# In vivo Populationsdynamiken von genetisch modifizierten, reifen T-Zellen und Charakterisierung von anaplastischen, großzelligen T-Zell Lymphomen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Anna Stemann

Aus dem Fachbereich der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität
Gießen
Institut für Veterinär-Pathologie
Prof. Dr. C. Herden

und

aus dem Fachbereich Medizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Senckenbergisches Institut für Pathologie
Prof. Dr. Dr. h.c. M.-L. Hansmann

# In vivo Populationsdynamiken von genetisch modifizierten, reifen T-Zellen und Charakterisierung von anaplastischen, großzelligen T-Zell Lymphomen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Anna Stemann
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen, 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. C. Herden
Prof. Dr. M.-L. Hansmann

Prüfer: Prof. Dr. R. Neiger

Tag der Disputation: 07.11.2016

**Meiner Familie**

# Schriftliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze der wissenschaftlichen Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Anna Stemann

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis..... ....V

1. Einleitung ..... 1

2. Zusammenfassung ..... 4

3. Summary ..... 6

4. Literaturübersicht ..... 7

4.1 Das Immunsystem ..... 7

4.1.1 Erkennung von Selbst und Fremd: der Haupthistokompatibilitätskomplex ..... 7

4.1.2 Das T-Lymphozytensystem ..... 8

4.1.3 Die T-Zell-Homöostase ..... 13

4.2 Maligne Lymphome des T-Zell-Systems ..... 16

4.2.1 Humanes ALK-positives anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL, Anaplastic Large Cell Lymphoma) ..... 17

4.2.2 Lymphome in der Veterinärmedizin ..... 22

4.3 Retroviren und retrovirale Vektoren ..... 25

4.3.1 Retroviren ..... 25

4.3.2 Retroviren und deren transformierendes Potential ..... 27

4.3.3 Retrovirale Vektoren in der Gentherapie ..... 28

4.3.4 Kontrollmechanismen bei der Transformationsresistenz reifer T-Lymphozyten nach retroviraler Transduktion ..... 30

5. Material und Methoden ..... 32

5.1 Material ..... 32

5.1.1 Antikörper ..... 32

5.1.2 Plasmide und Vektoren ..... 33

5.1.3 Enzyme und Größenstandards ..... 33

5.1.4 Peptide und Zytokine ..... 33

5.1.5 Bakterien ..... 34

5.1.6 Zelllinien und primäre Zellen ..... 34

5.1.7 Mausmodelle ..... 34

5.2 Versuchsplanung ..... 37

5.3 Methoden ..... 39

5.3.1 Molekularbiologische Techniken ..... 39

5.3.2 Zellkulturarbeiten ..... 41

5.3.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ..... 46

5.3.4 Tierexperimentelle Methoden ..... 48

5.3.5 Histologie und Immunhistochemie ..... 50

5.3.6 In vivo Imaging ..... 56

6. Ergebnisse ..... 60

6.1 Analyse der Spenderzellen ..... 60

6.2 Transgene, reife T-Zellen repopulieren eine lymphopenische Maus innerhalb weniger Wochen ..... 61

6.3 Repopulationsverhalten und Populationsdynamiken der genetisch modifizierten und transplantierten T-Zellen in den Kontrollgruppen ..... 66

6.4 Repopulationsverhalten und Lymphomagenese der genetisch modifizierten und transplantierten T-Zellen in den Onkogengruppen ..... 75

6.5 Vergleichbarkeit der ALK-positiven ALCLs des Menschen mit den artifiziell erzeugten ALK-positiven Lymphomen in der Maus ..... 80

6.5.1 Ähnlichkeiten in der Morphologie ..... 80

6.5.2 Immunhistochemische Färbungen ..... 81

6.6 Parallelen zur Veterinärmedizin und Etablierung neuer immunhistochemischer Färbungen für die Kleintiermedizin ..... 83

7. Diskussion ..... 87

7.1 Ansiedlung der mit dem Kontrollgen oder Tumorgen transduzierten T-Lymphozyten ..... 87

7.2 Schwankungen der Strahlungsintensität ..... 89

7.3 Nachweis der Tumorgenese NPM-ALK-positiver Lymphome anhand von Blutuntersuchungen ..... 90

7.4 Bedeutung des verwendeten Mausmodells ..... 92

7.5 Veterinärmedizinische Lymphom-Klassifizierungen und Etablierung der immunhistochemischen Darstellung von CD8-positiven T-Lymphozyten ..... 93

8. Schlussbetrachtung ..... 96

9. Abkürzungsverzeichnis ..... 98

10. Abbildungsverzeichnis ..... 100

11. Tabellenverzeichnis ..... 102

12. Literaturverzeichnis ..... 103

13. Anhang ..... 117

13.1 Histologische und immunhistochemische Abbildungen ..... 117

13.2 Ergebnisse der BLI-Messungen ..... 118

13.3 Chemikalien und Lösungen ..... 128

13.4 Medien und Puffer ..... 129

13.5 Geräte ..... 130

13.6 Verbrauchsmaterialien ..... 131

13.7 Verwendete Kits ..... 132

13.8 Tierexperimentelle Materialien ..... 132

Danksagung ..... 133

# 1. **Einleitung**

In der modernen Gentherapie werden intakte Kopien von fehlenden oder beschädigten Genen bzw. Genabschnitten in betroffene Zellen von Patienten eingebracht und ersetzen somit fehlende oder beschädigte Gene (Marshall, 1999; Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Peter et al., 2012). Die Einschleusung der gewünschten Gene erfolgt mittels Vektoren, hierzu werden besonders häufig retrovirale Vektoren verwendet (Miller et al., 1993; Baum et al., 2006; Peter et al., 2012). Ein großes Problem bei der Arbeit mit retroviralen Vektoren stellt die Möglichkeit der Insertionsmutagenese dar, also die Entartung der Zielzellen, infolge der Aufnahme der fremden DNS (Desoxyribonukleinsäure). Die Transaktivierung von Genen durch starke Promotor- und Enhancerelemente des retroviralen Vektors stellen aktuell die klinisch relevanteste Form der Insertionsmutagenese dar (Corcoran et al., 1984; Kumar et al., 2001; Cereseto et al., 2004; Baum et al., 2006; Hacein-Bey-Abina et al., 2008, Peter et al., 2012). Ende der 1990er Jahre gelang in der Gentherapie ein Durchbruch, als erstmals an SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*, deut. schwere kombinierte Immundefizienz) erkrankte Patienten mithilfe von Gentherapie an hämatopoetischen Stammzellen erfolgreich geheilt wurden (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). SCID-Patienten leiden an genetischen Defekten, durch welche es zur Abwesenheit von T-Zellen und je nach Form auch von B- und Natürlichen Killer-Zellen kommt. Mithilfe retroviraler Vektoren konnte das korrekte Gen in die Stammzellen der Patienten übertragen und ein intaktes Immunsystem entwickelt werden. Jahre später erkrankten dieselben Patienten aber an Leukämie, ausgelöst aufgrund von Insertionsmutagenese, verursacht durch die zur Gentherapie verwendeten retroviralen Vektorpartikel (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Es können jedoch nicht nur hämatopoetische Stammzellen, sondern auch reife Zellen als Zielzellen der retroviralen Gentherapie eingesetzt werden (Edinger et al., 2003; Newrzela et al., 2008; Yang et al., 2011; Newrzela et al., 2012). Es kam die Frage auf, ob reife T-Zellen ebenso anfällig für eine retroviral-bedingte Transformation nach genetischer Modifikation wären, wie hämatopoetische Stammzellen. Dies war lange unklar. Deshalb wurden in einer Sicherheitsstudie lymphopenische Rag-1-Empfängermäuse (Rag-1-Mäusen fehlt das Gen Rag-1, welches für die Aktivierung der V(D)J-Rekombination verantwortlich ist, somit entwickeln diese Tiere keine reifen B- oder T-Lymphozyten) entweder mit hämatopoetischen Stammzellen oder mit reifen T-Zellen von Wildtyp-Mäusen

transplantiert (Newrzela et al., 2008). Alle Zellen wurden vor der Transplantation mithilfe von retroviralem Gentransfer modifiziert, so dass sie entweder lediglich ein Reportergen (GFP, grün fluoreszierendes Protein) oder zusätzlich verschiedene bekannte T-Zell-Onkogene, wie ΔTrkA (Tropomyosin receptor kinase A), LMO2 (LIM domain only 2) und TCL-1 (T-cell leukemia/lymphoma protein 1) exprimierten. Alle Mäuse die mit einem Onkogen transduzierte, hämatopoetische Stammzellen transplantiert bekamen, entwickelten nach entsprechenden Latenzzeiten Lymphome oder Leukämien. Die Transplantation reifer T-Zellen hingegen induzierte keine Neoplasien. Somit konnte gezeigt werden, dass reife TCR-polyklonale (*T cell receptor*, deut. T-Zell-Rezeptor) T-Zellen eine relative Resistenz gegenüber einer Transformation nach retroviralem Gentransfer von T-Zell-Onkogenen aufweisen (Newrzela et al., 2008). In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass es die TCR-Polyklonalität ist, die vor dem Auswachsen eines malignen T-Zell Klons schützt (Newrzela et al., 2012). Spenderzellen von sogenannten (TCR-transgenen) OT-1-Mäusen, deren Lymphozytenreservoir fast ausschließlich aus TCR-monoklonalen CD8 (Cluster of differentiation)-positiven Lymphozyten besteht, welche spezifisch an ein Epitop von Ovalbumin (OVA) binden, wurden hierzu mit dem T-Zell spezifischen Onkogen NPM-ALK (ein Fusionsonkogen aus Nucleophosmin und der anaplastischen Lymphomkinase) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden wieder in lymphopenische Rag-1-Empfängertiere transplantiert, welche nach entsprechender Latenzzeit Lymphome entwickelten. Durch die Zugabe von TCR-polyklonalen T-Zellen konnte hingegen das Auswachsen präleukämischer Klone verhindern werden (Newrzela et al., 2012). Leider konnte in diesen Versuchen die klonale Dynamik der Lymphomgenese nicht untersucht werden, da die genetisch modifizierten Zellen nicht im Blut der Rezipienten zu detektieren waren und eine Biopsierung betroffener Organe als nicht sensitiv genug, sowie technisch schwer durchführbar angesehen wurde. Weitere Experimente wären nötig, um Aufschluss über die Entstehung dieser Tumore zu geben. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Repopulationsdynamiken, sowie das biologische Verhalten und die Verteilung von reifen TCR-monoklonalen T-Zellen aus OT-1 Spendermäusen während einer Lymphopenie-induzierten Proliferation zu charakterisieren und in vivo darzustellen. Des Weiteren sollte eruiert werden inwiefern das Einbringen des Onkogens NPM-ALK die Homöostase dieser transplantierten T-Zellen verändert bzw. welche Populationsdynamik während der

Lymphomgenese reifer T-Zellen in vivo zu beobachten ist. Um dies zu ermöglichen sollte das bereits erwähnte, etablierte T-Zell-Transplantationsmodell (Newrzela et al., 2012) weiterentwickelt und durch die Methode der biolumineszenten Bildgebung erweitert werden. Den TCR-monoklonalen OT-1-Spenderzellen wurde also zusätzlich zum Reportergen bzw. Onkogen noch ein weiteres Reportergen, welches für das Enzym „Luciferase“ codiert, inseriert. Luciferase setzt unter Abspaltung von Energie Luciferine um, dabei entsteht biolumineszente Strahlung, welche mit speziellen Bildgebungsverfahren in vivo gemessen werden kann. So konnten die genetisch modifizierten, transplantierten Zellen über Wochen hinweg in den Empfängertieren verfolgt und beobachtet werden. Ein weiteres Ziel war es, die artifiziell erzeugten ALK (Anaplastische-Lymphom-Kinase)-positiven Lymphome aus dem Mausmodell mit den äquivalenten humanen ALK-positiven T-Zell-Lymphomen zu vergleichen, um den Nutzen für weitere Forschungsarbeiten zu verifizieren. Dazu wurden die Zellen mikroskopisch auf ihre morphologischen Eigenschaften, sowie den Immunophänotyp untersucht.

