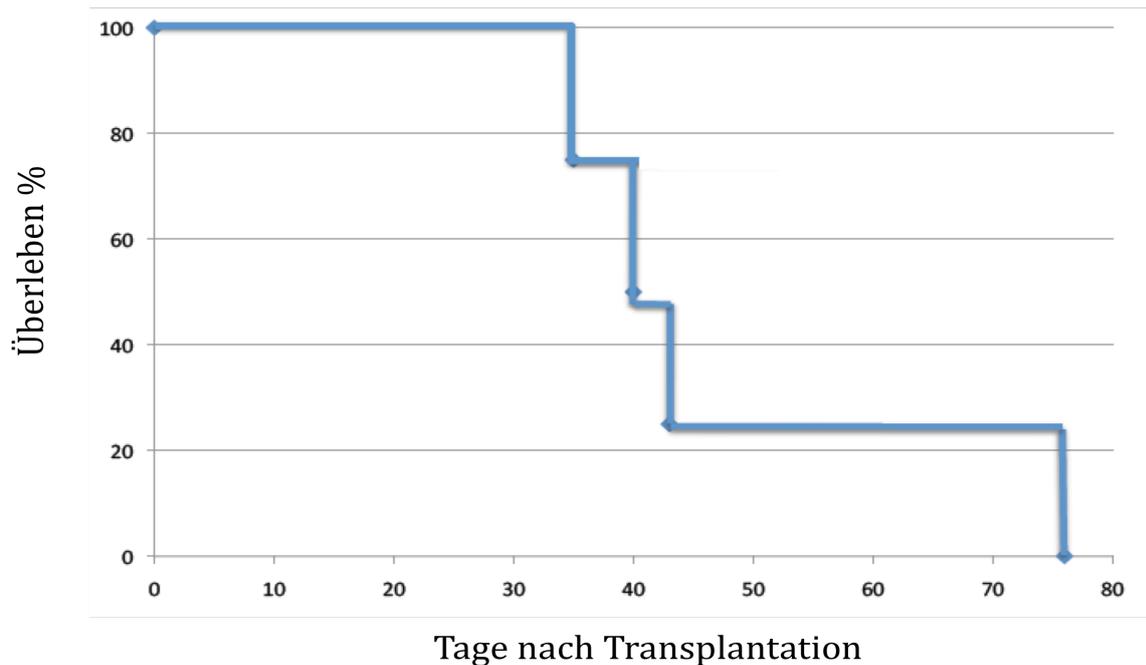


Abb. 30) Überlebenskurve der seriell transplantierten Mäuse

5×10^5 EGFP-positive Tumorzellen aus der Milz wurden in subletal bestrahlte Wildtyp-Mäuse transplantiert.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass die hämatopoetische Linie in welcher ein Onkogen exprimiert wird, von größter Bedeutung für den malignen Phänotyp ist. Des weiteren wurde zum ersten Mal ein murines Modell entwickelt, welches die wichtigsten Charakteristika des großzellig anaplastischen Lymphoms widerspiegelt. Zudem zeigt das Lck-Cre Mausmodell, dass die Ursprungszelle der NPM-ALK Translokation eine frühe T-Zelle sein könnte. Das beschriebene Modell repräsentiert ein vielfältiges Werkzeug, um die NPM-ALK Signalwege *in vivo* besser zu studieren. Mithilfe dieser Methode kann jedes Gen schnell in einer definierten Linie oder Entwicklungsstadium exprimiert werden. Daher können auch subtile Phänotypen der *in vivo* Untersuchung zugeführt werden.

4.7 Exkurs: Generierung eines murinen, polyklonalen CD30-Antikörpers

Da die kommerziell erhältlichen murinen CD30-Antikörper keine ausreichende Detektion des CD30-Proteins im FACS erlauben und dies womöglich einer der Gründe sein könnte, weshalb es bislang kein CD30-positives ALCL-Mausmodell gibt, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein muriner, polyklonaler CD30-Antikörper generiert.

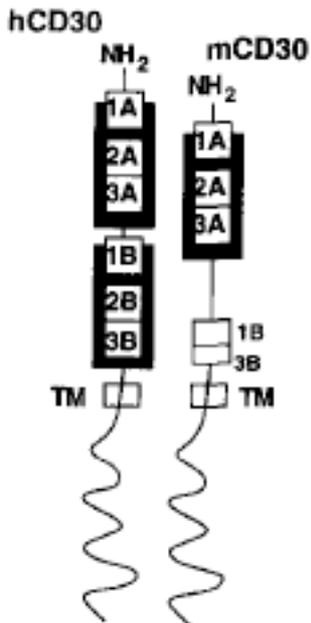


Abb. 31) Schematische Darstellung des humanen und murinen CD30 Proteins

Schwarz unterlegt sind hierbei die extrazellulären Domänen des humanen (1A-3A / 1B-3B) und murinen (1A-3A / 1B / 3B) CD30 Proteins. Bowen et al., 1996, *Immunology*

Vergleicht man die extrazelluläre Domäne des humanen und murinen CD30-Proteins (Abb. 31) so stellt man eine große Ähnlichkeit fest. Die humane Domäne besteht aus zwei Cysteinereichen Segmenten (1A-3A / 1B-3B). Auch das murine Protein besitzt ein Cysteinereiches Segment (1A-3A), dem zweiten Segment fehlt jedoch das humane Analog 2B komplett, als auch kleinere Regionen von 1B und 3B (Abb. 32). Dennoch sind die extrazellulären Domänen beider Spezies zu 55% identisch.

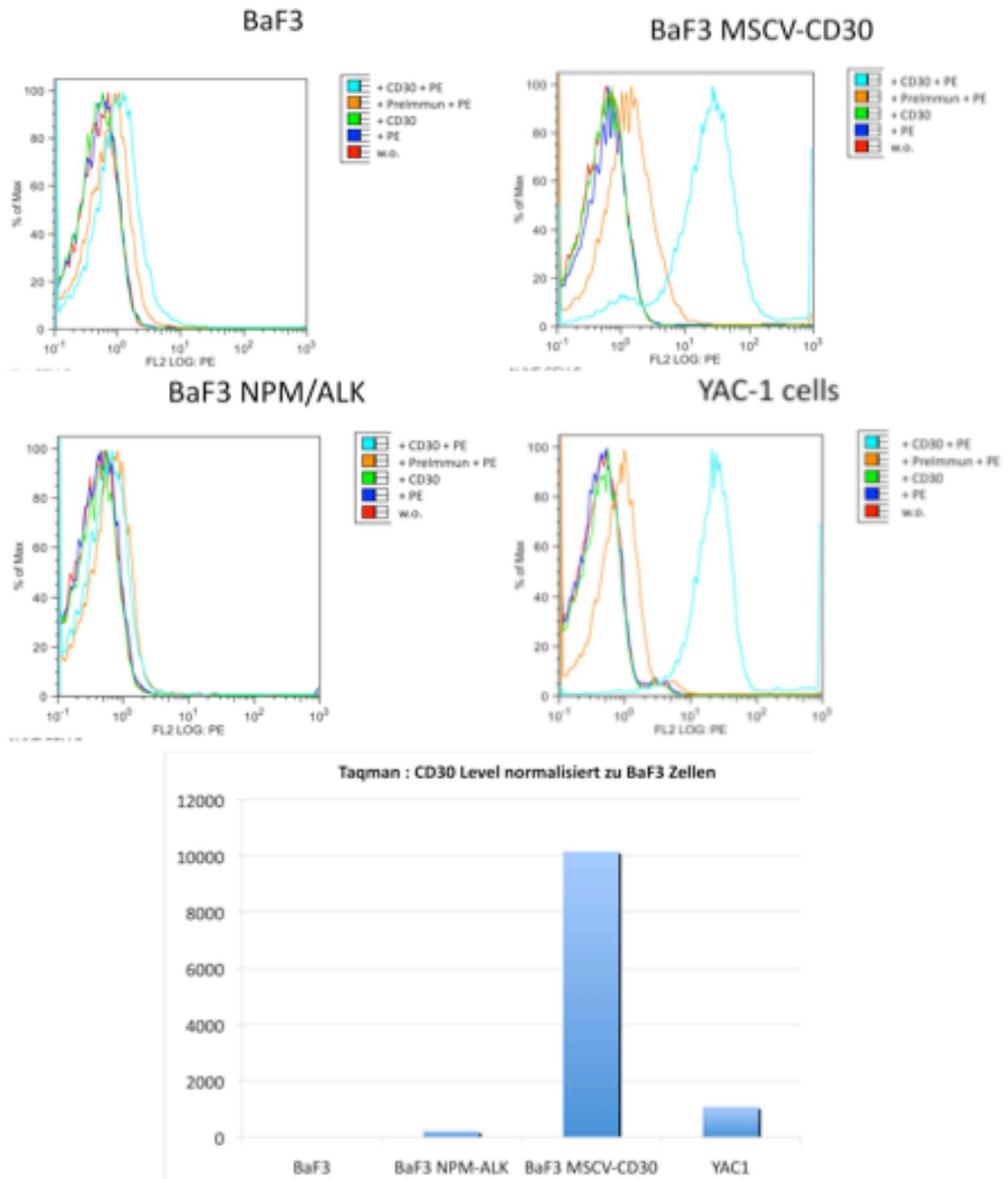


Abb. 33) Charakterisierung des polyklonalen CD30-Antikörpers

Der Antikörper wurde durchflusszytometrisch in verschiedenen murinen Zelllinien getestet (BaF3, BaF3 MSCV-CD30, BaF3 MSCV-NPM/ALK und YAC-1). Zur Kontrolle der Ergebnisse diente eine Real-Time PCR Analyse der CD30-Level. Rot=ungefärbt; Blau=PE-gefärbt; Grün=CD30-gefärbt; Gelb=Preimmun-Serum- und PE-gefärbt; Türkis=CD30- und PE-gefärbt

Hilfe des GST-Taqs aufgereinigt. Das so erhaltene GST-Fusionsprotein ist 55 kDa groß. 2,5 ml an Sepharose gebundenes GST-CD30 Protein mit einer Konzentration von 0,5 ug / ul wurden

an die Firma Davids Biotechnologie versendet. Zwei Kaninchen wurden dreimalig mit 100 µg immunisiert. Das Serum der Tiere wurde zur weiteren Charakterisierung im FACS analysiert. Hierzu wurde der im Serum befindliche Antikörper verdünnt und an verschiedenen murinen Zelllinien ausgetestet. Die Detektion des primären CD30-Antikörpers erfolgte durch die Zugabe eines sekundären PE-gekoppelten Zweitantikörpers (Abb. 33). Die murine, CD30-negative Pre-B-Zelllinie Ba/F3 zeigte keine Interaktion des CD30-Antikörpers, erkennbar an der ausbleibenden Rechtsverschiebung nach CD30- und PE-Färbung (Abb. 33, oben links, türkise Linie). Als in dieser Linie CD30 mittels eines retroviralen Konstruktes (MSCV-CD30) überexprimiert wurde, zeigte sich ein deutlicher Shift (Abb. 33, oben rechts, türkise Linie) und beweist die Sensitivität des generierten Antikörpers gegenüber dem extrazellulären CD30-Epitop. In Ba/F3-Zellen, in denen das Onkogen NPM/ALK exprimiert wird, was zu einem leichten Anstieg der CD30-Expression führt (siehe Real-Time-PCR Analyse Abb. 33 unten) konnte jedoch nur eine leichte Rechtsverschiebung bemerkt werden (Abb.33, Mitte links). YAC-1, eine Zelllinie, die CD30 endogen exprimiert, wurde ebenfalls durchflusszytometrisch getestet (Abb.33, Mitte rechts). Auch hier detektierte der CD30-Antikörper erfolgreich den Rezeptor. Eine Real-Time-PCR Analyse der CD30-Expression in den getesteten Linien zeigt deutlich, dass der CD30-Antikörper das CD30-Protein in einer dosisabhängigen Art nachweist (Abb. 33), unten). Von den oben erwähnten Zellen wurden Lysate gewonnen, um diese im Western Blot weiter zu untersuchen. Jedoch zeigte der CD30-Antikörper hierbei ein unspezifisches Bandenmuster und kann daher nicht für Western Blot Analysen verwendet werden. Immunohistochemisch kann der Antikörper CD30 sehr gut detektieren, wie bereits gezeigt wurde.