# 2. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorgenese ALK-positiver T-Zell Lymphome und die Populationsdynamiken transplantierter, retroviral modifizierter monoklonaler T-Lymphozyten in vivo beobachtet. Weiterhin wurden experimentell induzierte, ALK-positive T-Zell Lymphome aus dem Mausmodell, dem humanen ALK-positiven ALCL (*Anaplastic Large Cell Lymphoma*, deut. Anaplastisch großzelliges Lymphom) gegenübergestellt.

Damit die Verteilung und Aktivität der genetisch modifizierten Zellen mittels Biolumineszenzbildgebung in vivo verfolgt werden konnte, wurden bicistronische retrovirale Vektoren kloniert, welche für das Markergen Luciferase in Kombination mit dem Fusionsonkogen NPM-ALK oder dem Kontrollgen T-Sapphire (fluoreszierendes Protein) kodierten. Mithilfe eines gammaretroviralen Gentransfers wurden T-Zell-Rezeptor transgene OT-1-Spenderlymphozyten mit diesen Vektoren transduziert und anschließend in Rag-1-defiziente Empfängermäuse transplantiert. Sieben Wochen nach der Transplantation, wurden die Tiere im wöchentlichen Abstand hinsichtlich ihrer biolumineszenten Signale untersucht. Zusätzlich wurde die Repopulierung der transplantierten Zellen im peripheren Blut der Rezipienten kontrolliert, dadurch war es möglich die Zellen für bis zu 24 Wochen im lebenden Tier zu verfolgen.

Es konnte gezeigt werden, dass die transplantierten Zellen die lymphopenischen Empfängertiere innerhalb weniger Wochen erfolgreich repopulierten. Die transplantierten Zellen siedelten sich überwiegend in abdominalen Lymphknoten und der Milz an, während sie außerhalb der Bauchhöhle vor allem in den linken inguinalen Lymphknoten einwanderten.

Die Tumorgenese von ALK-positiven Lymphomen konnte in vivo induziert und ebenfalls über die Zeit beobachtet werden. Dabei fiel auf, dass die Latenzzeit der Entstehung eines Lymphoms anscheinend mit der Transduktionseffizienz korrelierte, vermutlich aufgrund der höheren Expression des Onkogens NPM-ALK. Interessanterweise entwickelten sich die T-Zell-Lymphome bevorzugt in den Lymphknoten der linken Körperhälfte, sowie in der Milz. Die biolumineszente Signalintensität der transduzierten Zellen bei den Kontrolltieren unterlag zeitweise Schwankungen und blieb im Vergleich zur Signalintensität eines Lymphoms um ein Vielfaches schwächer. In der vorliegenden Arbeit gelang es zum ersten

Mal, die Entstehung eines NPM-ALK-positiven Lymphoms über Biolumineszenzbildgebung zu visualisieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die induzierten ALK-positiven Lymphome mit dem humanen ALK-positiven ALCL zu vergleichen. Die Tumore wurden hinsichtlich ihrer Morphologie, ihres Metastasierungsverhaltens und ihres Immunophänotyps histologisch untersucht. Hierbei konnten vielfältige Ähnlichkeiten des ALK-positiven Lymphoms der Versuchsmäuse, mit der kleinzelligen Variante des humanen ALK-positiven ALCL aufgezeigt werden.

# 3. Summary

In the presented study we tracked tumorigenesis of ALK-positive T-cell lymphoma and elucidated the population dynamics of transplanted mature TCR monoclonal T cells in vivo by using bioluminescence imaging. Also, we compared experimentally induced ALK-positive lymphoma of mice with human ALK-positive ALCL.

For this purpose we utilized bicistronic retroviral vectors encoding for the control gene T-Sapphire (fluorescent protein) or the oncogene NPM-ALK, in combination with the marker gene Luciferase for in vivo imaging. We transduced TCR-transgenic OT-1 donor T cells by gammaretroviral gene transfer and transplanted them into Rag-1 deficient recipients. Seven weeks after transplantation the bioluminescent radiance was examined weekly. Additionally, we draw blood every 2 weeks to keep track of the repopulation of the transplanted T cells. Hereby, we were able to monitor the transplanted T cells within the living animals for up to 24 weeks.

We could show that the transplanted T cells successfully repopulated lymphopenic recipients within a few weeks. Furthermore, we were able to show that the transplanted TCR monoclonal T cells preferentially colonized the abdominal lymph nodes as well as the spleen. Outside the abdomen the T cells preferred to repopulate the left inguinal lymph node. The tumorigenesis of ALK-positive lymphoma was also traced in vivo. We noticed that the latency of the development of lymphoma might has correlated with the transduction efficacy. Interestingly, the primary tumors rose in the left inguinal lymph node as well as in the spleen. The radiance intensity frequently oscillated during the period of measurement. Moreover, the radiance intensity of the lymphoma cells was significantly higher than the signal intensity of T cells in the control group.

Another aim of this study was to compare the artificially generated ALK-positive lymphoma in our laboratory mice with the human ALK-positive ALCL. We analyzed the tumors for their morphology, biological behavior and their immunophenotype. Finally, we were able to identify various similarities between the ALK-positive lymphomas in our experimental mice and the small cell variant of the human ALCL.

# 4. Literaturübersicht

## 4.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen. Die Infektionen können von einer Vielzahl von Krankheitserregern, wie beispielsweise Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten hervorgehen. Um den Organismus adäquat schützen und eindringende Erreger eliminieren zu können, werden eine Vielzahl von Erkennungsmechanismen, Barrieren und Abwehrfunktionen benötigt. Hierzu stehen ihm zum Einen das angeborene (unspezifische) und zum Anderen das adaptive (erworbene, spezifische) Immunsystem zur Verfügung. Die angeborene Immunität wirkt wie eine erste Verteidigungslinie. Eindringende Pathogene werden erkannt und schnellstmöglich eliminiert, auf eine Reinfektion kann jedoch nicht spezifisch und auch nicht schneller reagiert werden. Die adaptive Immunität hingegen besteht aus Antikörpern und Lymphozyten, welche durch klonale Selektionsprozesse hinsichtlich einer spezifischen Infektion spezialisiert werden. Neben der gezielten Eliminierung mithilfe von Antikörpern, entstehen Gedächtnislymphozyten, welche das Antigen im Falle einer Reinfektion schneller bekämpfen können (Schütt, 2011; Murphy et al., 2014). Lymphozyten entstehen, ebenso wie die Leukozyten der angeborenen Abwehr, aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Sie unterscheiden sich in ihrer Entwicklung allerdings deutlich von anderen Blutzellen, welche direkt nach dem Export aus dem Knochenmark eine Funktion einnehmen. Lymphozyten durchlaufen zuerst eine primäre, antigenunabhängige Bildungs- und Differenzierungsphase, gefolgt von einer sekundären (peripheren), antigenabhängigen Reaktions- und Differenzierungsphase. Die Lymphopoese teilt sich auf in das B-Lymphozytensystem und das T-Lymphozytensystem (Koonin et al., 2014; Murphy et al., 2014).

### 4.1.1 Erkennung von Selbst und Fremd: der Haupthistokompatibilitätskomplex

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl.:* Major histocompatibility complex, MHC) ist eine spezielle Chromosomenregion, die für polymorphe Glykoproteine kodiert, die an der Zelloberfläche aller nukleärer Körperzellen zu finden sind (Roessner, 2008; Schütt, 2011; Peter, 2012; Murphy et al., 2014). Sie sind für das Erkennen von körpereigenen und

körperfremden Zellen verantwortlich. Ebenso werden sie zur Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen und der antigenunabhängigen T-Zell-Stimulation benötigt. Es werden zwei Hauptklassen unterschieden, die sich in ihrer Struktur und Verteilung unterscheiden. MHC-Klasse-I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen (außer Spermien) zu finden, wohingegen MHC-Klasse-II-Moleküle meist nur auf antigenpräsentierenden Zellen vorkommen und selten, z.B. im Falle einer Entzündung, auch auf anderen Zellen des Körpers exprimiert werden können. Bei Hund und Katze kommen MHC-Klasse-II-Moleküle, im Gegensatz zu Mensch und Maus, auch auf ruhenden T-Zellen vor (Day, 2005). Um ein Antigen präsentieren zu können binden die MHC-Moleküle in der antigenpräsentierenden Zelle (APC) das Antigen und transportieren es zur Zelloberfläche. Während MHC-Klasse-I-Moleküle kurze Peptide (vor allem Virenfragmente), welche im Zytosol der Zelle vorliegen, binden können, ist die Länge der Peptidantigene für die Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle nahezu unbegrenzt. MHC-Klasse-II-Moleküle binden Antigene welche innerhalb der Zelle in Vesikeln vorliegen, dies sind meist Fragmente von Bakterien oder Parasiten. Nachdem die eingedrungenen Antigene prozessiert und in kleine Fragmente zerlegt und zur Zelloberfläche transportiert wurden, können CD8-positive T-Zellen, sogenannte zytotoxische T-Zellen, über ihren T-Zell Rezeptor an die MHC-Klasse-I-Moleküle binden, während MHC-Klasse-II-Moleküle von CD4-positiven T-Zellen, den sogenannten T-Helferzellen, gebunden werden können (Roessner, 2008; Schütt, 2011; Peter, 2012; Murphy et al., 2014).

### 4.1.2 Das T-Lymphozytensystem

Unreife Pro-T-Zellen gelangen während der Fetalzeit hämatogen aus dem Knochenmark in den Thymuskortex, wo sie unter dem Einfluss des speziellen Milieus proliferieren und differenzieren. Die Reifung der T-Zellen im Thymus kann in mehrere Stadien unterteilt werden, welche anhand der Veränderungen der Membranrezeptoren definiert werden. In unreifen Pro-T-Zellen wird zunächst CD1 exprimiert, im Stadium der unreifen Prä-T-Zelle wird CD4 und später auch CD8 koexprimiert. Diese doppelt positiven T-Zellen reifen weiter zu den einfach positiven, CD4-positiven oder CD8-positiven naiven T-Zellen. Diese verlassen schließlich den Thymus und besiedeln das Blut, sowie periphere lymphatische Organe. Durch die im nächsten Abschnitt beschriebene positive und negative Selektion im Thymus wird gewährleistet, dass nur solche T-Zellen überleben die in der Lage sind,

körpereigene von körperfremden Zellen zu unterscheiden (Roessner, 2008; Schütt, 2011; Peter, 2012; Murphy et al., 2014).

#### 4.1.2.1 Die Thymusselektion

Die im Thymus herangereiften T-Zellen durchlaufen Selektionsprozesse die sicherstellen sollen, dass die T-Lymphozyten über den T-Zell Rezeptor zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheiden können und sich nicht gegen den eigenen Organismus richten. Während der positiven Selektion, welche im Randbereich (Cortex) des Thymus stattfindet, treffen T-Zellen auf kortikale Epithelzellen, welche MHC-Moleküle in Verbindung mit sogenannten Selbstpeptiden an ihrer Oberfläche tragen (Roessner, 2008). Dabei handelt es sich um vom Körper selbst produzierte Peptide. Sind die T-Zellen in der Lage, an diesen MHC-Selbstpeptid-Komplex über ihren TCR binden zu können, erhalten sie dadurch ein sogenanntes „Überlebenssignal“, welches unter anderem Wachstumsfaktoren freisetzt und sie befähigt weiter zu leben (Starr et al., 2005; Murphy et al., 2014). Sind sie dazu nicht in der Lage, fehlt ihnen das Überlebenssignal und sie gehen in Apoptose. Die zweite, negative Selektion findet im Markbereich (Medulla) des Thymus statt. Hierbei werden den Zellen erneut MHC-Selbstpeptid-Komplexe präsentiert. Während der negativen Selektion werden alle T-Zellen eliminiert, welche eine zu starke Bindung ihres TCR an die MHC-Selbstpeptid-Komplexe ausbilden, da dies die Gefahr einer Autoreaktivität (Autoimmunität) birgt. Die negative Selektion wird durch dendritische Zellen vermittelt und schließt die Entwicklung der Selbsttoleranz ab (Starr et al., 2005; Roessner, 2008; Schütt, 2011; Peter, 2012; Murphy et al., 2014).

#### 4.1.2.2 Segmentierung der T-Zellrezeptor-Gene und dessen Aufbau

Der TCR dient der Erkennung von über den MHC präsentierten Antigenen. Er besteht überwiegend aus zwei transmembranen Polypeptidketten welche durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, den sogenannten α- und β-Ketten und zu einem kleinen Anteil von etwa 5% aus transmembranen γ- und δ-Ketten. Die α- und β-Ketten weisen jeweils eine konstante Domäne (C-Domäne) und eine variable Domäne (V-Domäne) auf. Der TCR alleine ist nicht in der Lage, nach Bindung eines Antigens ein entsprechendes Signal an die T-Zelle weiter zu leiten. Hierzu wird ein Komplex von Signalproteinketten benötigt (zwei ε-Ketten, eine δ-Kette und eine γ-Kette).

Signalproteinketten dieser Art bezeichnet man als Cluster of differentiation (CD), in diesem Fall CD3 für T-Zellen. Desweiteren wird eine ζ-Kette benötigt, welche als Homodimer mit Disulfidbrücken vorliegt. Die CD3-Signalproteinketten sind mit den α- und β-Ketten des TCR assoziiert und bilden den T-Zell-Rezeptor-Komplex (Abb. 1). Die transmembranen Regionen der Signalproteinketten enthalten hochkonservierte Peptid-Abschnitte, sogenannte *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs). Nach Aktivierung des TCR kommt es zu Ladungsänderungen und Phosphorylierung der transmembranen Regionen der Signalproteinketten und somit zur Signalweiterleitung ins Innere der Zelle.

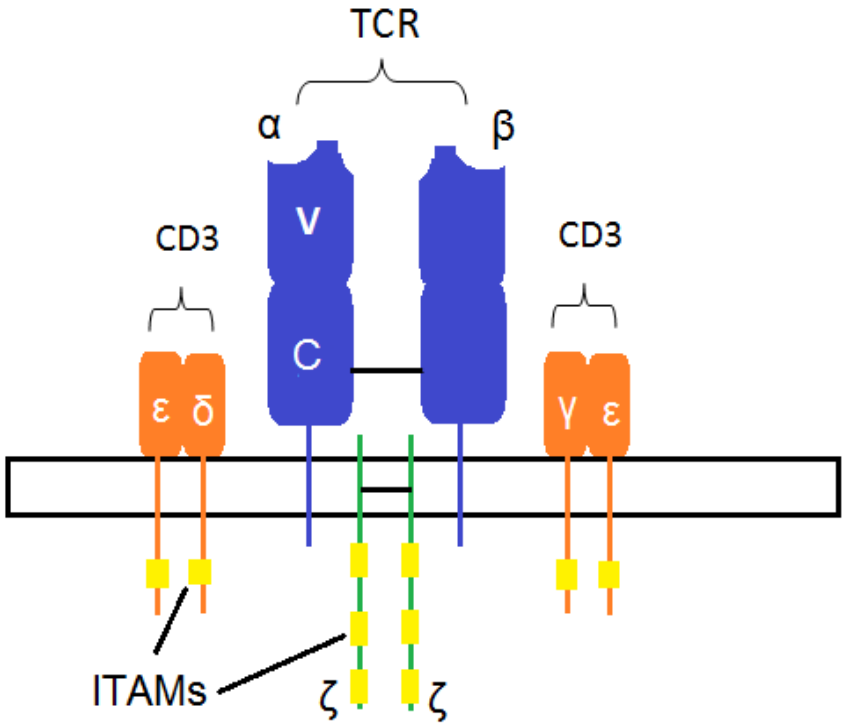



**Abb. 1 T-Zell-Rezeptor-Komplex**
Der T-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus den beiden Polypeptidketten α und β des TCR, sowie CD3 und der Signalproteinkette ζ. Intrazellulär finden sich die Peptid-Abschnitte *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs), welche eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung spielen. *Quelle*: modifiziert nach Murphy et al., 2014.

Aufgrund von Ähnlichkeiten der Domänstrukturen zu denen von Immunglobulinen, zählt der TCR zur Immunglobulin-Superfamilie. Die variablen Regionen der α- und ß-Ketten des TCR sind für die hohe Antigenspezifität und Diversität der T-Zellen verantwortlich. Sie werden von einem V-Gen, einem J (joining)-Gen und teilweise von einem D (Diversitäts)-Gen kodiert. Diese Genbereiche befinden sich auf einem speziellen Abschnitt der

Chromosomen, der für die α- und ß-Kette separat liegt. Der jeweilige Bereich beherbergt auch die dazugehörige konstante Region, welche für die C-Gene (Cα bzw. Cβ) kodiert. Die C-Gene sind einzigartig (zwei Cβ-Gene), wohingegen es viele V- und J-Gene gibt. Das ß-Kettencluster enthält etwa 52 V- und 13 J-Segmente. Etwa 70 verschiedene V- und 61 verschiedene J-Gene können während der Bildung neuer α-Ketten durch DNS-Rearrangements aneinander gebunden werden. Nach der VDJ-Rekombination wird die rekombinierte DNS transkribiert. Das Cα-Gen wird anschließend durch RNS-Splicing hinzugefügt. Bei der Kombination der β-Kette fließen zusätzlich 2 D-Gene in das Rearrangement ein. Dadurch entstehen etwa $8 \times 10^6$ Kombinationsmöglichkeiten von Genen zur Bildung von TCRs unterschiedlicher Spezifität (Murphy et al., 2014). Das Genom der Maus beherbergt etwa 300 V-, 20 D- und 4 J-Segmente, woraus sich sogar $3 \times 10^7$ Kombinationsmöglichkeiten ergeben (Day, 2008). Die Rekombination beginnt mit der Verbindung eines zufällig ausgewählten D-Segments mit einem J-Segment, wobei dazwischen liegende Segmente aus der DNS herausgeschnitten werden. Nachfolgend kommt es zur VDJ-Rekombination, wobei zusätzlich ein zufälliges V-Segment eingebracht wird. Die Steuerung der Rekombination erfolgt durch Sequenzen, die jeweils neben dem codierenden Segment liegen, den sogenannten RSS (recombination signal sequences), bestehend aus einem Heptamer, einer sogenannte Spacer-Regionen, die entweder aus 12 oder 23 Basenpaaren (bp) besteht und einem Nonamer. Eine Rekombination kann immer nur zwischen Segmenten erfolgen, wenn eines einen 12-bp- und das andere einen 23-bp-Spacer aufweist. Da sich neben den V- und J-Segmenten jeweils 23-bp-Spacer befinden und an beiden Seiten der D-Segmente 12-bp-Spacer liegen, sind dadurch immer nur VD- und DJ-Kombinationen möglich, aber keine VJ-Kombinationen. Dieses Prinzip gilt im Bezug auf die ß- und δ-Ketten des TCR nicht, hier sind grundsätzlich VJ-Rekombinationen möglich, zusätzliche Kontrollmechanismen verhindern dieses Rearrangement aber. RAG (*recombination activating gene*) -1 und RAG-2 sind für Lymphozyten spezifische Proteine, welche eine wichtige Rolle für die VDJ-Rekombination spielen. Sie sind zuständig für die 12- bzw. 23-Paarung der RSS und führen zum notwendigen Doppelstrangbruch der DNS zwischen der codierenden Sequenz und dem Heptamer des RSS. Ein Fehlen der RAG-1 und -2 Proteine führt dazu, dass keine Antigenrezeptoren und somit auch keine reifen T- oder B-Zellen gebildet werden können. (Weiss, 2007; Roessner, 2008; Schütt, 2011; Weiss et al., 2011, Peter, 2012; Rink, 2012; Murphy et al., 2014). Obgleich der TCR Ähnlichkeiten

mit dem Fab-Fragment der Immunglobuline aufweist, unterscheidet er sich von diesen doch erheblich. Denn während Immunglobuline direkt an Antigene binden können, erkennt der TCR fremde Antigene nur dann, wenn sie an der Oberfläche einer körpereigenen Zelle über den MHC präsentiert werden. (Roessner, 2008; Murphy et al., 2014).