4.8 SC71710 - ein neuer, spezifischer ALK-Inhibitor

Mit Hilfe des oben beschriebenen Ansatzes wurde ein Mausmodell des ALCL etabliert, das die menschliche Erkrankung nachzeichnet. Dies ist für ein genaueres Verständnis der Entstehung des ALCL als auch zur Erprobung neuer therapeutischer Substanzen von großer Bedeutung.

Die onkogene Tyrosinkinase NPM-ALK spielt bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des ALCL eine bedeutende Rolle. Daher sind Ansätze spezifische ALCL Tyrosinkinaseinhibitoren bei dieser Erkrankung einzusetzen sehr vielversprechend. Sogenannte "Lead Compounds" sollen vor dem klinischen Einsatz *in vitro* und *in vivo* auf Ihre Wirksamkeit beim ALCL

getestet werden. In mehreren Untersuchungen wurden bereits ALK-Inhibitoren erprobt, jedoch wurden sie nicht zu weiteren klinischen Studien zugelassen^{78,134,135}.

Unser Labor hat eine sehr aktive, langjährig bestehende Kooperation mit der Firma 4SC aus Martinsried. In einem gemeinsam geplanten Projekt wurden Tyrosinkinaseinhibitoren synthetisiert und *in vitro* auf Ihre Spezifität geprüft. Aus dieser Zusammenarbeit entstand der Alk-spezifische Tyrosinkinaseinhibitor SC71710.

4.8.1 SC71710 inhibiert die Kinaseaktivität und Proliferation ALK-positiver Zellen

Parentale, murine Ba/F3-Zellen wurden retroviral mit dem dem Onkogen NPM-ALK infiziert (BaF/3 MIG NPM-ALK) und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert. Im Western Blot zeigte sich eine deutliche Abnahme des phosphorylierten ALK-Proteins in Abhängigkeit der steigenden Konzentration des Inhibitors (Abb. 34). Der Wert, bei dem der Phosphorylierungsstatus von ALK die Hälfte des Ausgangswertes erreicht, der sog. IC50-Wert, liegt im Bereich von etwa 300 nM. Die Level des ALK-Proteins blieben hingegen weitestgehend unverändert.

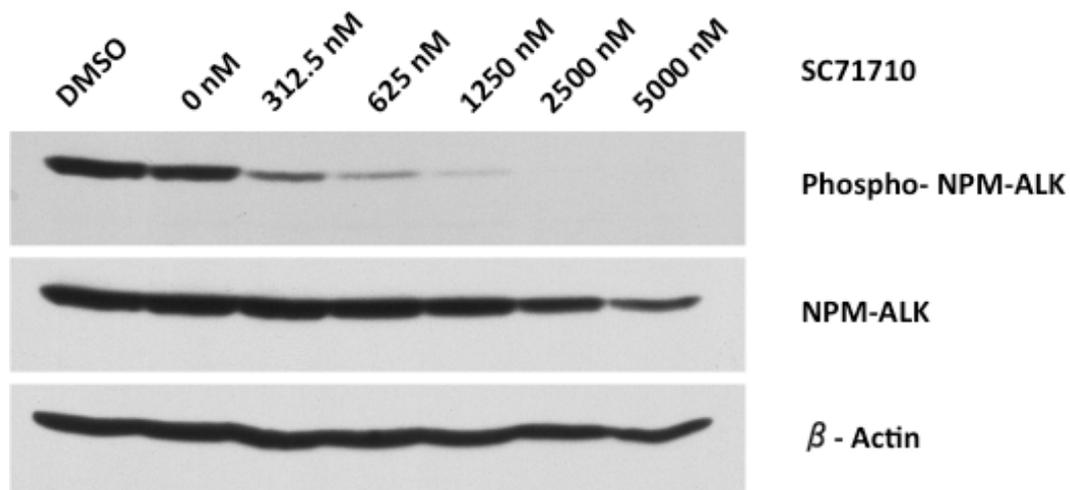


Abb. 34) Spezifische Inhibierung von Phospho-ALK in Abhängigkeit der Konzentration
Parentale, murine BaF/3-Zellen wurden retroviral mit dem Onkogen NPM-ALK infiziert. Anschließend wurden je 2×10^6 Zellen für 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert, lysiert und mit Antikörpern gegen Phospho-ALK, ALK und β -Aktin geblottet.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss des Inhibitors auf die Proliferation von parentalen BaF/3 und BaF/3 MIG NPM-ALK Zellen getestet (Abb. 35)). SC71710 hatte auf die parentalen BaF/3 Zellen, die kein ALK exprimieren, keinen Effekt auf das Zellwachstum bis zu

einer gemessenen Konzentration von 10 μM . Bei den Alk-abhängigen BaF/3 MIG NPM/ALK Zellen hingegen wurde die Proliferation bei einer Konzentration von 1,25 μM inhibiert. Der IC50-Wert, also der Wert bei dem das Wachstum zu 50% reduziert ist, beträgt etwa 340 nM. Da der biochemische und zelluläre IC50-Wert im gleichen Bereich liegen, lässt sich rückfolgern, dass der Wirkstoff gut membrangängig ist. Der Kinaseinhibitor wirkt zudem sehr spezifisch, da er die Kontrollzellen bis zu einer Konzentration von 10 μM nicht in ihrem Wachstum unterdrückt.

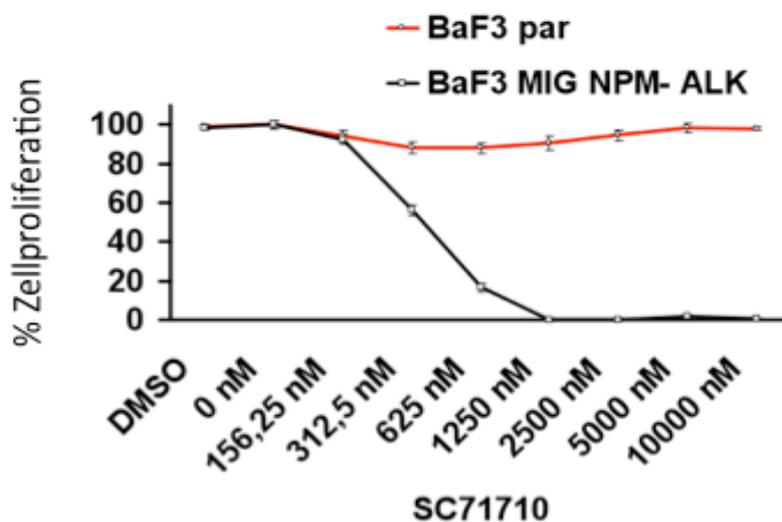
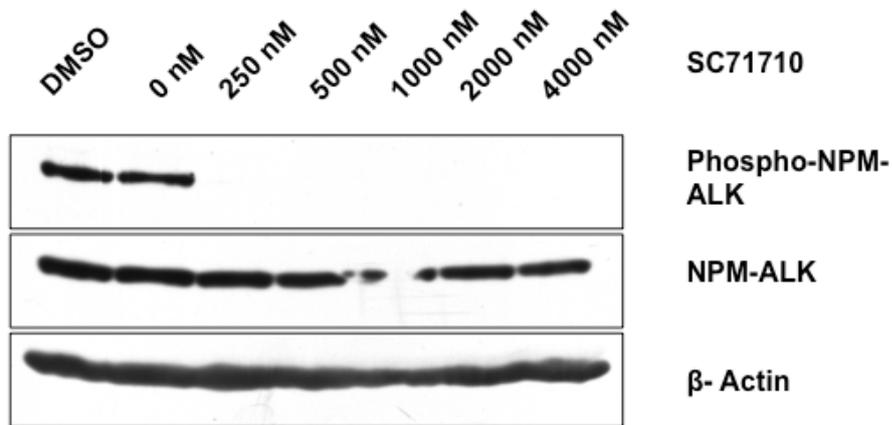


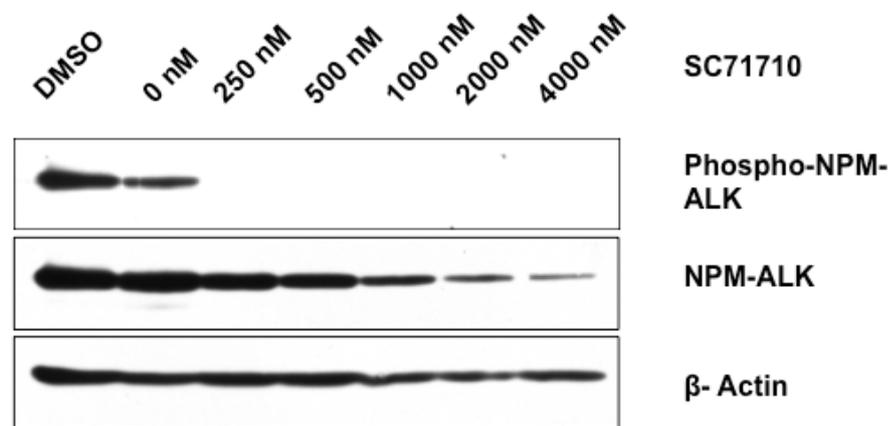
Abb. 35) Proliferation ALK-negativer bzw. ALK-positiver BaF/3 Zellen

Parentale Ba/F3 Zellen und NPM-ALK exprimierende Ba/F3 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von SC71710 behandelt und die Proliferation der Zellen nach 48 Stunden gemessen.

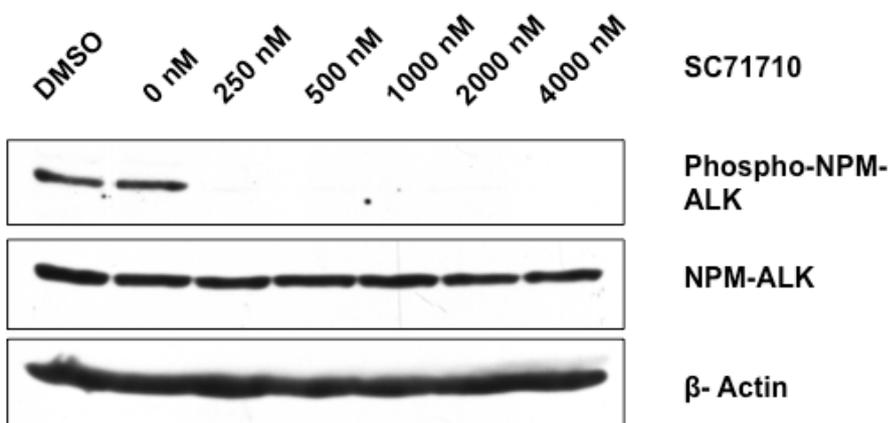
Um die Effektivität von SC-71710 gegenüber humanen Lymphomzelllinien zu untersuchen, wurden die Alk-positiven humanen ALCL Zellen Karpas299, SU-DHL1 und JB6 verwendet, die eine t(2;5) Translokation aufweisen (Abb. 36). Die Zellen wurden steigenden Konzentrationen des Inhibitors für 6h ausgesetzt und anschließend durch Western Blotting der Phosphorylierungszustand des Onkogens analysiert. Dies gibt Aufschluß über die Kinaseaktivität des Proteins. Alle verwendeten ALK-positiven Zelllinien zeigten einen IC50-Wert von unter 250nM. Bei den SU-DHL1 Zellen kam es allerdings zu einer Abnahme der endogenen NPM-ALK Proteinlevel.