#### 4.1.2.3 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

CD4-positive T-Lymphozyten werden auch als T-Helferzellen bezeichnet, weil ihre Aufgabe überwiegend darin besteht, andere Zellen des Immunsystems zu unterstützen. Nachdem sie Antigene in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen erkannt haben, können CD4-positive T-Zellen zu verschiedenen T-Helfer-Untergruppen differenzieren, welche aufgrund ihrer Lymphokinmuster in Typ-0-Helferzellen ($TH_0$-Zellen), Typ-1-Helferzellen ($TH_1$-Zellen) oder Typ-2-Helferzellen ($TH_2$-Zellen) unterteilt werden. $TH_1$-Zellen bilden vor allem Interleukin 2, y-Interferon und TNF-ß und führen somit zu einer T-Zell- und Makrophagenaktivierung. Wohingegen $TH_2$-Zellen überwiegend Interleukin (IL) -4, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 bilden und damit B-Zellen und deren Antikörperproduktion anregen. Desweiteren gibt es Untergruppen von T-Helferzellen, die eine inhibitorische Wirkung auf T-Zellen haben (regulatorische T-Zellen, Tregs) und somit zur Regulation der Immunantwort beitragen. (Roessner, 2008; Schütt, 2011; Peter, 2012; Murphy et al., 2014). CD8-positive T-Zellen dienen als zytotoxische Zellen der zügigen Abtötung von Pathogenen. Im Zusammenhang mit Molekülen der MHC-Klasse-I können naive CD8-positive T-Zellen zellgebundene Antigene erkennen und durch Ausschüttung ihrer zytoplasmatischen Granula, welche u.a. Perforin und Granzyme B enthalten und die exprimierten FAS-Liganden, Antigene zerstören (Roessner, 2008; Schütt, 2011; Peter, 2012; Murphy et al., 2014)

#### 4.1.2.4 Aktivierung und Differenzierung naiver T-Lymphozyten

Um eine naive antigenspezifische T-Zelle zu aktivieren, werden mehrere Signale benötigt. Zunächst muss der T-Zelle das spezifische Antigen auf der Zelloberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle, zusammen mit dem passenden MHC-Molekül, präsentiert werden. Zusätzlich müssen Korezeptoren stimuliert werden, beispielsweise Moleküle der B7-Familie, wie CD80 und CD86, welche auf der Oberfläche der APC exprimiert werden

und an den CD28-Rezeptor der T-Zelle binden können. Die entstandene Bindung der beiden Zellen wird durch Adhäsionsmoleküle, wie LFA-1 und LFA-2 (Leukozyten Funktionsassoziierten Antigen) auf der T-Zell-Seite und dem interzellulären Adhesionsmolekül 1 (ICAM-1, CD54) und LFA-3 (CD58) auf Seiten der APC, stabilisiert. Die Ausbildung dieser sogenannten immunologischen Synapse führt zu Konformationsänderungen an den Oberflächenmolekülen der T-Zelle. Diese wirken als Signalproteine und lösen eine Reihe von kaskadenartigen Reaktionen innerhalb der T-Zelle aus. Hat eine naive T-Zelle mithilfe einer APC an ihr spezifisches Antigen gebunden, so kommt es zur klonalen Expansion der Zelle und der Differenzierung zu Effektorzellen. Dadurch wird erreicht, dass möglichst viele Klone mit dem passenden TCR zur Verfügung stehen, um den eingedrungenen Erreger zu eliminieren. Proliferation und Differenzierung hängen stark von kostimulierenden Faktoren und der Zytokinproduktion der APCs und auch der T-Zellen selbst ab. Besonders IL-2, welches an hochaffine Zytokinrezeptoren auf den T-Zellen bindet, spielt eine wichtige Rolle. Bindet eine T-Zelle an ihre Liganden ohne dass es zur Freisetzung von kostimulierenden Substanzen kommt, so geht die Zelle durch interne Signale in Apoptose. Die sogenannte intrinsische Apoptose wird beispielsweise durch fehlende Wachstumsfaktoren ausgelöst. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 kommt es zu einer kaskadenartigen Aktivierungen anderer Proteine und schließlich zur Anregung von Caspase 3, einem Protein aus der Caspase-Familie, welche wichtige Zielproteine zerschneidet und somit den Zelltod einleitet. Die Abhängigkeit von kostimulierenden Faktoren soll verhindern, dass die T-Zellen in deren Abwesenheit auf körpereigene Antigene reagieren. Durch die Aktivierung der T-Zellen kommt es zur Differenzierung zu Effektor- oder Gedächtniszellen (Roessner, 2008; Schütt, 2011; Peter, 2012; Murphy et al., 2014).

### 4.1.3 Die T-Zell-Homöostase

Die Diversität der TCRs spielt eine entscheidende Rolle für die Fähigkeit eines Organismus, sich gegen verschiedenste Pathogene verteidigen zu können. Gleichzeitig besteht durch die Vielzahl an T-Zell-Klonen die Gefahr der Autoreaktion und der Überpopulation von bestimmten T-Zell Klonen. Aus diesem Grund unterliegt die T-Zellpopulation, ähnlich wie viele andere Zellpopulationen, verschiedenen Kontrollmechanismen und Regulationen, um ein Gleichgewicht zwischen Zellzahl und TCR-Diversität herzustellen (Surh & Sprent,

2008). Diese Erhaltung des Gleichgewichts innerhalb der Zellpopulation nennt man Homöostase. Die Homöostase reguliert die Größe bzw. Diversität der T-Zell-Population und verhindert im Falle einer Infektion eine überschießende Immunantwort bzw. stellt das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen den verschiedenen T-Zell Klonen wieder her (Roessner, 2008; Schütt, 2011; Peter, 2012; Murphy et al., 2014).

#### 4.1.3.1 MHC-Selbstpeptid Nischen bestimmen die periphere T-Zell Homöostase

Nach dem Heranreifen der T-Zellen im Thymus wandern diese in die Peripherie aus. Dort hängt ihr Überleben von rezeptorvermittelten Signalen und Zytokinen ab (Surh & Sprent, 2008). Im Falle einer Infektion erfolgt die spezifische Stimulation des T-Zell-Klons antigenrezeptorvermittelt über die Interaktion des TCR mit dem MHC-Antigen-Komplex auf der antigenpräsentierenden Zelle. Es folgt eine starke Expansion der T-Zellen, bis zu dem Zeitpunkt, an dem der Erreger eliminiert ist (Peter, 2012; Murphy et al., 2014). Anschließend muss die ursprüngliche Größe der Zellpopulation wiederhergestellt werden. Dazu werden verschiedene Mechanismen, wie etwa der intrinsische programmierte Zelltod genutzt. Bleibt eine Infektion aus, so sind die T-Zellen auf „Selbst-Stimulation“ durch die Interaktion des TCR mit MHC-Selbstpeptid-Komplexen, sowie der Stimulation durch Interleukin 7 angewiesen, um zu überleben (Kassiotis et al., 2003; Kieper et al., 2004). Die benötigten MHC-Selbstpeptid-Komplexe befinden sich vermutlich überwiegend auf dendritischen Zellen in den T-Zell-Zonen der peripheren lymphatischen Organe. Diese Zellen besitzen aber nicht ausreichend kostimulatorisches Potenzial, um eine vollständige T-Zell-Aktivierung auszulösen (Murphy et al., 2014). Diese stimulatorischen MHC-Selbstpeptid-Komplexe werden aufgrund ihrer Diversität als spezifische Nischen bezeichnet und jeweils von verschiedenen Klonen, abhängig von ihrem TCR, besetzt. Die Konkurrenz um diese Nischen reglementiert zum Einen die Zellproliferation und erhält zum Anderen die Polyklonalität der T-Zell-Population (Troy et al., 2003; Min et al., 2005). Die Größe des Zellpools eines T-Zell-Klons wird dadurch reguliert, dass einerseits die Zellen eines TCR-Klons um ihre spezifische Nische konkurrieren (intraklonale Kompetition) und andererseits andere TCR-Klone ebenfalls eine Besetzung dieser Nische anstreben (interklonale Kompetition; Troy et al., 2003; Min et al., 2005)

#### 4.1.3.2 Repopulierungsverhalten und Verteilung reifer T-Zellen nach Transplantation

Die adaptive Immunantwort wird ausschließlich in den peripheren lymphatischen Organen, also in den Lymphknoten, der Milz und den mucosaassoziierten lymphatischen Geweben, ausgelöst. Das bedeutet, dass Fragmente von eingedrungenen Erregern von dendritischen Zellen zunächst zu den peripheren lymphatischen Organen transportiert werden müssen. Dort suchen antigenspezifische T-Lymphozyten permanent die Oberflächen von APCs ab, um die entsprechenden Antigene, sowie die dazugehörigen MHC-Moleküle zu identifizieren (Peter, 2012; Murphy et al., 2014). Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen Antigene von Krankheitserregern zu entdecken, zirkulieren die T-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Lymphknoten, der Milz und den mucosaassoziierten lymphatischen Geweben hämatogen und lymphogen. Findet eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen nicht, verlässt sie das lymphatische Organ und zirkuliert weiter. Kommt es jedoch zu einer Interaktion des TCR mit einem über MHC präsentierten Antigen, so verweilt sie im entsprechenden Organ und die klonale Expansion beginnt (Murphy et al., 2014). Für den Ein- und Austritt aus Blutgefäßen und Lymphknoten werden spezielle Chemokine und Adhäsionsmoleküle benötigt. In den lymphatischen Organen befinden sich im Bereich der T-Zell-Zonen somatische Zellen, welche das Zytokin CCL21 produzieren, das an den Zytokinrezeptor CCR7 bindet, welcher an der Oberfläche von T-Zellen zu finden ist. Somit werden die T-Zellen in die Regionen gelockt, in denen sie gebraucht werden. Mithilfe von Adhäsionsmolekülen kommt es in Venolen mit hohem Endothel (*high endothelial venules*, HEV) zur Diapedese, also zum Auswandern der Zellen in das lymphatische Gewebe (Rink, 2012; Murphy et al., 2014). Neueste Erkenntnisse aus Versuchen im Mausmodell haben gezeigt, dass sich nicht alle Subpopulationen von T-Zellen gleichermaßen in den T-Zell-Zonen der peripheren lymphatischen Organe verteilen, sondern dass es bevorzugte Lokalisationen für CD4-positive und CD8-positive T-Gedächtniszellen gibt. In einer Studie von Yang et al. (2011) wurden Luciferase transduzierte CD4-positive oder CD8-positive T-Gedächtniszellen in Wildtyp-Rezipienten transplantiert und mittels Biolumineszenzbildgebung in der lebenden Maus verfolgt. Des Weiteren wurden Analysen der Chemokin- und Zytokinexpression, sowie Stimulationsversuche durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass CD4-positive T-Gedächtniszellen in großem Maße den Zytokinrezeptor α4β7 exprimieren, welcher IL-7 bindet. IL-7 wird vor allem von somatischen Zellen in den mucosaassoziierten

lymphatischen Geweben, wie den Peyerschen Plaques ausgeschüttet, womit in diesen Geweben ein optimales Mikromilieu für CD4-positive T-Gedächtniszellen vorliegt. CD8-positive T-Gedächtniszellen hingegen exprimieren den Zytokinrezeptor CCR7 in größerem Maße als CD4-positiven T-Gedächtniszellen und sind somit auf die Versorgung mit dem Zytokin IL-15 angewiesen. Periphere Lymphknoten, sowie die Milz, schütten IL-15 aus und locken somit CD8-positive T-Gedächtniszellen an. Daher repopulierten CD4-positive T-Gedächtniszellen im hier geschilderten Mausversuch fast ausschließlich in den Darm-assoziierten lymphatischen Geweben, während CD8-positive T-Gedächtniszellen überwiegend in den peripheren Lymphknoten, sowie der Milz dargestellt werden konnten (Yang et al., 2011). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es ein Mikromilieu-System für die einzelnen Subpopulationen von T-Lymphozyten zu geben scheint, das nicht ausschließlich auf der Verfügbarkeit von spezifischen MHC-Selbstpeptid Nischen basiert und für die beiden T-Zelltypen (CD8, CD4) spezifisch zu sein scheint.

## 4.2 Maligne Lymphome des T-Zell-Systems

Maligne Lymphome sind Entartungen von Zellen lymphatischen Ursprungs. In der Humanmedizin werden sie in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome unterteilt. Die Hodgkin-Lymphome wurden nach dem englischen Arzt Thomas Hodgkin benannt, welcher das Hodgkin-Lymphom 1832 (Hodgkin, 1832) erstmals beschrieb. Sie sind durch das Vorhandensein von Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen charakterisiert, wobei die einkernigen, immunoblastenähnlichen Tumorzellen nur in geringer Anzahl vertreten sind. In Non-Hodgkin-Lymphomen hingegen, dominieren weitestgehend die Tumorzellen das Infiltrat (Böcker, 2004; Swerdlow, 2008; Battegay, 2013). In der Humanmedizin treten maligne Lymphome mit einer Inzidenz von ca. 25 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner weltweit auf (Hiddemann, 2010). Die Rate der Neuerkrankungen steigt stetig an; 2010 waren Non-Hodgkin-Lymphome die 8. häufigste Tumorerkrankung bei Frauen, bzw. 9. häufigste Tumorerkrankung bei Männern in Deutschland (Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut, Stand: 13.12.2013). Die Ätiologie von Lymphomen kann vielseitig sein und ist größten Teils nicht bekannt. Einige Lymphomarten treten virusassoziiert und endemisch auf, wie das Burkitt-Lymphom in Afrika, an dessen Entstehung das Eppstein-Barr-Virus (EBV) als Kofaktor beteiligt ist.

(Hiddemann, 2010; Klapproth & Wirth, 2010). Weiterhin sind reifzellige T-Zell-Lymphome in Japan und der Karibik auf das humane T-Zell-Leukämie/Lymphom-Virus (HTLV-1) zurückzuführen (Hiddemann, 2010). Die Exposition von Menschen gegenüber Pestiziden, vor allem 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure, soll das Risiko an Lymphomen zu erkranken um das 2- bis 8-fache erhöhen (Chiu et al., 2006; Hiddemann 2010). Aufgrund der Vielfalt an lymphatischen Tumoren, wurde bereits früh nach einer Möglichkeit gesucht, eine international anwendbare Klassifikation für Lymphome zu entwickeln. 2001 publizierte die WHO (Weltgesundheitsorganisation) erstmals die international anerkannte WHO-Klassifikation für Lymphome. Sie stellt eine Fortsetzung der 1994 etablierten Revised European American Lymphoma Classification (REAL-Klassifikation) dar und basiert auf der Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome in B- und T-Zell-Lymphome. Weiter entscheiden Lokalisation, Morphologie, Immunhistochemie, biologisches Verhalten und Genetik über die Subtypisierung (Swerdlow, 2008). T-Zell-Lymphome machen etwa 5-10% aller bei Menschen diagnostizierten Lymphome in Deutschland aus und gehören somit zu den selteneren Lymphomarten. Die Inzidenzrate liegt bei einem Menschen pro 100.000 Einwohner. Die häufigsten Untergruppen der T-Zell-Lymphome stellen die sog. unspezifizierten peripheren T-Zell-Lymphome (PTCL-U), das anaplastische, großzellige Lymphom (ALCL) und das angio-immunoblastische T-Zell-Lymphom dar (AITL; Zettl, 2014).

### 4.2.1 Humanes ALK-positives anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL, Anaplastic Large Cell Lymphoma)

Das humane ALK-positive ALCL wurde erstmals 1985 als pleomorphes, großzelliges Lymphom beschrieben und klassifiziert (Stein et al., 1985). Zuvor wurde es häufig als metastasiertes Karzinom, Histiozytom oder Melanom fehlinterpretiert (Kinney et al., 2010). Es handelt sich um ein Non-Hodgkin-Lymphom vom T- oder Null-Zelltyp, das durch die Expression des ALK-Proteins, sowie des Oberflächenmarkers CD30 definiert wird. Am häufigsten tritt das ALK-positive ALCL bei Kindern und jungen Erwachsenen auf und macht etwa 10-20% der pädiatrischen Lymphomerkrankungen aus. Mit einer Prävalenz von 1,5 : 1 erkranken Jungen häufiger als Mädchen (Swerdlow, 2008). Das ALCL tritt sowohl in Lymphknoten als auch extranodalen Lokalisationen auf. Da die Haut häufig betroffen ist, kann eine Einteilung in ein primär kutanes oder primär systemisches ALK-positives ALCL erfolgen (Kinney et al., 2010). Die meisten Patienten (etwa 70%) werden erst in

fortgeschrittenen Stadien (III-IV) mit Lymphadenopathien und unspezifischen Symptomen, wie Fieber oder Gewichtsverlust, vorstellig. Die anaplastische Lymphomkinase wird im gesunden Organismus nur in wenigen Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert (Iwahara et al., 1997). Sie gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und ist für die reversible Übertragung einer Phosphatgruppe auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin eines anderen Proteins verantwortlich. Durch diese Signalübertragung wird die Aktivität des Zielproteins beeinflusst (Berg, 2012). In den meisten ALCL-Fällen wird eine Translokation des ALK-Gens festgestellt. Das ALK-Gen kann dabei mit unterschiedlichen Partnergenen fusionieren. Am häufigsten (etwa 84%) wird die Translokation t(2;5)(p23;q35), zwischen dem ALK-Gen auf Chromosomen 2 und dem Nucleophosmin-Gen (NPM) auf Chromosomen 5 gefunden. Daraus entsteht ein chimäres Protein, indem sich der N-terminale Anteil von NPM mit dem intrazytoplasmatischen Anteil von ALK verbindet (Swerdlow, 2008; De Leval & Gaulard, 2011). NPM ist physiologischer Weise ubiquitär für den intrazellulären Transport von Proteinen verantwortlich. Durch die Transkription und Translation des entstandenen Fusionsonkogens NPM-ALK werden verschiedene Signalwege, wie etwa STAT3 (signal transducer and activator of transcription), PI3-K/AKT (phosphatidylinositol-3 kinase/AKT) und PLC (Phospholipase C) aktiviert (Morris et al., 1997; Zamo et al., 2002; Hiddemann, 2005; Duplantier et al., 2006; Kinney et al., 2010). STAT3 ist ein Transkriptionsaktivator, der nach Stimulation durch Rezeptorkinasen phosphoryliert wird und anschließend in den Zellkern gelangt, wo er die Transkription bestimmter Genabschnitte fördert. Besitzt der Rezeptor keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, so wird diese von rezeptorassoziierten zytoplasmatischen Proteinen der Januskinase-Familie (JAK) bereitgestellt. Vor allem Wachstumsfaktoren und antiapoptotische Proteine werden vermehrt transkribiert und der Zelle somit Wachstum, Proliferation und ein verlängertes Überleben ermöglicht. Durch Aktivierung von PI3K wird nachfolgend Akt aktiviert, ein Protoonkoprotein. BAX, ein Protein welches im Falle des programmierten Zelltodes die Zellmembran der Mitochondrien zerstört, wird ebenfalls durch NPM-ALK beeinflusst. Ob es hoch oder runter reguliert wird, wird zurzeit noch kontrovers diskutiert (Rassidakis et al., 2001; Kinney et al., 2010). Die eingeleiteten Signalkaskaden führen zu Zellproliferation, verlängertem Überleben der Zelle, Umgestaltung des Zytoskeletts, Apoptoseinhibition und Zellmigration (Morris et al., 1997; Zamo et al., 2002; Hiddemann, 2005; Duplantier et

al., 2006; Kinney et al., 2010). Die Prognose von ALK-positiven ALCLs ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 60-90% deutlich besser, als die von ALK-negativen ALCLs (5-Jahres-Überlebensrate 20-45%) (Gascoyne et al., 1999; Swerdlow, 2008; Hiddemann, 2009), da ALK-negative ALCLs meist bei älteren Patienten auftreten und diese schlechter auf Chemotherapeutika ansprechen. Bei den ALK-negativen ALCLs variieren die klinischen und genetischen Merkmale. Bei einigen ALK-negativen ALCLs werden Gen-Rearrangements in der Nähe des DUSP22-Gens (Dual Specificity Phosphatase 22) gefunden, einem Gen welches für ein Protein kodiert, das ebenfalls STAT3 und andere Signalwege aktiviert und so zu Zellwachstum und verlängertem Überleben führt. ALK-positive ALCLs werden häufig mit CHOP (Kombinationschemotherapie aus den Wirkstoffen Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednisolon) oder CHOP-verwandten Regimen behandelt. ALK-negative ALCLs werden ähnlich, häufig aber mit höherer Dosis der Medikamente behandelt (Hiddemann, 2005; Hiddemann, 2009; Adam, 2011). Außerdem werden zunehmend spezifische NPM-ALK-Inhibitoren erforscht, wie z.B. NVP-TAE684 (Galkin et al., 2006).

#### 4.2.1.1 Histologische Charakterisierung ALK-positiver ALCLs

Die Tumorzellen des ALK-positiven ALCL sind pleomorph, meist sind sie groß und enthalten reichlich Zytoplasma (Abb. 2; Swerdlow 2008; Stein et al., 2010).

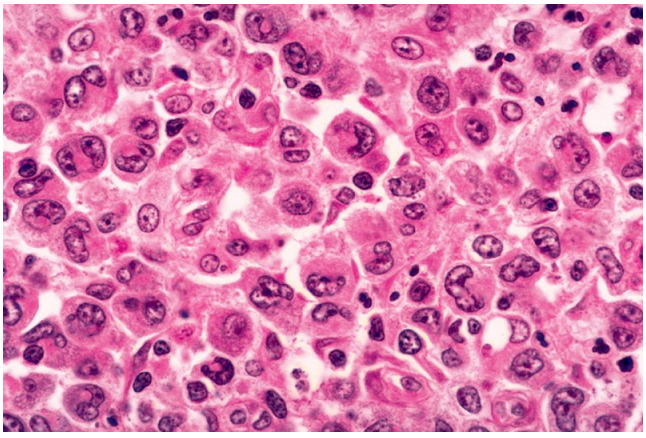


**Abb. 2 Klassisches ALK-positives ALCL**
Das klassische histologische Bild eines ALK-positiven ALCLs des Menschen mit pleomorphen, anaplastischen Zellen und den typischen hufeisenförmigen Zellkernen. *Quelle*: Swerdlow (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.*

Ihre Nuclei sind exzentrisch angeordnet und häufig hufeisen- oder bohnenförmig mit multiplen Nucleoli. Größere Tumorzellen mit hufeisenförmigem Zellkern werden “Hallmark-Zellen” genannt und gelten als kennzeichnend für das ALK-positive ALCL, da sie in allen Varianten des ALCL wiederzufinden sind (Abb. 2; Foss et al., 2000; Swerdlow 2008). Neben dem klassischen ALK-positiven ALCL, gibt es noch andere beschriebene Varianten. Das kleinzellige ALCL (5-10% der ALK-positiven ALCL-Fälle) ist durch eine eher monomorphe Zellpopulation, bestehend aus kleineren Tumorzellen gekennzeichnet. In einigen dieser Fälle, liegen die Zellkerne zentral und weisen multiple Nucleoli auf, während das Zytoplasma eher blass erscheint. Diese Zellen werden aufgrund ihrer optischen Ähnlichkeit zu Spiegeleiern auch “fried egg cells” genannt (Abb. 3; Swerdlow, 2008).