Karpas 299



SUDHL1



JB6

Abb. 36) Auswirkungen des Inhibitors auf die Kinaseaktivität ALK-positiver Zelllinien
 SC-71710 reduziert die Kinaseaktivität NPM/ALKs in den ALCL-Linien Karpas299, SU-DHL1 und JB6 in Abhängigkeit der Konzentration.

Auch humane Zelllinien wurden in einem Proliferationsassay genauer auf die inhibitorische Wirkung von SC71710 hin untersucht (Abb. 37). Die ALK-positiven Zelllinien JB6, Sudhl-1 und Karpas299, als auch die humane ALK-negative Hodgkin-Zelllinie HDLM-2 wurden analysiert.

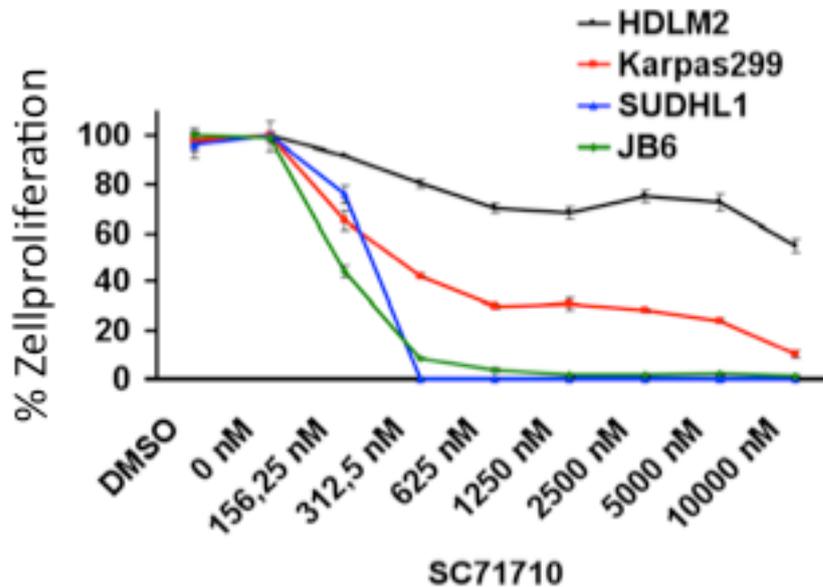


Abb. 37) Proliferation ALK-negativer bzw. ALK-positiver primärer Zelllinien

Primäre Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen des ALK-Inhibitors SC71710 behandelt und die Proliferation nach 48 Stunden gemessen.

Die Kontrollzelllinie HDLM-2 wurde selbst bei einer maximalen Konzentration von 10 μM nicht gravierend in ihrer Proliferation eingeschränkt. Ein Beweis für die Spezifität des ALK-Inhibitors. Die Alk-positiven Zelllinien wurden in ihrem Wachstum gehemmt, mit IC50-Werten von ungefähr 160 nM. Die vorliegenden *in vitro*-Daten gaben Anlass, den Inhibitor in murinen Lymphommodellen zu testen.

4.8.2 SC71710 zur Behandlung muriner ALK-positiver Mausmodelle

In einem Xenograft Mausmodell wurden immundefizienten SCID beige Mäusen 10×10^6 ALK-positiv Karpas299 Zellen subkutan injiziert. Ab einem messbaren Tumolvolumen von 100 mm^3 wurde den Mäusen entweder eine Placebolösung oder der SC71710 Inhibitor intravenös appliziert (veranschaulicht durch Pfeile; 4 Mäuse pro Gruppe; Abb. 38). Bei einem Tumolvolumen von über 1000 mm^3 wurden die Mäuse euthanasiert. Es zeigte sich aber kein Unterschied in der Größe des Tumors zwischen Inhibitor behandelten bzw. unbehandelten Tieren.

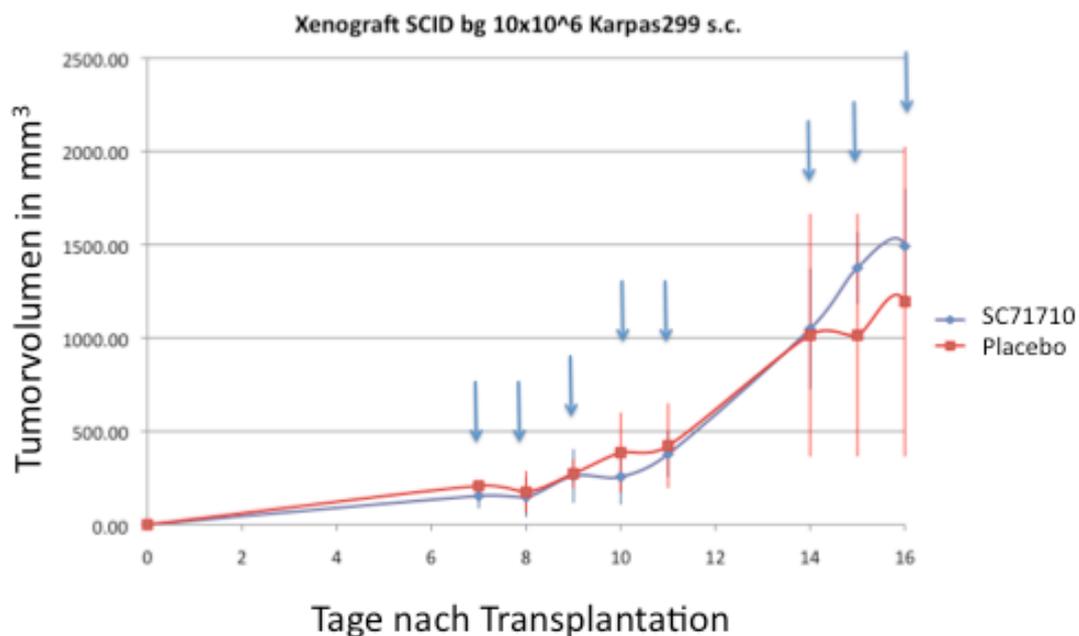


Abb. 38) ALK-positives Xenograft-Mausmodell

SCID beige Mäuse wurden 10×10^6 Karpas299 Zellen s.c. injiziert und anschließend i.v. mit Placebo oder dem Tyrosinkinaseinhibitor (32mg/kg Körpergewicht) behandelt.

In einem syngenem Transplantationsmodell wurden Balb/c Mäuse subletal bestrahlt und 10.000 Ba/F3 par. bzw. Ba/F3 Mig NPM-ALK Zellen i.v. injiziert. Die Gruppen waren wie folgt angeordnet:

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Zellen	Ba/F3	Ba/F3 Mig NPM-ALK	Ba/F3 Mig NPM-ALK
Behandlung	Inhibitor 4SC	Placebo	Inhibitor 4SC

Da keine Daten zur Dosierung und Applizierung des Inhibitors vorlagen, war die Vorgehensweise der Verabreichung, dass den Mäusen ab dem 4.Tag 32 mg/kg Körpergewicht Inhibitor / Placebo i.v. verabreicht wurden. Dies in einem 3 Tage Behandlungs-, 2 Tage Pauserhythmus. Dabei wurde der Allgemeinzustand bzw. das Gewicht der Mäuse kontrolliert. Fiel das Gewicht unter 20 % des Ausgangswertes oder verschlechterte sich der Allgemeinzustand der Mäuse, wurde die Verabreichung unterbrochen. In Abb. 39) ist ein solcher Gewichtsverlauf abgebildet. An Tag 13 wurde die Verabreichung des Inhibitors eingestellt, da die Mäuse unter 20 % ihres Ausgangsgewichts

fielen. Doch wie anhand der Kurven zu erkennen ist (beide Gruppen wurden mit dem Inhibitor behandelt), war dieser Effekt innerhalb einer Woche reversibel.

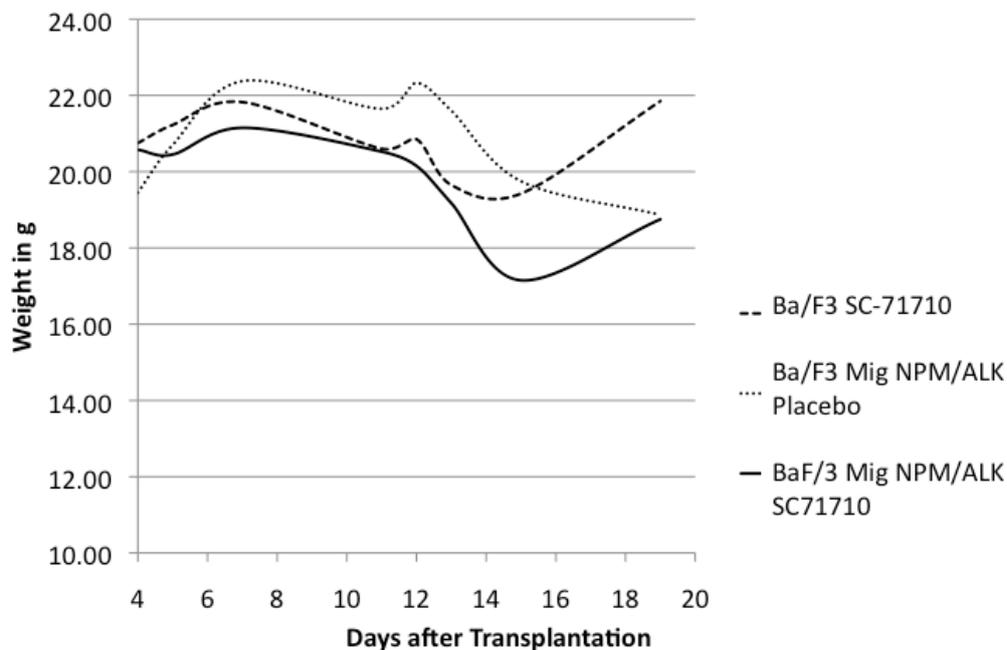


Abb. 39) Gewichtsverlauf behandelter bzw. unbehandelter Balb/c-Mäuse

Das Gewicht aller drei Gruppen wurde täglich kontrolliert. Viel das Gewicht der 4SC-behandelten Mäuse (grüne bzw. rote Kurve) unter 25% bzw. verschlechterte sich der Allgemeinzustand, wurde die Verabreichung des Inhibitors eingestellt.

Am 20. Behandlungstag wurden die Mäuse aller drei Gruppen euthanasiert. Es ergab sich, dass das durchschnittliche Milzgewicht der NPM-ALK transplantierten und mit 4SC-behandelten Mäusen signifikant geringer war im Vergleich zu den Placebo behandelten Mäusen mit 399 zu 623 mg (Abb. 40).