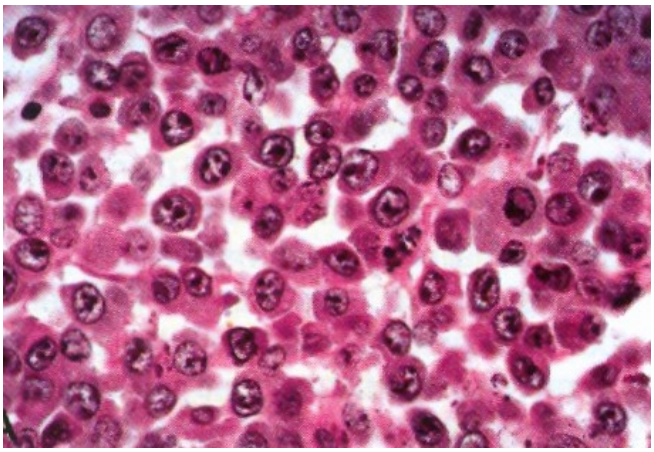


**Abb. 3 Atypisches, kleinzelliges ALK-positives ALCL**
Monomorphe Zellpopulation kleiner bis mittelgroßer Zellen mit zentral liegenden, runden Zellkernen.
*Quelle*: Swerdlow (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.*

Eine weitere Variante, die histiozytäre, zeichnet sich durch das Vorhandensein eines massiven inflammatorischen Begleitinfiltrats aus Histiozyten aus, welche die Tumorzellen maskieren können (etwa 10% der ALK-positiven ALCL-Fälle). Die „Hodgkin-like“ Variante (etwa 3% der ALK-positiven ALCL-Fälle), weist große Ähnlichkeiten zum klassischen Hodgkin-Lymphom auf (*Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma*, NSCHL).

### 4.2.1.2 Immunhistochemische Charakterisierung ALK-positiver ALCLs

Die bereits erwähnte Expression von ALK und CD30 lässt sich auch immunhistochemisch darstellen und wird daher auch diagnostisch eingesetzt (Abb. 4; Swerdlow, 2008).

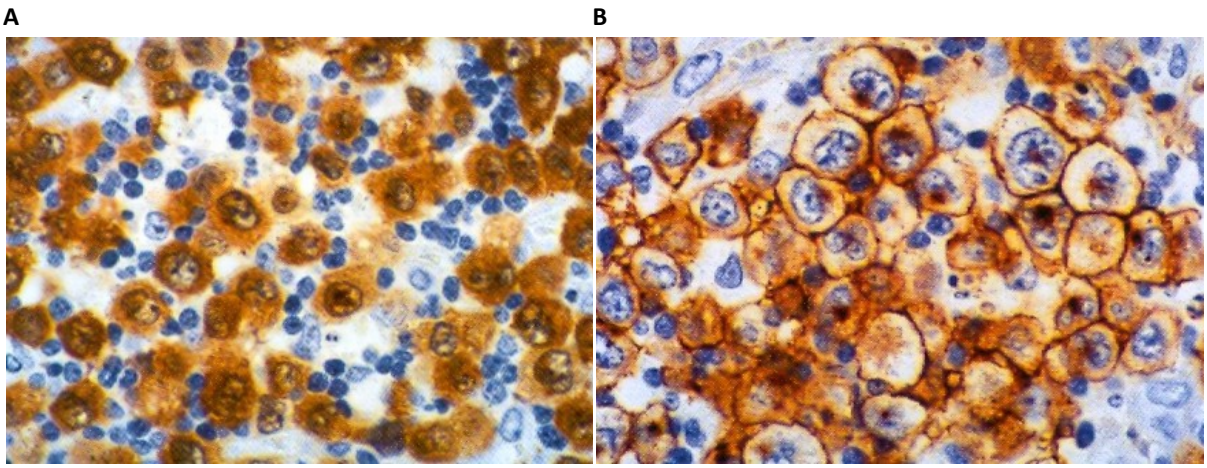



**Abb. 4 Immunhistochemie zum Nachweis von ALK und CD30**
(A) Immunhistochemischer Nachweis von ALK im Präparat eines humanen ALCLs. (B) Immunhistochemischer Nachweis von CD30 im Präparat eines humanen ALCLs.
*Quelle*: Swerdlow (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.*

CD30 ist ein Protein, welches zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren gehört und dessen Expression sowohl in Tumoren, als auch in aktivierten T- und B-Zellen erhöht sein kann. Es wird vor allem an der Zellmembran und im Bereich des Golgi Apparats detektiert. Die Tumorzellen der kleinzelligen Variante exprimieren nicht immer CD30, hin und wieder lässt sich der Tumormarker nur schwach oder sogar gar nicht darstellen (Swerdlow 2008). ALK ist in der Regel sowohl an der Zelloberfläche, als auch im Kern detektierbar. Bei anderen Varianten der Gen-Translokation, kann ALK aber auch im Zytoplasma darstellbar sein. Der T-Zellmarker CD3 ist in etwa 70% der ALCL-Fälle immunhistochemisch nicht mehr exprimiert. CD2, CD4 und CD5 hingegen fallen in etwa 70% der immunhistochemischen Färbungen positiv aus (Swerdlow 2008). TIA-1 (Cytotoxic Granule-Associated RNA Binding Protein), Granzym B und Perforin, zytolytische Proteine, wie sie in zytotoxischen T-Zellen gefunden werden, sind immunhistochemisch häufig nachweisbar, wohingegen CD8 (zytotoxische T-Zellen) meist nicht mehr an der Zelloberfläche zu detektieren ist. Die Tumorzellen sind meist stark positiv für den Oberflächenmarker CD25 (regulatorische T-Zellen) und variabel positiv für CD45 (Leukozytenmarker; Swerdlow, 2008).

### 4.2.2 Lymphome in der Veterinärmedizin

Maligne Lymphome der Haussäugetiere entsprechen in ihrem klinischen Verhalten, der Morphologie und Symptomatik den Non-Hodgkin-Lymphomen des Menschen (Valli, 2002; Thomas et al., 2011; Kessler, 2012; Marconato et al., 2013). Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen, die Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms, konnten in der Veterinärmedizin bisher nicht beobachtet werden (Fournel-Fleury et al., 2002; Valli, 2002; Kessler, 2012). Jährlich werden etwa 13-33 Neuerkrankungen pro 100.000 Hunde verzeichnet, mit einem durchschnittlichen Alter von 6,3-7,7 Jahren. Eine Geschlechtsdisposition wurde bei Hunden bisher nicht nachgewiesen (Teske et al., 1994; Kessler, 2012). Deutlich erkennbare Rassedispositionen bei Hunden, wie Boxern, Scottish Terriern, Basset Hound, Airedale Terriern, Golden Retrievern, Bulldoggen und Bouvier des Flandres deuten auf genetische Ursachen der Krankheitsentstehung hin (Modiano et al., 2005; Bergmann, 2011). Katzen erkranken weit häufiger an Lymphomen, mit einer alterskorrigierten jährlichen Inzidenz von 160 Neuerkrankungen pro 100.000 Katzen (Schneider et al, 1983). Etwa 33% aller felinen Neoplasien haben einen hämatopoetischen Ursprung, davon sind über 90% maligne Lymphome (Kessler, 2012). Prinzipiell ist die Ätiologie von malignen Lymphomen in der Veterinärmedizin ebenso vielfältig wie in der Humanmedizin. Bei Hunden konnten chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden, wobei ein Zugewinn von Genen häufiger vorkommt als ein Verlust. Besonders häufig konnte ein Zugewinn bei Chromosomen 13 gefunden werden, weniger häufig ein Zugewinn in Chromosomen 31. Es wird angenommen, dass Hunde mit einer Trisomie des Chromosoms 13 eine bessere durchschnittliche Überlebenszeit erwarten können, als bei anderen Veränderungen (Hahn et al., 1994, Kessler, 2012). Neben chromosomalen Veränderungen, konnten bei Tieren ebenfalls Zusammenhänge zwischen der Exposition mit dem Pestizid 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und der Entstehung maligner Lymphome gefunden werden (Hayes et al., 1995). Virale Ätiologien sind bei Katzen, Hühnern, Mäusen, Schafen und Rindern bekannt (Jarrett et al., 1964; Rous et al., 1983; Schödel et al., 1986). Das Feline Leukämie Virus (FeLV), ein Virus aus der Familie der Gammaretroviren, wurde 1964 erstmals aus einer Katze mit Thymuslymphom isoliert (Jarrett et al., 1964). Das FeLV ist ein umhülltes RNS-Virus, welches sein Genom mithilfe der reversen Transkriptase in DNS umschreibt und ins Wirtsgenom integriert. Es befällt Katzen jeden Alters und wird über Tröpfcheninfektion, sowie transplazentar übertragen.

Nach primärer Vermehrung in den Schleimhäuten und Lymphknoten des oberen Respirationstrakts kommt es zur ersten Virämie. Dadurch gelangt das Virus hämatogen ins Knochenmark und vermehrt sich in den Lymphozyten (Liess et al., 2010). Die Signalübertragung, welche durch die Integration der Virus-DNS eingeleitet wird, führt zu Zellproliferation und Transformation der Zellen (Terry et al., 1992; Tsatsanis et al., 1994; Dahme, 2007; Lutz, 2014). Dank gut entwickelter Test- und Impfprogramme, hat der Anteil FeLV-positiver Lymphome in den vergangenen Jahren stark abgenommen (Louwerens et al., 2005, Kessler, 2012). In der Veterinärmedizin wird zunehmend versucht Klassifikationen aus der Humanmedizin für Hunde und Katzen (modifiziert) zu übernehmen (Kiupel et al., 1999; Valli et al., 2000; Parodi, 2001). Im Jahr 2002 publizierte die WHO die „Revised European-American-Lymphoma Classification for Domestic Animals“, eine Abwandlung der in der Humanmedizin Anwendung findenden REAL-Klassifikation (Valli et al., 2002; Vezzali et al., 2009). Im Rahmen dieses Klassifizierungsschemas werden Lymphome anhand ihrer Morphologie, dem biologischen Verhalten und dem Immunophänotyp unterschieden und grundlegend in B- oder T-Zell-Lymphome unterteilt. Die meisten multizentrischen Lymphome des Hundes gehören zu den B-Zell-Lymphomen (Teske et al., 1994; Wilkerson et al., 2005; Guija de Arespacochaga et al., 2007). Dabei sind bestimmte Rassen, wie Dobermann und Cockerspaniel, prädisponiert B-Zell-Lymphome zu entwickeln, wohingegen andere Rassen, wie Boxer und Irischer Wolfshund, eher an T-Zell-Lymphomen erkranken (Modiano et al., 2005). In einer Studie von 2011 wurde die modernisierte „Revised European-American-Lymphoma Classification for Domestic Animals“ auf ihre Genauigkeit und Handhabung untersucht. Dazu haben 20 Veterinärpathologen 300 Lymphom-Fälle mithilfe des neuen Klassifizierungsschemas untersucht und mit einer Genauigkeit von 83% klassifiziert (Valli et al., 2011). Dies lässt auf eine gute Anwendbarkeit der modifizierten REAL-Klassifikation schließen. Einige in der Humanmedizin bereits fest verankerte Testverfahren, wie die Immunhistochemie oder Durchflusszytometrie, finden in der Tiermedizin zwar Anwendung, sind allerdings noch nicht vollends ausgereift (Fisher et al., 1995; Fournel-Fleury et al., 1997; Vernau et al., 1999; Pohlmann et al., 2009; Willmann et al., 2009; Comazzi & Gelain, 2011). Protokolle für die immunhistochemische Färbung von histologischen, paraffineingebetteten Präparaten von Hunden und Katzen für die Lymphozytenmarker CD3, CD79a, sowie CD45 und ähnliche sind bereits bekannt