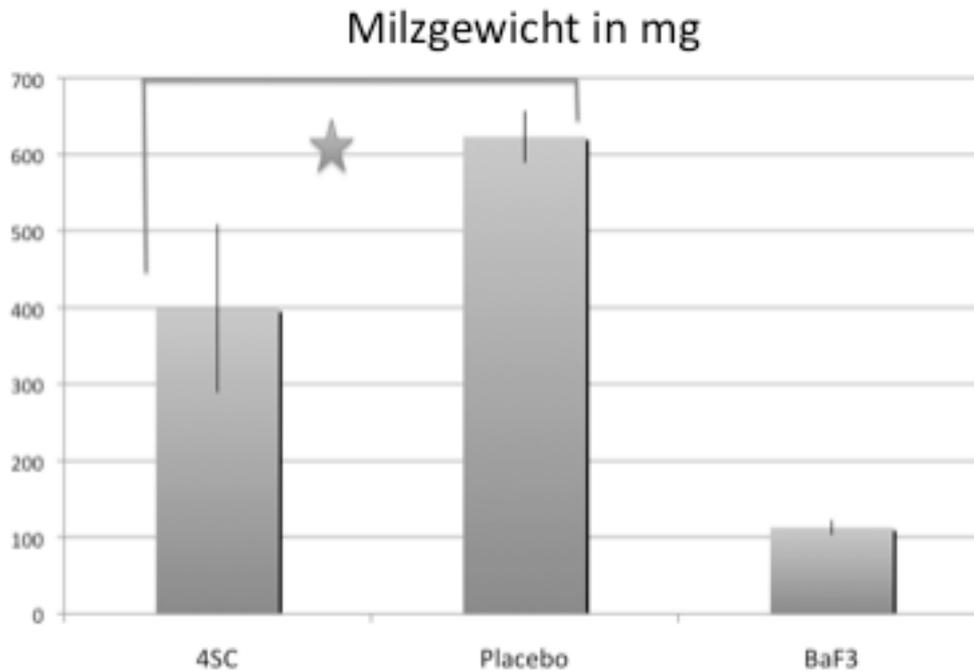


Abb. 40) Durchschnittliche Milzgewichte der drei analysierten Gruppen

Der Mittelwert des Milzgewichtes aller drei Gruppen wurde miteinander verglichen. Die 4SC behandelten NPM-ALK positiven Mäuse hatten ein signifikant reduziertes Milzgewicht im Vergleich zu Placebo behandelten NPM-ALK positiven Mäusen (t-test: $p < 0,05$)

Des Weiteren wurde die CD45-positive Population der Milzzellen, also die hämatopoetischen Zellen, genauer auf ihre EGFP-Expression hin untersucht, was einen Rückschluss auf die NPM-ALK Expression zulässt, da beide Proteine über eine IRES-Sequenz koexprimiert werden. Hierbei zeigte sich, dass die 4SC-behandelten Mäuse mit einem Mittelwert von 23,2 % eine signifikant geringere EGFP-Expression aufwiesen als die Placebo-behandelten Mäuse mit 67,7 % ($p < 0,5$) (Abb. 41) und somit einen geringeren Teil an Alk-positiven Zellen. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der Tyrosinkinaseinhibitor SC71710 *in vitro* eine sehr hohe Spezifität gegenüber dem Onkoprotein NPM/ALK aufweist und in der Lage ist, das Wachstum ALK-positiver Zellen zu inhibieren. *In vivo* zeigte der Inhibitor nicht in allen Tiermodellen eine Wirksamkeit und konnte das Überleben erkrankter Tiere nicht verlängern. Es ist davon auszugehen, dass die Bioverfügbarkeit von SC71710 in Mäusen sehr gering ist, so dass sich kein ausreichender Serumspiegel aufbauen kann, um das Lymphomwachstum soweit zu reduzieren, dass sich ein Überlebensvorteil ergeben könnte.

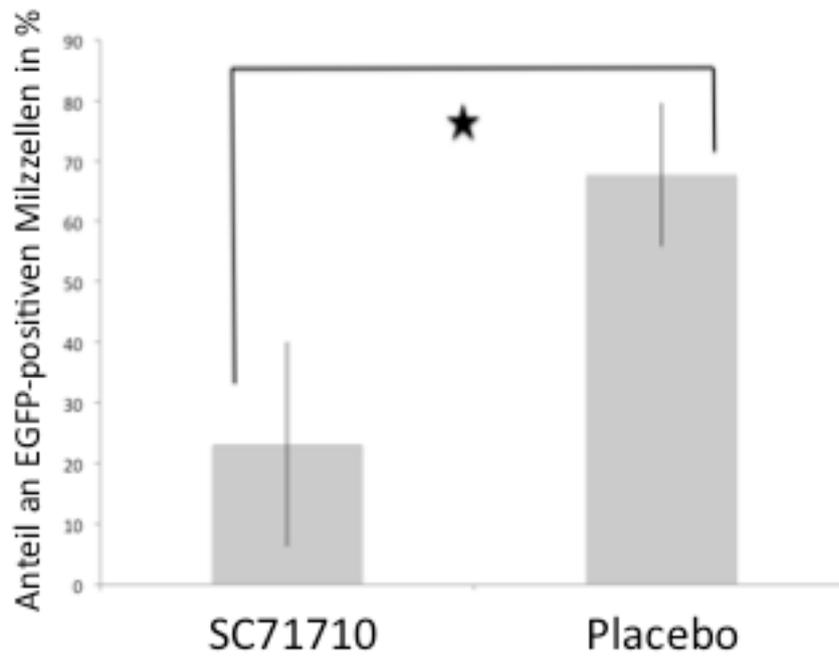


Abb. 41) Durchflusszytometrische Untersuchung der 4SC - bzw. Placebo - behandelten Mäuse

Die Einzelzellsuspension von Milzzellen der 4SC - bzw. Placebo - behandelten Mäuse wurde durchflusszytometrisch auf ihre EGFP-Expression hin untersucht.

5 Diskussion

Kinasen als Bestandteile von Signaltransduktionskaskaden spielen beim kontrollierten Wachstum von Zellen eine entscheidende Rolle. Dies gilt im besonderen Maße für Rezeptortyrosinkinasen im Hinblick auf die Hämatopoese. Gehen hierbei Sicherheitsmechanismen verloren, die zur konstitutiven Aktivierung solcher Kinasen führen kommt es zu einer Fehlregulation der Signaltransduktion. Dies kann im schlimmsten Fall zu vermehrter Zellteilung, Unterbrechung der Differenzierung der Zellen und somit zu einer malignen hämatologischen Erkrankung führen^{136,137}. Um Leukämien und Lymphome gezielt therapieren zu können sind präklinische Forschungen von enormer Wichtigkeit. Hierzu dienen sowohl das Zell- als auch exakte, die menschliche Erkrankung abbildende Mausmodelle, um die ursächlichen Onkogene im Hinblick auf deren transformierende Eigenschaften und Auswirkungen untersuchen zu können und anhand dieses Modells anschließend selektive Inhibitoren gegen deregulierten Proteine zu entwickeln und zu erproben.

5.1 Das großzellig anaplastischen Lymphom (ALCL) im Mausmodell

Seit der Identifizierung des Fusionsproteins NPM-ALK⁵⁸ und seiner Rolle als onkogene Tyrosinkinase die für die Pathogenese der ALCL von entscheidender Bedeutung zu sein scheint, wird versucht ein murines Tiermodell zu etablieren, welches dem humanen ALK-positiven Lymphom entspricht. Bereits kurz nach der Entdeckung von NPM-ALK wurde ein erstes murines NPM-ALK Lymphommodell beschrieben¹⁰³. Hierbei wurde murines Knochenmark mit dem Onkogen NPM-ALK retroviral infiziert und anschließend intravenös in letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Aufgrund des geringen viralen Titers und demzufolge niedrigen Transduktionseffizienz entwickelten vier von sechs Tieren erst nach etwa 14 – 23 Wochen eine plasmazytoide B-Zellen Erkrankung. Die resultierenden Tumore zeigten B-Zell Rearrangements und waren mono- bzw. oligoklonal. Dadurch konnte gezeigt werden, dass NPM-ALK für die Tumorentstehung wichtig, die so beschriebene Durchführung des Experiments aber nicht ausreichend ist, um einen ALCL-typischen, CD30 positiven T-Zell-Phänotyp zu etablieren. Der Grund hierfür könnte sein, dass das Onkogen nicht zellspezifisch genügend exprimiert wurde, da bei diesem Ansatz Gesamtknochenmark infiziert wurde.

Daher ist anzunehmen, dass die im Knochenmark in großer Zahl vorkommenden B-Zellen die eigentliche Ursprungszelle der ALCL überwachsen haben und sich dadurch ein B-Zellphänotyp entwickelt hat. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass die Lymphom-initiierten Zellen der ALCL erst noch weitere Mutationen anreichern, um zu transformieren, wie es bei der akuten, myeloischen Leukämie diskutiert wird¹³⁸⁻¹⁴⁰ (Second-Hit-Hypothese). Diesem langwierigen Prozess der Akkumulation stehen die relativ kurzen Latenzzeiten gegenüber, so dass die Tiere erkranken, bevor sich die ALCL-induzierenden Zellen angereichert haben.

Ein weiteres Tierversuchsmodell verwendete IL-9 transgene Spendermäuse¹⁰⁴. Einige IL-9 transgene Mäuse entwickeln spontan neoplastische Infiltrate des Thymus. Durch die virale Infektion dieses KM mit NPM-ALK erhoffte man sich daher Alkome (ALK-positive Lymphome) mit T-Zell Ursprung. Es zeigte sich zwar, dass durch das transduzierte NPM-ALK der Anteil an thymischen Lymphomen stieg, jedoch waren diese Lymphome meist plasmazytoiden / plasmablastischen Ursprungs und wiesen weder T-, noch B- Oberflächenmarker auf.

Auch transgene Mausmodelle wurden verwendet, um eine ALCL-typische murine Erkrankung zu generieren. So wurde z.B. NPM-ALK unter die Kontrolle eines minimalen CD4-Promotors¹⁴¹ gesetzt und auf Balb/c bzw. C57bl6 Mäuse zurückgekreuzt¹⁰⁵. Eine dieser so erzeugten Mauslinie entwickelte plasmazytoide B-Zell Lymphome, die zudem positiv für den Oberflächenrezeptor CD138 waren, ähnlich den zuvor beschriebenen retroviralen Infektions- / Transplantationsmodellen. Ein weiterer Mausstamm hingegen brachte neoplastische Thymi mit einer Latenz von etwa 18 Wochen hervor. Diese Tumore waren T-Zellspezifisch und zeigten T-Zellrezeptor Rearrangements. Die Expression spezifischer T-Zell-Marker war jedoch unterschiedlich. In dieser Arbeit wird zwar die Expression des ALCL-Markers CD30 auf den Lymphomen erwähnt, jedoch nicht gezeigt und ist daher fraglich. Außerdem entwickelten die Tiere kein systemisches Lymphom, sondern ein Thymom. Dies könnte daran liegen, dass die CD4-positiven Zellen, die das Onkogen exprimieren, hauptsächlich im Thymus und dem Blut zu finden sind. Dennoch zeigt dieses Modell als erstes, dass die linienspezifische Expression von NPM-ALK die Fähigkeit besitzt, Lymphome des T-Zell Ursprungs zu induzieren.

In einem weiteren transgenen Mausmodell wurde NPM-ALK unter die Kontrolle des vav-Promotors gestellt, welcher in allen frühen hämatopoetischen Linien aktiv ist¹⁰⁶. Bei den hieraus resultierenden neun Mauslinien gingen zwei Stämme hervor, die Lymphome

entwickelten. Ein Stamm zeigte erneut plasmazytoide Merkmale ähnlich den bereits erwähnten Erkrankungen mit Latenzzeiten von drei bis sechs Monaten. Ein weiterer bildete nur in etwa 10 % der Fälle Lymphome aus, die ebenfalls B-Zellmarker und zum Teil auch CD30 exprimierten. Die phänotypische Verteilung kann dadurch erklärt werden, dass der *vav*-Promotor in allen hämatopoetischen Zellen aktiv ist und sich dadurch sowohl B-, als auch T-Zelllymphome entwickeln können.

Auch Xenograft Modelle wurden angewandt, um ein möglichst genaues Abbild der humanen ALCL im murinen System zu etablieren. Hierbei wurden sowohl humane ALCL Zelllinien¹⁴², als auch primäres Patientenmaterial¹²⁸ in immundefiziente Mäuse injiziert. Die daraus resultierenden Lymphome entsprachen dadurch der Primärerkrankung. Die Behandlung mit anti-CD30 spezifischen Antikörpern inhibierte das Tumorwachstum signifikant und legt daher die Bedeutung des Oberflächenmarkers CD30 bei dieser Erkrankung nahe¹⁴³.

Ziel der Arbeit war es nun, das Onkogen NPM/ALK linien- und differenzierungsspezifisch zu exprimieren, um dadurch die Ursprungszelle der ALCL zu transformieren, was zur Entwicklung eines systemischen Lymphoms (Alkom) führen sollte. Durch die Einführung eines retroviralen Vektors, dessen Stopkassette von loxP-Seiten flankiert ist, die durch das Enzym Cre Rekombinase erkannt und deletiert werden kann, können Gene *in vitro* und *in vivo* zeitsparend und gezielt linienspezifisch exprimiert werden (Abb. 8). Der Vektor wurde *in vitro* ausgiebig auf seine einwandfreie Funktion hin untersucht. Es zeigte sich, dass das RFP-kodierende Konstrukt in der Lage war, die Translation von Genen die der Stopkassette nachgeschaltet waren, erfolgreich zu unterbrechen. Durch die Expression von Cre in Gegenwart des Stopkonstrukts, konnte die loxP flankierte Stopkassette deletiert und nachgeschaltete Gene exprimiert werden. Die translationale Terminierung funktionierte aber nur mit dem Stopkonstrukt, welches den Fluoreszenzmarker RFP enthielt. Daraus lässt sich ableiten, dass die drei translationalen Stops in der Kassette nicht allein ausreichend sind, um die Translation zu inhibieren. In der Literatur finden sich Hinweise, dass die Faltung der RFP mRNA sich negativ auf deren Expression auswirkt^{126,127}. Durch die Ausbildung sogenannter hairpin-Strukturen der RFP mRNA wird die Translation frühzeitig abgebrochen. Daher ist anzunehmen, dass die inhibitorische Sekundärstruktur der RFP mRNA mit ausschlaggebend für den Abbruch der Translation und dadurch der nachgeschalteten Gene ist. Dies würde die Undurchlässigkeit der Stopkassette und die fehlende RFP-Expression in Abwesenheit der Cre-Rekombinase erklären.

Der Stopvektor wurde dann *in vivo* getestet, um die phänotypischen Auswirkungen der linien- und differenzierungsspezifisch Translation von NPM/ALK zu untersuchen. Knochenmark von Mäusen, die Cre unter verschiedenen linienspezifischen Promotoren exprimieren, wurden mit dem Konstrukt infiziert. Zur Kontrolle wurde wildtypisches Knochenmark, welches kein Cre exprimiert, infiziert und transplantiert. Diese Mäuse entwickelten keine Anzeichen einer Erkrankung in einem Beobachtungszeitraum von bis zu acht Monaten, was ein Indiz für die Undurchlässigkeit des Stop-NPM/ALK Vektors (MSNAIE) *in vivo* ist. Ganz im Gegensatz zu dem Cre-exprimierenden Knochenmark, welches immer eine Erkrankung induzierte. So erkrankten Mäuse, die mit MSNAIE infiziertem Lysm-Cre Knochenmark transplantiert wurden innerhalb eines Monats. Granzyme B-Cre transplantierte Mäuse lebten etwa zwei Monate. CD4-Cre bzw. Lck-Cre infizierte und transplantierte Mäuse erkrankten in einem Zeitraum von drei bzw. fünf Monaten. Dies unterstreicht das starke Potential von NPM/ALK zur Transformation und die Fähigkeit *in vivo* eine Erkrankung zu induzieren. Retrovirale Insertionsmutagenese Analysen der erkrankten Tiere werden zeigen, ob weitere Faktoren zur Erkrankung beigetragen haben (sog. Second hit – Hypothese) ⁷⁸. Dies könnte nämlich eine Erklärung für die unterschiedlichen Latenzzeiten in den verschiedenen Modellen sein. So könnten sich in den LysM-Cre Mäusen im Vergleich zu den Lck-Cre Mäusen weitere Mutationen früher akkumuliert haben, was demzufolge zu einer rasanteren Erkrankung führt. Ein weiterer Grund könnte aber auch die unterschiedliche Anzahl der einzelnen Zelltypen im Knochenmark der Maus sein. Myeloide Vorläuferzellen liegen zu etwa 70% vor, während lymphoide Progenitoren einen Anteil von circa 30% ausmachen (Lee, A. (1999) Wintrobe's Hematology, Lippincott, p. 23-25). Dadurch können deutlich mehr myeloide Zellen infiziert werden und somit eine schnellere Erkrankung hervorrufen.

5.2 NPM-ALK führt nicht zur Transdifferenzierung

Die Frage, ob NPM/ALK zu einer Transdifferenzierung führt, also die Möglichkeit besitzt, den Phänotyp einer Zelle zu verändern bzw. den Typ einer Zelle umzuwandeln, konnte bislang nicht eindeutig beantwortet werden. Bei der Entität des Hodgkin-Lymphoms ist es der Fall, dass die Ursprungszelle aus der B-Zelllinie entstammt, diese aber auch spezifische T-Zellmarker wie CD30 exprimiert ¹²⁹. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Herunterregulierung des B-Zell determinierenden Transkriptionsfaktor E2A die gesamte B-

Zelldifferenzierung hemmt und somit eine Erklärung für den einzigartigen Phänotyp der Hodgkin-Lymphome sein könnte¹⁴⁴.

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, führte die Transplantation von infizierten Knochenmarkszellen die Cre unter einem myeloiden Promotor exprimieren zu einer histiozytären Erkrankung (Abb. 17). Die GrzmB-Cre transplantierten Mäuse entwickelten aber einen gemischten T-NHL / histiozytären Phänotyp. Die Aktivität des GrzmB-Promotors auch in myeloiden Zellen konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden, indem der MSE-Vektor in Knochenmarkszellen verschiedener Cre-transgener Mäuse eingebracht und anschließend transplantiert wurde (Abb. 15). Bei den GrzmB-Cre Mäusen erkennt man bereits die fehlende Spezifität des Promotors, da EGFP nicht nur im T-Zell-, sondern auch im myeloiden Kompartiment detektiert wird. Somit ist die „Leackyness“ des GrzmB-Promotors für den gemischten Phänotyp der Erkrankung verantwortlich und unterstreicht weiterhin die Hypothese, dass gerichtete NPM-ALK Expression nicht zu einer Transdifferenzierung, sondern zu einer Erkrankung der Zellen führt, in dem das Onkogen exprimiert ist. Dasselbe zeigt sich für die CD4-Cre Mäuse, deren Promotor nicht ausschließlich in T-Zellen, sondern, auch zu einem gewissen Maß in myeloiden Kompartiment aktiv ist (Abb. 15). Diese Mäuse erkrankten infolgedessen auch an einem gemischten myeloiden / T-Zell Phänotyp. Erwartungsgemäß zeigten MSE-infizierte Wildtyp-Zellen keine EGFP-positive Population, da in diesen Zellen kein Cre exprimiert und dadurch die Stopkassette nicht deletiert werden kann. Der Lck-Cre Promotor, welcher ausschließlich in frühen T-Zellen aktiv ist, induzierte eine reine T-Zell-Erkrankung (Abb. 24). Diese Daten legen nahe, dass NPM/ALK keine Transdifferenzierung einleitet, sondern den Phänotyp begünstigt, in deren Zelle das Protein zur Expression kommt. Dies zeigt, dass die hämatopoetische Linie, in der das Onkogen exprimiert wird von äußerst wichtiger Bedeutung für den malignen Phänotyp ist. Desweiteren konnte in anderen Arbeiten zudem gezeigt werden, dass NPM/ALK durch Aktivierung von Stat3 in der Lage einen T-Zell-regulatorischen (Treg) Phänotyp zu fördern^{145,146}. Dadurch kommt es zur erhöhten Expression von IL-10, FoxP3 und TGF- β . Dies hat zum einen zur Folge, dass die Zellen aufgrund der erhöhten Zytokinproduktion von IL-10 vermehrt proliferieren und zum anderen aufgrund des Treg-Charakters eine immunsupprimierende Wirkung auf das körpereigene Abwehrsystem haben¹⁴⁷. Die Tumorzellen sichern sich hierdurch den Vorteil, nicht von der Immunabwehr erkannt und angegriffen zu werden.

5.3 Die Ursprungszelle der Translokation t(2;5) ist eine frühe T-Zelle

Wird murines Knochenmark mit dem Onkogen BCR/ABL infiziert und anschließend transplantiert, so entwickelt sich eine chronisch, myeloide Leukämie, ähnlich der humanen Erkrankung¹⁴⁸. Nachdem das Philadelphia Chromosom auch in myeloiden, erythroiden, megakaryoiden und B-lymphoiden Linien zu finden ist, wird davon ausgegangen, dass die Ursprungszelle der BCR/ABL Translokation Multiliniien- und Differenzierungspotenzial hat, wie es bei einer hämatopoetischen Stammzelle der Fall ist^{149,150}.

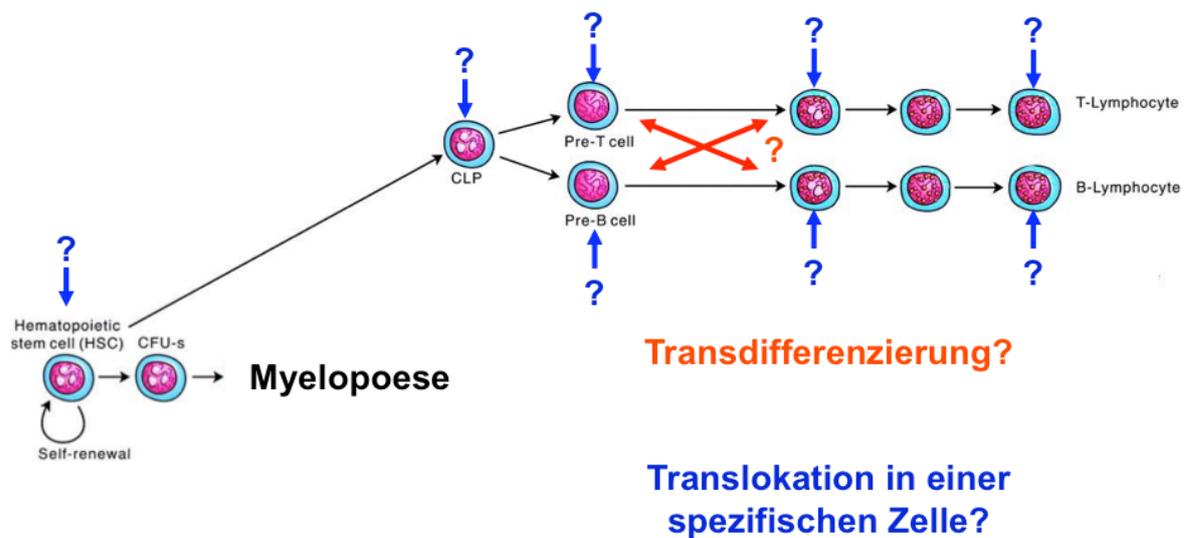


Abb. 42) Die Zielzelle der t(2;5) Translokation

Eine Frage des ALCL ist, ob die Translokation von NPM-ALK in einer T-lymphoiden Vorläuferzelle oder in einem anderen Zelltyp stattfindet und ob diese bereits in frühen Progenitorzellen existiert. Desweiteren ist unklar, ob die Translokation erst im Rahmen der T-Zellentwicklung zur Transformation führt oder spezifisch die T-Zell-Reifung fördert.