und etabliert. Dasselbe gilt für histologische Präparate von Nagern, welche vor allem für die Forschung eine wichtige Rolle spielen. Immunhistochemische Färbeverfahren für Tumormarker oder auch die T-Zellmarker CD4 und CD8 für formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebe sind in der Veterinärmedizin noch nicht etabliert (Guija de Arespacochaga et al., 2005; Althoff, 2012). Man geht davon aus, dass es sich bei CD8 um ein fixierungs- und prozessierungssensitives Antigen handelt, welches durch Formaldehyd teilweise zerstört wird. Zusätzlich wird die Diffusion von Antikörpern durch die Paraffinschicht erschwert. Besonders schwierig gestaltet sich die Darstellung bei Katzen, aber auch bei anderen Tierarten wie Schafen und Rindern (Breugelmanns et al., 2011; Althoff, 2012). Unklar ist bisher, ob für die Lymphomfälle von Hunden und Katzen ähnliche Tumormarker wie in der Humanmedizin überhaupt eine Rolle spielen (beispielsweise CD30 und ALK). Allerdings treten auch in der Veterinärmedizin Fälle von Lymphomen auf, welche den humanen ALK-positiven ALCLs morphologisch ähneln. Diese fallen häufig unter den Begriff der „Rundzelltumore“. Dabei handelt es sich um Tumore unterschiedlicher histogenetischer Herkunft, die vor allem zytologisch einige Ähnlichkeiten zueinander aufweisen (Aupperle et al., 2012). Zu den Rundzelltumoren zählen Mastzelltumore, Lymphome, Melanome, histiozytäre Tumore und Plasmazelltumore sowie Sticker-Tumore und Merkelzelltumore. Eine ausführliche Untersuchung von Rundzelltumoren bei Hunden und Katzen aus Deutschland wurde 2010 durchgeführt (Aupperle et al., 2012). 90 % der analysierten Rundzelltumore stammten vom Hund, während Präparate von der Katze lediglich 10 % ausmachten. Beim Hund kamen am häufigsten histiozytäre (33,6 %), mastozytäre (32,2 %) und melanozytäre (20,1 %) Tumoren vor. Dagegen überwogen bei der Katze die lymphozytären (51,2 %) und mastozytären (32,7 %) Neoplasien (Aupperle et al., 2012). Einige amerikanische Veterinärpathologen bezeichnen einen Teil der Rundzelltumore bereits als kanine bzw. feline ALCLs, wenn sie den morphologischen Kriterien des klassischen humanen ALCL entsprechen (Abb. 5; Valli, 2007).

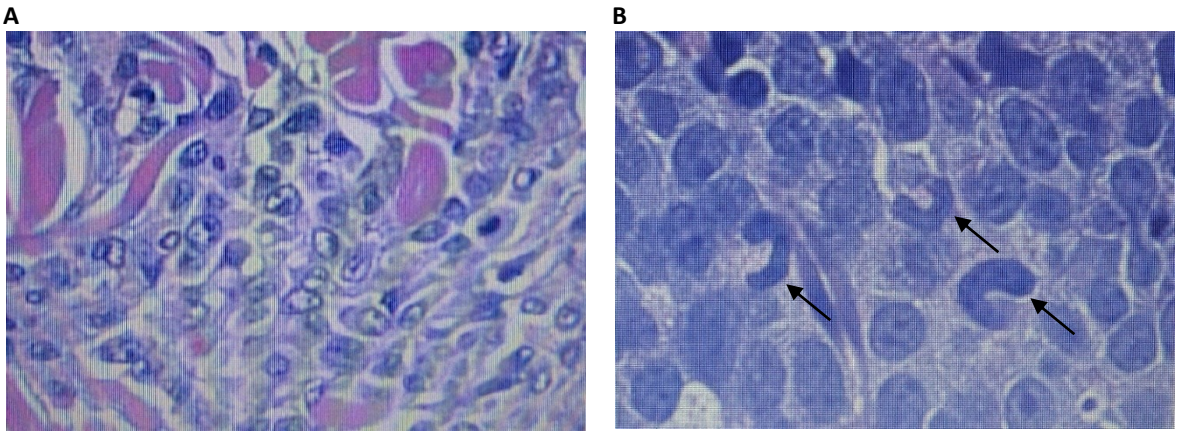



**Abb. 5 Histologische Präparate von ALCL-Fällen bei Hunden**
(A) Histologisches Präparat eines kutanen ALCL beim Hund, welches morphologisch dem Bild eines klassischen ALCL des Menschen entspricht. (B) Hallmark-Zellen im ALCL eines Hundes (Pfeile).
*Quelle*: modifiziert nach Valli (2007). *Veterinary Comparative Hematopathology.*

Der Immunophänotypisierung sollte mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden, da eine korrekte Klassifizierung von malignen Lymphomen deutlich vereinfacht und präzisiert werden könnte (Day et al., 2004). Ein Therapieversuch kann bei Hunden und Katzen mithilfe von Chemotherapeutika erfolgen, beispielsweise mit Doxorubicin in einer Monotherapie oder aber mit einer Polychemotherapie (z.B. CHOP-Protokoll), welche deutlich bessere Ergebnisse erzielen (Van Vechten et al., 1990; Moreno, 2006; Kessler, 2012; Valli et al., 2013).

## 4.3 Retroviren und retrovirale Vektoren

### 4.3.1 Retroviren

Retroviren (Retroviridae) kommen weltweit hauptsächlich bei Vertebraten, jedoch auch bei Insekten und Mollusken vor. Sie sind mit vielen Krankheiten wie Krebs, neurologischen Störungen und Immundefizienzen assoziiert und werden in sieben Genera unterteilt (Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon-, Lenti- und Spumaretrovirus). Retroviren sind etwa 100 nm große, behüllte Viren deren Genom als einzelsträngige RNS (Ribonukleinsäure) vorliegt. Das Genom ist linear und etwa 7-12 Kilobasenpaare (kb) groß. Es ist diploid angelegt, was bedeutet, dass in jedem Viruspartikel zwei Kopien des Genoms vorliegen. Der Kernbereich des viralen Partikels wird von einer Proteinhülle aus Kapsidproteinen umschlossen. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht auf

deren Oberfläche virale Hüll-Glykoproteine zu finden sind (envelope, Env; Abb. 6; Roessner, 2008; Liess et al., 2010; Kessler, 2012).

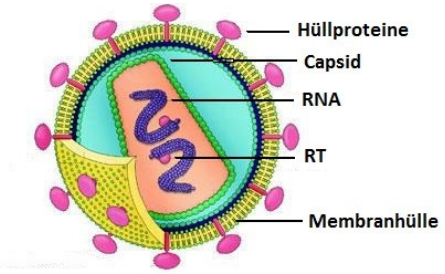



**Abb. 6 Schematische Darstellung eines Retrovirus**
Schematische Darstellung eines Retrovirus mit der Membranhülle, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, den Hüllproteinen, dem inneren Capsid und der darin enthaltenen RNS, sowie der reversen Transkriptase (RT). Quelle: modifiziert nach *Spektrum der Wissenschaft, Akademischer Verlag*, Heidelberg, 2001.

Das virale Genom kodiert für *gag, pro, pol* und *env*. Die gag Sequenz kodiert hierbei für Strukturgene, während das pro Gen für das Enzym Protease kodiert, welches für die Spaltung des Gag/Pro/Pol-Polyproteins verantwortlich ist. Das env Gen kodiert für die viralen Hüll-Glykoproteine und die pol Sequenz kodiert für die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase. Die Reverse Transkriptase schreibt die einzelsträngige RNS des Virus in doppelsträngige DNS um, welche mit Hilfe von Integrasen in das Wirtsgenom integriert wird. Der Replikationszyklus der Retroviren kann in zwei Phasen unterteilt werden: während der ersten Phase heftet sich das Virion mittels seiner Hüll-Glykoproteine an spezifische Zelloberflächenrezeptoren der Wirtszelle an, wodurch es zur Verschmelzung der Virusmembran mit der Wirtszellmembran und der Internalisierung des Viruspartikels kommt. Im Zytoplasma kommt es zum Umschreiben der viralen RNS zur DNS mittels der Reversen Transkriptase und zur anschließenden Integration der viralen DNS in das Wirtsgenom. Der Transport der viralen DNS ist bei Gammaretroviren abhängig von der mitotischen Aktivität der Wirtszelle. Die in das Wirtsgenom integrierte Form des Virus wird als „Provirus“ bezeichnet. Während der zweiten Phase werden virale Proteine synthetisiert und zu neuen Virionen assembliert. An Bereichen der Wirtszellmembran welche Env-Proteine enthalten, erfolgt die Ausschleusung der neuen Viruspartikel, welche somit ihre Hülle erhalten und wieder infektiös sind. Sind keine Env-Proteine vorhanden, bleiben die Partikel umhüllt, aber nicht-infektiös. Das Provirus bleibt nach

gammaretroviraler Infektion fester Bestandteil des Wirtsgenoms und wird an alle Tochterzellen weitergegeben (Roessner, 2008; Liess et al., 2010; Kessler, 2012).

### 4.3.2 Retroviren und deren transformierendes Potential

Retroviren sind dank dem Enzym „Reverse Transkriptase“ in der Lage, ihre einzelsträngige RNS in doppelsträngige DNS umzuschreiben und anschließend in das Genom der Wirtzelle zu integrieren. Einige Retroviren haben im Laufe der Evolution Protoonkogene aus Wirtszellen in ihr Genom aufgenommen, welche man als v-Onkogene (v-onc) bezeichnet. Ein Beispiel hierfür ist das Rous-Sarkom-Virus (RSV), welches neben seinen Strukturgenen noch das Gen *src* enthält (Rous et al., 1983). Es kodiert für eine Tyrosinkinase, ein Enzym das Tyrosin-Seitenketten von Proteinen phosphoryliert und somit Signalkaskaden in Gang setzt, welche zur Zellproliferation führen (Brikell, 1992). Die Proteinbiosynthese dieser Onkogene untersteht aufgrund der starken Enhancer- und Promoter-Elemente der Viren kaum entwicklungsspezifischen Regulationen, was deren Wirkung noch unterstützt. Die virale DNS wird von LTRs (*long terminal repeat*) flankiert, eine DNS-Wiederholungseinheit, welche unter anderem die viralen Enhancer und Promoter enthält. Die Enhancer sind zu den cis-Elementen gehörende DNS-Abschnitte mit spezifischer Basenabfolge (z.B. TGTGCTAAG), welche die Anlagerung des Transkriptionskomplexes an den Promotor verstärken. Der Promotor ist ein dem eigentlichen Genabschnitt vorgeschaltetes Steuerelement (TATA-Box), an welches die RNS-Polymerase binden kann und somit die Transkription einleitet. Retroviren, welche ein zusätzliches v-Onkogen enthalten, bezeichnet man auch als akut transformierende onkogene RNS-Viren (Roessner, 2008). Jedoch besitzen nicht alle Retroviren diese zusätzlichen v-Onkogene und können dennoch zur Entartung ihrer Wirtszellen führen. Die onkogene Wirkung kann zustande kommen, indem virale DNS in der Nähe von zellulären Protoonkogenen (z.B. *c-myc*) oder Tumorsuppressorgenen (z.B. *p53*) integriert wird. Wird die Virus-DNS in Nachbarschaft zu einem zellulären Protoonkogen integriert, kann dies zur Überexpression des kodierten Proteins führen. Es können aber auch Tumorsuppressorgene, also Gene die für Proteine kodieren, welche in der Hemmung und Regulation des Zellwachstums eine wichtige Rolle spielen, inaktiviert werden, in dem es durch strukturelle Veränderungen zu Funktionsverlust kommt oder der virale Promotor die Synthese der kodierten Proteine unterdrückt (Ausprägung lediglich wenn Ausfall von beiden Allelen). Dieser Vorgang wird