Die Expression des Onkogens NPM/ALKs in Knochenmarkszellen und deren anschließende Transplantation in letal bestrahlte Mäuse führte zu einem histiozytären bzw. plasmazytoiden Phänotyp^{63,103}. Dies kann daran liegen, dass bei dieser Methode Gesamtknochenmark infiziert wurde und somit die eigentliche Zelle, die für den Phänotyp der ALCL verantwortlich ist, verdrängt wird. So kann es sein, dass die Zelle von der die t(2;5) Translokation ausgeht, von anderen transformierten Zelltypen, die NPM/ALK überexprimieren, überwachsen wird. Auch die gerichtete Expression unter dem vav-Promotor, aktiv in allen hämatopoetischen Zellen, dem $\epsilon\mu$ SR α -Promotor, angeschaltet in B-Zellen oder dem CD4-, als auch dem CD2-Promotor, hauptsächlich aktiv in T-Zellen, führte zu keiner CD30-positiven, T-lymphoiden Erkrankung^{104-106,122,123}. Dieses Phänomen zeigt, dass es äußerst wichtig ist, den richtigen

Promotor zu finden, unter welchem NPM/ALK exprimiert werden muss, um einen T-Zell Phänotyp zu generieren. Die Frage, warum in die T-Zellspezifischen Promotoren CD2 und CD4 keine reine T-Zellerkrankung induzierten, konnte in dieser Arbeit damit beantwortet werden, dass zumindest der CD4-Promotor zusätzliche Aktivität im myeloiden Kompartiment aufweist (Abb. 15). Es ist anzunehmen, dass Gleiches für den CD2-Promotor gilt, wobei dies noch nicht belegt werden konnte.

Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Translokation von NPM und ALK bereits andere Faktoren vorausgehen. So zum Beispiel die gesteigerte Expression von Genen wie Fra2 und JunB in der Nähe des Translokationspunktes und der Annahme, dass die anschließende t(2;5) Translokation eine Begleiterscheinung durch die bereits vorliegende Nähe der Chromosomen 2 und 5 ist¹⁰⁹. Eine untergeordnete Rolle NPM/ALKs bei dem ALCL ist allerdings eher fraglich, denn die Abhängigkeit großzellig-anaplastischer Lymphomzellen von der ALK-Kinaseaktivität konnte zweifelsfrei bestätigt werden^{78,151}.

Um die Frage des Translokationsursprungs NPM-ALKs ausreichend beantworten zu können ist es daher wichtig, ein Mausmodell zu entwickeln, welches eine linienspezifische Expression von NPM-ALK *in vivo* ermöglicht (Abb. 42). Dies kann dadurch erreicht werden, indem die Expression von NPM-ALK unter Zuhilfenahme von zellspezifischen Promotoren in bestimmten Zelltypen aktiviert wird. Hierzu würde sich das klassische *knock-in* Prinzip anbieten¹⁵². Um aber verschiedene Promotoren testen zu können, wäre der zeitliche Aufwand hierfür enorm. Daher bietet sich das retrovirale Knochenmarksinfektion- / Transplantationsmodell an. In den vorliegenden Experimenten wurde das Onkogen unter die Kontrolle des stark ubiquitär aktiven, viralen LTR-Promotor gebracht, um die Expression des Onkogens mittels Cre-loxP Rekombination zu aktivieren. Ein System, welches derzeit erfolgreich *in vitro* und *in vivo* eingesetzt wird, um Gene konditionell aus- bzw. einzuschalten¹⁵³.

Mit der zuvor beschriebenen Methode der linienspezifischen Expression NPM/ALKs, ist es gelungen durch Benutzung des Lck-Cre Knochenmarks, dessen Infektion und Transplantation das erste Mausmodell zu generieren, welches der humanen Erkrankung in vielen Aspekten ähnelt. Deshalb ist anzunehmen, dass die t(2;5) Translokation in einer frühen T-Zelle stattfindet, denn alle anderen verwendeten Promotoren zur konditionalen Expression von NPM/ALK führten nicht zu einer ALCL-typischen Erkrankung (Abb. 43). In unseren Experimenten zeigten hingegen alle Lck-Cre transplantierten Mäuse einen CD30-positiven T-

lymphoiden Phänotyp in allen hämatopoetisch wichtigen Organen (Abb. 24), mit vergrößerten Thymi und Lymphknoten (Abb. 29)). Es ist gelungen ein systemisches Lymphom zu generieren, das Hauptcharakteristika des humanen großzellig-anaplastischen Lymphoms. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die malignen Zellen bereits rearrangierte T-Zell-Rezeptor-Gene besitzen (Daten nicht gezeigt), wie es beim humanen ALCL auch anzutreffen ist. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass primär sehr frühe T-Zellen das Onkogen exprimieren (CD25-/CD44+/CD4-/CD8-) und der Anteil an reifen T-Zellen sehr gering ist (CD4+ bzw. CD8+). Dies könnte bedeuten, dass NPM/ALK zu einem Differenzierungsblock in der Entwicklung der T-Zelllinie führen kann. Weitere Experimente werden zeigen, ob diese frühen T-Zellen auch CD30 exprimieren. Somit wären diese frühen Vorläuferzellen ein interessantes Ziel für eine gerichtete CD30-Antikörpertherapie. Des Weiteren wird untersucht werden, mit welcher Frequenz die Lymphom-initiierenden Zellen in dieser Population vorliegen. Hierfür sind weitere Transplantationsexperimente geplant, bei denen CD25- / CD44+ angereicherte Zellen in unterschiedlichen Verdünnungsreihen transplantiert werden, um zu sehen, ab welcher Zellzahl sich einer Erkrankung etablieren lässt. Überdies hinaus werden Lck-Cre Mäuse in einen CD30-defizienten Hintergrund gekreuzt, um das Knochenmark dieser Mäuse mit dem MSNAIE-Vektor zu infizieren und zu transplantieren. Dadurch kann der Einfluss des Oberflächenmarkers CD30 auf die Pathogenese des ALCL genauer evaluiert werden.

Mit Hilfe des zuvor beschriebenen Ansatzes wurde ein Mausmodell des ALCL etabliert, das die menschliche Erkrankung detailgenau nachzeichnet. Dies ist für ein tieferes Verständnis der Entstehung des ALCL, als auch zur Erprobung neuer therapeutischer Substanzen von großer Bedeutung. Die gezielte Expression von NPM/ALK in verschiedenen Zielzellen kann weiterhin einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Pathophysiologie des ALCL leisten. Da diese Methode prinzipiell auch auf andere Gene angewandt werden kann, ergibt sich darüber hinaus ein weites Feld an Anwendungsmöglichkeiten, das in verschiedenen Bereichen der hämatologischen Forschung von Nutzen sein kann.

Mausmodell	Phänotyp
KM-Transplantation Niedriger NPM-ALK Virustiter	B-lymphoid / Plasmazytoid
KM-Transplantation Hoher NPM-ALK Virustiter	Histozytär
Il-9 transgen Retrovirale NPM-ALK Infektion	Plasmazytoid / T- lymphoid
CD4 transgen	Plasmazytoid / T- lymphoid
Vav transgen	Plasmazytoid
Xenograft ALCL-Patient	CD30 positiv; T-lymphoid
LysM-Cre	Myeloid / histozytär
GrzmB-Cre	Gemischt myeloid / T-lymphoid
CD4-Cre	Gemischt myeloid / T-lymphoid
Lck-Cre	CD30 positiv; T-lymphoid

Abb. 43) Übersicht der ALCL-Mausmodelle

5.4 Der spezifische Alk-Inhibitor 4SC-71710

Die Erfahrungen mit Imatinib bei der chronisch, myeloischen Leukämie und den cKit-positiven Gastrointestinalen Stromatumoren haben eindeutig gezeigt, dass Tyrosinkinaseinhibition ein sehr erfolgreicher Ansatz sein kann¹⁵⁴. Voraussetzung ist, dass das Kinase Target exakt definiert ist und für die molekulare Pathogenese der jeweiligen Erkrankung verantwortlich ist. Genau diese Voraussetzungen sind beim ALK-positiven ALCL in idealer Weise erfüllt. Die erfolgreiche Entwicklung eines ALK-spezifischen Kinaseinhibitors könnte nicht nur zur Behandlung von ALCL Patienten eingesetzt werden, die nach konventioneller Therapie rezidivieren, sondern könnten evtl. in Zukunft auch den Kindern und Jugendlichen, die von dieser Erkrankung in der Mehrzahl der Fälle betroffen sind, eine intensive und toxische Chemotherapie ersparen. Es wurde schon vielfältig versucht die Aktivität der ALK-Kinase zu unterdrücken. Mittels hammerhead-ribozyme vermittelter oder short interfering RNA-basierender Methoden, bei denen prinzipiell das ALK-Transkript erkannt und abgebaut wird, so dass erst keine aktive Kinase translatiert werden kann^{155,156}.

Aber auch die bereits erwähnten Tyrosinkinaseinhibitoren wurden bei dieser Erkrankung erprobt^{134,135}, aber in klinischen Studien nicht weiter getestet. Ein bereits an Patienten getesteter Inhibitor 4SC-71710 zur Behandlung der akuten, myeloischen Leukämie zeigte in einem Kinaseprofil ebenfalls eine potentiell gute Wirksamkeit gegenüber ALK. Aus diesem Grund wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Firma 4SC aus Martinsried, dieser Inhibitor *in vitro* und *in vivo* weiter auf seine Effektivität gegenüber Alk-exprimierenden Zellen (Abb. 35)), Zelllinien (Abb. 37)) und in einem Mausmodell getestet (Abb. 39)). Es zeigte sich eine hohe Spezifität und Wirksamkeit des Inhibitors gegenüber der ALK-Kinase mit IC50-Werten von 350 nM für ALK-exprimierende Ba/F3-Zellen bzw. Werten von unter 200 nM für primäre ALCL-Zelllinien. ALK-negative Zellen bleiben bei Konzentrationen von bis zu 10 µM unbeeinträchtigt. Bei *in vivo* Analysen wurden Balb/c Mäusen i.v. NPM/ALK positive Ba/F3 injiziert und diese mit dem Inhibitor bzw. dem Placebo behandelt. Nach 20 Tagen wurden die behandelten Mäuse analysiert und es zeigte sich eine Reduktion bezüglich der pathologisch bedingten Milzvergrößerung, als auch dem Anteil ALK-positiver Zellen in der Milz in der Gruppe, die mit dem ALK-Inhibitor behandelt wurde. Ein Überlebensvorteil der Inhibitor-behandelten Mäuse war jedoch nicht zu beobachten. Auch in anderen ALCL-ähnlichen Tiermodellen zeigte der Inhibitor keine Wirkung. Es daher davon auszugehen, dass die Verfügbarkeit von 4SC-71710 *in vivo* zu gering ist, um wirksame Konzentrationen des Inhibitors im Serum aufzubauen, so dass sich die induzierten Lymphome zurückbilden und daraus ein Überlebensvorteil für die Mäuse entsteht. Weitere *in vivo* Untersuchungen des Inhibitors in dem zuvor beschriebenen T-Zell spezifischen Transplantationsmodell wären daher sinnvoll.

Zusammenfassend ist es gelungen, mit der oben aufgeführten Methode ein Mausmodell zu etablieren, welches einen CD30-positiven, T-lymphoiden Phänotyp aufweist, mit Infiltrationen des Lymphknotens, Thymus, Knochenmarks und der Milz. Es handelt sich hierbei um ein systemisches Lymphom und spiegelt die humane Erkrankung in vielen Punkten wieder. Dieses Modell kann nun verwendet werden, um das Onkogen NPM/ALK im Hinblick auf dessen transformierende Eigenschaft und Auswirkung näher zu untersuchen und damit selektive Inhibitoren, wie z.B. 4SC-71710, gegen das deregulierte Proteine zu entwickeln und zu testen. Auf lange Sicht könnte somit die intensive und mit vielen

Nebenwirkungen behaftete Behandlung einer Chemotherapie am Patienten reduziert oder sie sogar durch spezifische Inhibition der onkogenen Tyrosinkinase ersetzt werden.

6 Referenzen

1. Karin M. Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J.* 1992;6:2581-2590.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
3. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, et al. Oncogenes and signal transduction. *Cell.* 1991;64:281-302.
4. Hunter T. Signaling--2000 and beyond. *Cell.* 2000;100:113-127.
5. Jordan JD, Landau EM, Iyengar R. Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell.* 2000;103:193-200.
6. Pawson T, Nash P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* 2000;14:1027-1047.
7. Hunter T. Protein kinase classification. *Methods Enzymol.* 1991;200:3-37.
8. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002;298:1912-1934.
9. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000;19:5548-5557.
10. Rodrigues GA, Park M. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:15-24.
11. Fukuda M, Bierhuizen MF, Nakayama J. Expression cloning of glycosyltransferases. *Glycobiology.* 1996;6:683-689.
12. Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood.* 1985;66:848-858.
13. Stein H, Foss HD, Durkop H, et al. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood.* 2000;96:3681-3695.
14. Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood.* 2007;110:2259-2267.
15. Morris SW, Xue L, Ma Z, Kinney MC. Alk+ CD30+ lymphomas: a distinct molecular genetic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* 2001;113:275-295.
16. Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood.* 1996;88:4005-4011.

17. Bonzheim I, Geissinger E, Roth S, et al. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood*. 2004;104:3358-3360.
18. Savage KJ, Harris NL, Vose JM, et al. ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*. 2008;111:5496-5504.
19. Gascoyne RD, Aoun P, Wu D, et al. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 1999;93:3913-3921.
20. Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, et al. Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood*. 1995;86:1954-1960.
21. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, et al. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*. 1999;93:2697-2706.
22. Shulman LN, Frisard B, Antin JH, et al. Primary Ki-1 anaplastic large-cell lymphoma in adults: clinical characteristics and therapeutic outcome. *J Clin Oncol*. 1993;11:937-942.
23. Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell*. 1992;68:421-427.
24. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*. 1994;76:959-962.
25. Smith CA, Gruss HJ, Davis T, et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell*. 1993;73:1349-1360.
26. Marsters SA, Frutkin AD, Simpson NJ, Fendly BM, Ashkenazi A. Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding. *J Biol Chem*. 1992;267:5747-5750.
27. Welcher AA, Bitler CM, Radeke MJ, Shooter EM. Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:159-163.
28. Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA, Shooter EM. Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem*. 1992;267:8352-8359.
29. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*. 1993;73:431-445.
30. Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*. 1996;12:1-9.

31. Froese P, Lemke H, Gerdes J, et al. Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus-transformed human B and T lymphoid cell lines. *J Immunol.* 1987;139:2081-2087.
32. Nawrocki JF, Kirsten ES, Fisher RI. Biochemical and structural properties of a Hodgkin's disease-related membrane protein. *J Immunol.* 1988;141:672-680.
33. Fonatsch C, Latza U, Durkop H, Rieder H, Stein H. Assignment of the human CD30 (Ki-1) gene to 1p36. *Genomics.* 1992;14:825-826.
34. Gedrich RW, Gilfillan MC, Duckett CS, Van Dongen JL, Thompson CB. CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. *J Biol Chem.* 1996;271:12852-12858.
35. Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood.* 1995;85:3378-3404.
36. Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E. The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci.* 1995;20:342-344.
37. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005;115:1-20.
38. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995;81:495-504.
39. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 1996;84:299-308.
40. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996;85:803-815.
41. Goldfarb D, Michaud N. Pathways for the nuclear transport of proteins and RNAs. *Trends Cell Biol.* 1991;1:20-24.
42. Chan WY, Liu QR, Borjigin J, et al. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry.* 1989;28:1033-1039.
43. Bischof D, Pulford K, Mason DY, Morris SW. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol.* 1997;17:2312-2325.
44. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell.* 1989;56:379-390.

45. Chan PK, Chan FY. Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1262:37-42.
46. Liu QR, Chan PK. Formation of nucleophosmin/B23 oligomers requires both the amino- and the carboxyl-terminal domains of the protein. *Eur J Biochem*. 1991;200:715-721.
47. Brady SN, Yu Y, Maggi LB, Jr., Weber JD. ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol*. 2004;24:9327-9338.
48. Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, et al. Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol*. 2005;25:1258-1271.
49. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:493-505.
50. Morris SW, Naeve C, Mathew P, et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*. 1997;14:2175-2188.
51. Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S. Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene*. 1994;9:1567-1574.
52. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14:439-449.
53. Pulford K, Lamant L, Morris SW, et al. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood*. 1997;89:1394-1404.
54. Shiota M, Fujimoto J, Takenaga M, et al. Diagnosis of t(2;5)(p23;q35)-associated Ki-1 lymphoma with immunohistochemistry. *Blood*. 1994;84:3648-3652.
55. Barbacid M. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;766:442-458.
56. Downing JR, Ladanyi M, Raffeld M, Weiss LM, Morris SW. Large-cell anaplastic lymphoma-specific translocation in Hodgkin's disease. *Lancet*. 1995;345:918; author reply 920-911.
57. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:11-23.
58. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263:1281-1284.
59. Fujimoto J, Shiota M, Iwahara T, et al. Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:4181-4186.

60. Beylot-Barry M, Groppi A, Vergier B, Pulford K, Merlio JP. Characterization of t(2;5) reciprocal transcripts and genomic breakpoints in CD30+ cutaneous lymphoproliferations. *Blood*. 1998;91:4668-4676.
61. Cordell JL, Pulford KA, Bigerna B, et al. Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. *Blood*. 1999;93:632-642.
62. Delsol G, Lamant L, Mariame B, et al. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood*. 1997;89:1483-1490.
63. Miething C, Grundler R, Fend F, et al. The oncogenic fusion protein nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) induces two distinct malignant phenotypes in a murine retroviral transplantation model. *Oncogene*. 2003;22:4642-4647.
64. Miething C, Peschel C, Duyster J. Targeting the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK in lymphoma: the role of murine models in defining pathogenesis and treatment options. *Curr Drug Targets*. 2006;7:1329-1334.
65. Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol Cell Biol*. 1998;18:6951-6961.
66. Slupianek A, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer Res*. 2001;61:2194-2199.
67. Bai RY, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood*. 2000;96:4319-4327.
68. Polgar D, Leisser C, Maier S, et al. Truncated ALK derived from chromosomal translocation t(2;5)(p23;q35) binds to the SH3 domain of p85-PI3K. *Mutat Res*. 2005;570:9-15.
69. Slupianek A, Skorski T. NPM/ALK downregulates p27Kip1 in a PI-3K-dependent manner. *Exp Hematol*. 2004;32:1265-1271.
70. Amin HM, Medeiros LJ, Ma Y, et al. Inhibition of JAK3 induces apoptosis and decreases anaplastic lymphoma kinase activity in anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*. 2003;22:5399-5407.
71. Lai R, Rassidakis GZ, Lin Q, Atwell C, Medeiros LJ, Amin HM. Jak3 activation is significantly associated with ALK expression in anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2005;36:939-944.
72. Qiu L, Lai R, Lin Q, et al. Autocrine release of interleukin-9 promotes Jak3-dependent survival of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood*. 2006;108:2407-2415.

73. Zamo A, Chiarle R, Piva R, et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*. 2002;21:1038-1047.
74. Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med*. 2005;11:623-629.
75. Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, et al. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*. 2004;23:5426-5434.
76. Zhang Q, Raghunath PN, Xue L, et al. Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma. *J Immunol*. 2002;168:466-474.
77. Marzec M, Kasprzycka M, Ptasznik A, et al. Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3. *Lab Invest*. 2005;85:1544-1554.
78. Wan W, Albom MS, Lu L, et al. Anaplastic lymphoma kinase activity is essential for the proliferation and survival of anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood*. 2006;107:1617-1623.
79. Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Xue L, et al. Role of signal transducer and activator of transcription 5 in nucleophosmin/ anaplastic lymphoma kinase-mediated malignant transformation of lymphoid cells. *Cancer Res*. 2001;61:6517-6523.
80. Zhang Q, Wang HY, Liu X, Wasik MA. STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nat Med*. 2007;13:1341-1348.
81. Gu TL, Tothova Z, Scheijen B, Griffin JD, Gilliland DG, Sternberg DW. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood*. 2004;103:4622-4629.
82. Cussac D, Greenland C, Roche S, et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of anaplastic large-cell lymphoma recruits, activates, and uses pp60c-src to mediate its mitogenicity. *Blood*. 2004;103:1464-1471.
83. Leever SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:219-225.
84. Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature*. 1999;401:33-34.
85. Plas DR, Thompson CB. Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem*. 2003;278:12361-12366.
86. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*. 2002;109:1139-1142.
87. Cools J, Wlodarska I, Somers R, et al. Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;34:354-362.

88. Hernandez L, Bea S, Bellosillo B, et al. Diversity of genomic breakpoints in TFG-ALK translocations in anaplastic large cell lymphomas: identification of a new TFG-ALK(XL) chimeric gene with transforming activity. *Am J Pathol.* 2002;160:1487-1494.
89. Hernandez L, Pinyol M, Hernandez S, et al. TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood.* 1999;94:3265-3268.
90. Tort F, Pinyol M, Pulford K, et al. Molecular characterization of a new ALK translocation involving moesin (MSN-ALK) in anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest.* 2001;81:419-426.
91. Lamant L, Dastugue N, Pulford K, Delsol G, Mariame B. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. *Blood.* 1999;93:3088-3095.
92. Siebert R, Gesk S, Harder L, et al. Complex variant translocation t(1;2) with TPM3-ALK fusion due to cryptic ALK gene rearrangement in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood.* 1999;94:3614-3617.
93. Meech SJ, McGavran L, Odom LF, et al. Unusual childhood extramedullary hematologic malignancy with natural killer cell properties that contains tropomyosin 4--anaplastic lymphoma kinase gene fusion. *Blood.* 2001;98:1209-1216.
94. Ma Z, Cools J, Marynen P, et al. Inv(2)(p23q35) in anaplastic large-cell lymphoma induces constitutive anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase activation by fusion to ATIC, an enzyme involved in purine nucleotide biosynthesis. *Blood.* 2000;95:2144-2149.
95. Trinei M, Lanfrancone L, Campo E, et al. A new variant anaplastic lymphoma kinase (ALK)-fusion protein (ATIC-ALK) in a case of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res.* 2000;60:793-798.
96. Colleoni GW, Bridge JA, Garicochea B, Liu J, Filippa DA, Ladanyi M. ATIC-ALK: A novel variant ALK gene fusion in anaplastic large cell lymphoma resulting from the recurrent cryptic chromosomal inversion, inv(2)(p23q35). *Am J Pathol.* 2000;156:781-789.
97. Lamant L, Gascoyne RD, Duplantier MM, et al. Non-muscle myosin heavy chain (MYH9): a new partner fused to ALK in anaplastic large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;37:427-432.
98. Touriol C, Greenland C, Lamant L, et al. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood.* 2000;95:3204-3207.
99. Lawrence B, Perez-Atayde A, Hibbard MK, et al. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am J Pathol.* 2000;157:377-384.
100. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448:561-566.

101. Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:19893-19897.
102. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263:1281-1284.
103. Kuefer MU, Look AT, Pulford K, et al. Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood*. 1997;90:2901-2910.
104. Lange K, Uckert W, Blankenstein T, et al. Overexpression of NPM-ALK induces different types of malignant lymphomas in IL-9 transgenic mice. *Oncogene*. 2003;22:517-527.
105. Chiarle R, Gong JZ, Guasparri I, et al. NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors. *Blood*. 2003;101:1919-1927.
106. Turner SD, Tooze R, MacLennan K, Alexander DR. Vav-promoter regulated oncogenic fusion protein NPM-ALK in transgenic mice causes B-cell lymphomas with hyperactive Jun kinase. *Oncogene*. 2003;22:7750-7761.
107. Cossman J, Annunziata CM, Barash S, et al. Reed-Sternberg cell genome expression supports a B-cell lineage. *Blood*. 1999;94:411-416.
108. Bierhuizen MF, Westerman Y, Visser TP, Dimjati W, Wognum AW, Wagemaker G. Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood*. 1997;90:3304-3315.
109. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.
110. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-273.
111. Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*. 1991;108:1-6.
112. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*. 1982;1:841-845.
113. Potter H. Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem*. 1988;174:361-373.
114. Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev Yu A. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J*. 1992;63:1320-1327.
115. Rodriguez-Tarduchy G, Collins M, Lopez-Rivas A. Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J*. 1990;9:2997-3002.

116. Wang H, Kavanaugh MP, North RA, Kabat D. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature*. 1991;352:729-731.
117. Conti C, Mastromarino P, Riccioli A, Orsi N. Electrostatic interactions in the early events of VSV infection. *Res Virol*. 1991;142:17-24.
118. Arcasoy SM, Latoche JD, Gondor M, Pitt BR, Pilewski JM. Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene Ther*. 1997;4:32-38.
119. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
120. Spain LM, Mulligan RC. Purification and characterization of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:3790-3794.
121. Herbst H, Tippelmann G, Anagnostopoulos I, et al. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma: dissociation between phenotype and genotype. *Leuk Res*. 1989;13:103-116.
122. Turner SD, Merz H, Yeung D, Alexander DR. CD2 promoter regulated nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase in transgenic mice causes B lymphoid malignancy. *Anticancer Res*. 2006;26:3275-3279.
123. Giuriato S, Foisseau M, Dejean E, et al. Conditional TPM3-ALK and NPM-ALK transgenic mice develop reversible ALK-positive early B-cell lymphoma/leukemia. *Blood*;115:4061-4070.
124. Ladanyi M. Aberrant ALK tyrosine kinase signaling. Different cellular lineages, common oncogenic mechanisms. *Am J Pathol*. 2000;157:341-345.
125. Miller AD. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther*. 1990;1:5-14.
126. Pflieger BF, Fawzi NJ, Keasling JD. Optimization of DsRed production in *Escherichia coli*: effect of ribosome binding site sequestration on translation efficiency. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92:553-558.
127. Sorensen M, Lippuner C, Kaiser T, Misslitz A, Aebischer T, Bumann D. Rapidly maturing red fluorescent protein variants with strongly enhanced brightness in bacteria. *FEBS Lett*. 2003;552:110-114.
128. Pfeifer W, Levi E, Petrogiannis-Haliotis T, Lehmann L, Wang Z, Kadin ME. A murine xenograft model for human CD30+ anaplastic large cell lymphoma. Successful growth inhibition with an anti-CD30 antibody (HeFi-1). *Am J Pathol*. 1999;155:1353-1359.
129. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol*;221:248-263.
130. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*. 1999;8:265-277.

131. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*. 1994;76:977-987.
132. Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, et al. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity*. 2001;15:763-774.
133. Hennet T, Hagen FK, Tabak LA, Marth JD. T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:12070-12074.
134. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, et al. Cyto-reductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:3314-3322.
135. Galkin AV, Melnick JS, Kim S, et al. Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:270-275.
136. Robertson SC, Tynan J, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet*. 2000;16:368.
137. Reilly JT. Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. *Blood Rev*. 2003;17:241-248.
138. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. *Leukemia*. 1994;8:953-962.
139. Peterson LF, Boyapati A, Ahn EY, et al. Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*. 2007;110:799-805.
140. Heim S, Mitelman F. Secondary chromosome aberrations in the acute leukemias. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986;22:331-338.
141. Sawada S, Scarborough JD, Killeen N, Littman DR. A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. *Cell*. 1994;77:917-929.
142. Tian ZG, Longo DL, Funakoshi S, et al. In vivo antitumor effects of unconjugated CD30 monoclonal antibodies on human anaplastic large-cell lymphoma xenografts. *Cancer Res*. 1995;55:5335-5341.
143. Borchmann P, Treml JF, Hansen H, et al. The human anti-CD30 antibody 5F11 shows in vitro and in vivo activity against malignant lymphoma. *Blood*. 2003;102:3737-3742.
144. Mathas S, Janz M, Hummel F, et al. Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol*. 2006;7:207-215.

145. Kasprzycka M, Marzec M, Liu X, Zhang Q, Wasik MA. Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9964-9969.
146. Ambrogio C, Martinengo C, Voena C, et al. NPM-ALK oncogenic tyrosine kinase controls T-cell identity by transcriptional regulation and epigenetic silencing in lymphoma cells. *Cancer Res*. 2009;69:8611-8619.
147. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005;6:338-344.
148. Zhang X, Ren R. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1998;92:3829-3840.
149. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:3343-3356.
150. Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA, Penfold GK, Jacobson RJ, Fialkow PJ. Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1980;287:49-50.
151. Mathas S, Kreher S, Meaburn KJ, et al. Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:5831-5836.
152. Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*. 1989;5:70-76.
153. Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6232-6236.
154. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561-566.
155. Hubinger G, Wehnes E, Xue L, Morris SW, Maurer U. Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the fusion transcript NPM-ALK associated with anaplastic large-cell lymphoma. *Exp Hematol*. 2003;31:226-233.
156. Ritter U, Damm-Welk C, Fuchs U, Bohle RM, Borkhardt A, Woessmann W. Design and evaluation of chemically synthesized siRNA targeting the NPM-ALK fusion site in anaplastic large cell lymphoma (ALCL). *Oligonucleotides*. 2003;13:365-373.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Übersicht über die t(2;5) Translokation	20
Abb. 2	Darstellung der durch NPM-ALK aktivierten Signalwege	22
Abb. 3	Übersicht über die verschiedenen ALK-Fusionspartner	23
Abb. 4	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen	62
Abb. 5	Liste der verwendeten FACS-Antikörper und die detektierte Subpopulation	62
Abb. 6	Kaplan-Meier Überlebenskurve und immunohistochemische Färbungen eines retroviralen Infektions- / Transplantationsmodells mit NPM-ALK	65
Abb. 7	Das Cre-loxP System	66
Abb. 8	Das Konstrukt MSCV-Stop-EGFP (MSE)	68
Abb. 9	Das Konstrukt MSCV-Stop-NPM/ALK-IRES-EGFP (MSNAIE)	69
Abb. 10	Funktionalität des MSNAIE-Konstruktes	70
Abb. 11	Schematische Darstellung des retroviralen Infektions- / Transplantationsmodells	72
Abb. 12	Generierung eines NPM-ALK tragenden Retrovirus und anschließende Infektion murinen Knochenmarks	74
Abb. 13	Das retrovirale Knochenmarksinfektions- / Transplantationsmodell	75
Abb. 14	Übersicht der MSNAIE-Transplantationsexperimente	76
Abb. 15	FACS-Analyse des peripheren Bluts von Mäusen, die mit MSE infizierten KMZellen verschiedener Spendermäuse transplantiert wurden	77
Abb. 16	Kaplan-Meier Überlebenskurve der Wildtyp bzw. LysM-Cre Mäuse	78
Abb. 17	FACS-Analyse des LysM-Cre Knochenmarks- / Transplantationsmodells	79
Abb. 18	Kaplan-Meier Überlebenskurve der Wildtyp bzw. GrzmB-Cre Mäuse	79
Abb. 19	FACS-Analyse des GrzmB-Cre Knochenmarks- / Transplantationsmodells	80
Abb. 20	Kaplan-Meier-Überlebenskurve	81
Abb. 21	Representative durchflusszytometrische Untersuchung einer CD4-Cre transplantierten Maus	82
Abb. 22	Immunhistochemische Untersuchung der CD4-Cre transplantierten Mäuse	82
Abb. 23	Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Lck-Cre transplantierten Mäuse	83
Abb. 24	Evaluation der MSNAIE infizierte Lck-Cre Mäuse	84
Abb. 25	Genauere Charakterisierung der malignen Zellen im Thymus	85
Abb. 26	Immunhistochemische Untersuchung der MSNAIE infizierten Mäuse	86
Abb. 27	Immunfluoreszenzbilder von MSNAIE infizierten und transplantierten Lck-Cre Knochenmark	86
Abb. 28	Vergleiche der Milzgewichte	87
Abb. 29	Lymphatische Organe der Lck-Cre transplantierten Mäuse	88
Abb. 30	Überlebenskurve der seriell transplantierten Mäuse	89
Abb. 31	Schematische Darstellung des humanen und murinen CD30 Proteins	90
Abb. 32	Vergleich der humanen und murinen CD30 Proteinsequenzen	91
Abb. 33	Charakterisierung des polyklonalen CD30-Antikörpers	92
Abb. 34	Spezifische Inhibierung von Phospho-ALK in Abhängigkeit der Konzentration	94
Abb. 35	Proliferation ALK-negativer bzw. ALK-positiver BaF/3 Zellen	95
Abb. 36	Auswirkungen des Inhibitors auf die Kinaseaktivität ALK-positiver Zelllinien	96

Abb. 37	Proliferation ALK-negativer bzw. ALK-positiver primärer Zelllinien	97
Abb. 38	ALK-positives Xenograft-Mausmodell	98
Abb. 39	Gewichtsverlauf behandelter bzw. unbehandelter Balb/c-Mäuse	99
Abb. 40	Durchschnittliche Milzgewichte der drei analysierten Gruppen	100
Abb. 41	Durchflusszytometrische Untersuchung der 4SC - bzw. Placebo - behandelten Mäuse	101
Abb. 42	Die Zielzelle der t(2;5) Translokation	108
Abb. 43	Übersicht der ALCL-Mausmodelle	111

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die interessante Aufgabenstellung. Durch die freizügige Gestaltungsmöglichkeit meiner Arbeit, ein gut ausgestattetes Labor und das in mich gesetzte Vertrauen, lernte ich schnell selbstständig und weitsichtig zu planen und zu arbeiten. Für seine wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Groll danke ich für die bereitwillige Übernahme dieser Dissertation in den Fachbereich Biochemie der Technischen Universität München.

Vielen Dank auch an Cornelius, Rama, Sebastian und Hari für die zahlreichen Diskussionen und die hilfreiche Unterstützung.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre im Zimmer 1.06 möchte ich meinen Kollegen und Freunden Cathrin, Richard und Michal danken.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Duyster danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre ständige Hilfsbereitschaft, ebenso den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Ruland und Bernhard. Vielen Dank auch an Frau Budak für die liebevolle Bemutterung und die ausschweifenden Diskussionen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mir es durch ihre moralische und finanzielle Unterstützung ermöglicht hat ein Studium und eine anschließende Ausbildung anzutreten.

9 Publikationen

Conditional transgene expression from viral vectors using a floxed translational stop cassette
(Manuskript in Vorbereitung)

SC-71710 – A specific ALK tyrosine kinase inhibitor
(Manuskript angefertigt)

Nicolas Schneider, Cornelius Miething, Christian Peschel and Justus Duyster
Study of the spatio-temporal expression of NPM-ALK in a murine lymphoma model
(Abstract; Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2008)