als transkriptionelles „Gene Silencing“ (deut. genetische Stilllegung) bezeichnet (Jacobi, 2011). Beide Mechanismen können zur Transformation von normalen Zellen führen. Wie in Insertionsmutagenesestudien nachgewiesen werden konnte, integriert beispielsweise das Feline Leukämievirus (FeLV) seine virale DNS sehr häufig in der Nähe des Locus von *c-myc* (Levy et al., 1984; Tsatsanis et al., 1994). Auch das Murine Leukämievirus (MuLV), ein Gammaretrovirus, oder das Humane Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1), ein Lentivirus, integrieren ihre DNS bevorzugt in transkriptionell aktiven zellulären Genen (Schröder et al., 2002; Cereseto & Giacca, 2004).

### 4.3.3 Retrovirale Vektoren in der Gentherapie

Die moderne Gentherapie versucht die Eigenschaften von Retroviren zu nutzen, um fehlende oder mangelhafte Gene in Patienten zu ersetzten, ohne die Risiken der erwähnten Insertionsmutagenese einzugehen. Ihren Ursprung nahmen die Forschungsarbeiten dazu Mitte der 1960er Jahre, als man entdeckte, dass Polyomaviren, wie das Simian Virus 40, ihre genetische Information vererblich in ihre Zielzellen integrieren können (Sambrook et al., 1968). Auf Grundlage dieser Entdeckung entstand die Idee erbliche Krankheiten mittels Gentherapie zu heilen. In der Gentherapie werden intakte Kopien von fehlenden oder beschädigten Genen bzw. Genabschnitten, in die betroffenen Zellen von Patienten eingebracht. Die Einschleusung der gewünschten Gene erfolgt mittels Vektoren. Gentransfer Vektoren sind Hilfsmittel welche dazu benutzt werden, genetische Informationen in Zellen einzubringen. Man unterscheidet zwischen nicht-viralen, viralen und bakteriellen Vektoren. Unter den viralen Vektoren kommt die größte Bedeutung den retroviralen und adenoviralen Vektoren zu (Miller et al., 1993). Ein Vorteil der Retroviren ist, dass sie stabil ins Wirtsgenom integrieren und die Informationen so an alle Wirts-Tochterzellen weitergegeben werden. Von oberster Priorität beim Umgang mit Gentransfer Vektoren ist, dass die Vektoren den Wirt nicht schädigen und sich vor allem nicht ungehindert vermehren können. Daher enthalten gammaretrovirale Vektoren keine Information zur Generierung viraler Proteine (Abb. 7). Somit sind die Vektoren auf einen Infektionszyklus beschränkt und replikationsinkompetent.

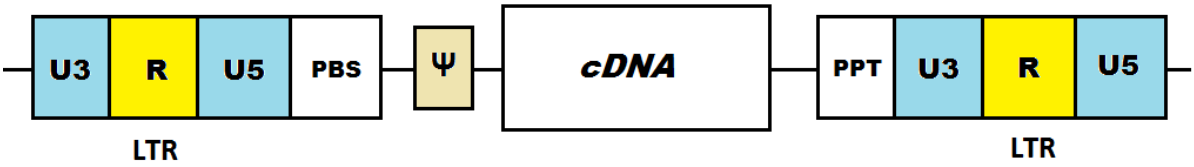



**Abb. 7 Schema eines retroviralen Vektors**
LTR-getriebener retroviraler Vektor, mit der 3´,5´LTR, dem Verpackungssignal Ψ, sowie der cDNS. *Quelle*: modifiziert nach Newrzela, 2008.

Retrovirale Strukturgene können durch jedes beliebige (therapeutische) Gen ersetzt werden. Beschränkend ist lediglich eine Verpackungsgröße von 8-10 kb, da die Partikel größere Gene nicht fassen können. In der Gentherapie kann die Einschleusung der gewünschten (therapeutischen) Gene in vivo, also an Zellen innerhalb des Patienten, oder aber ex vivo, also an Zellen die anschließend in den Körper des Patienten eingebracht werden, stattfinden. Die Gentherapie kann entweder nur somatische Zellen oder auch Zellen der Keimbahn betreffen, wobei genetische Veränderungen der Keimbahnzellen in Deutschland im Rahmen des Embryonenschutzgesetzes verboten sind (EschG §5), da sie nicht nur den Patienten, sondern auch dessen Nachkommen betreffen würden. Nach vielversprechenden experimentellen Studien erlitt die Gentherapie in den 1990er Jahren schwere Rückschläge, da es zu Unverträglichkeiten mit adenoviralen Vektoren kam (Marshall, 1999). Ein großes Problem bei der Arbeit mit retroviralen Vektoren, stellt die bereits erwähnte Möglichkeit der Insertionsmutagenese dar. Die Transaktivierung von Genen durch starke Promotor- und Enhancerelemente des Vektors, stellen aktuell die klinisch relevanteste Form der Insertionsmutagenese dar. Ende der 1990er Jahre wurden erstmals an SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*, deut. schwere kombinierte Immundefizienz), einer angeborenen Immunschwäche, erkrankte Patienten mithilfe von Gentherapie an hämatopoetischen Stammzellen geheilt. SCID-Patienten leiden an genetischen Defekten, durch welche es zur Abwesenheit von T-Zellen und je nach Form auch von B- und Natürlichen Killer-Zellen kommt. Mithilfe retroviraler Vektoren, konnte das korrekte Gen in die Patienten übertragen werden und ein intaktes Immunsystem entwickelt werden. Jahre später erkrankten dieselben Patienten aber an Leukämie, ausgelöst aufgrund von Insertionsmutagenese durch die zur Gentherapie verwendeten retroviralen Vektorpatikel (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Dies machte erneut deutlich, wie wichtig die Entwicklung sicherer Vektoren für die Gentherapie ist. Zunehmend werden daher auch lentivirale Vektoren, auf Basis des Humanen Immundefizienz Virus

(HIV), verwendet, da diese im Gegensatz zu den gammaretroviralen Vektoren einen Gentransfer in ruhende Zellen ermöglichen (Connolly, 2002; Naldini et al., 1996). Dies hat zum Einen den Vorteil, dass auch ruhende Gewebe, wie Nervenzellen, erreicht werden können und zum Anderen mindert es die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Insertionsmutagenese in für den Zellzyklus relevanten Genabschnitten, da wie bereits geschildert gammaretrovirale Vektoren bevorzugt in den Transkriptionsstart von aktiv transkribierten Genen integrieren. Außerdem können Gene mit einer Größe von bis zu 18 kb verpackt werden (Kumar et al., 2001). Allerdings kann auch bei lentiviralen Vektoren eine Insertionsmutagenese nicht ausgeschlossen werden. Daher beschäftigen sich neueste Forschungsarbeiten mit der Entwicklung viraler Vektoren deren Integration sich in ungefährliche Genloci steuern lässt, beispielsweise mithilfe von rekombinanten adeno-assoziierten Viren (rAAV), welche spezifisch in das humane Chromosomen 19 integrieren (Huttner et al., 2003; Ivics et al., 2007).

### 4.3.4 Kontrollmechanismen bei der Transformationsresistenz reifer T-Lymphozyten nach retroviraler Transduktion

Nicht nur hämatopoetische Stammzellen, sondern auch reife T-Zellen können als Zielzellen der retroviralen Gentherapie eingesetzt werden. Die Gefahr einer retroviral-bedingten Transformation reifer T-Zellen nach genetischer Modifikation war lange unklar. Deshalb wurden in einer Sicherheitsstudie Rag-1-defiziente Empfängermäuse entweder mit hämatopoetischen Stammzellen oder mit reifen T-Zellen von Wildtyp-Mäusen transplantiert (Newrzela et al., 2008). Alle Zellen wurden vor der Transplantation mithilfe von retroviralem Gentransfer modifiziert, so dass sie entweder lediglich ein Reportergen (GFP) oder zusätzlich verschiedene bekannte T-Zell Onkogene, wie ΔTrkA (Tropomyosin receptor kinase A), LMO2 (LIM domain only 2) und TCL-1 (T-cell leukemia/lymphoma protein 1) exprimierten. Alle Mäuse, die mit Onkogen transduzierten, hämatopoetischen Stammzellen transplantiert wurden, entwickelten nach entsprechenden Latenzzeiten Lymphome oder Leukämien. Die Transplantation reifer T-Zellen hingegen induzierte keine Neoplasien. Somit konnte gezeigt werden, dass reife TCR-polyklonale T-Zellen eine relative Resistenz gegenüber einer Transformation nach retroviralem Gentransfer von T-Zell Onkogenen aufweisen (Newrzela et al., 2008). In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass es die TCR-Polyklonalität ist, die vor dem Auswachsen eines

malignen T-Zell Klons schützt (Newrzela et al., 2012). Spenderzellen von sogenannten (TCR-transgenen) OT-1-Mäusen mit einem monoklonalen TCR, der spezifisch an ein Epitop von Ovalbumin bindet, wurden hierzu mit dem T-Zell spezifischen Onkogen NPM-ALK transduziert. Die transduzierten Zellen wurden wieder in lymphopenische Rag-1-Empfängertiere transplantiert, welche nach entsprechender Latenzzeit Lymphome entwickelten. Durch die Zugabe von TCR polyklonalen T-Zellen konnte hingegen das Auswachsen präleukämischer Klone verhindern werden. Leider konnte in diesen Versuchen die klonale Dynamik der Lymphomagenese nicht untersucht werden, da die genetisch modifizierten Zellen nicht im Blut der Rezipienten zu detektieren waren und eine Biopsierung betroffener Organe als nicht sensitiv genug, sowie technisch schwer durchführbar angesehen wurde. Weitere Experimente werden nun benötigt, um Aufschluss über die Entstehung dieser Tumore zu geben.

# 5. Material und Methoden

## 5.1 Material

### 5.1.1 Antikörper

**Tabelle 1 Antikörper**

| Antikörper | Hersteller | Klonnummer | Klonalität | Anwendung |
|---|---|---|---|---|
| anti-CD3-APC | Biolegend | 145-2C11 | monoklonal | FACS |
| anti-CD4-APC-Cy7 | Biolegend | GK1.5 | monoklonal | FACS |
| anti-CD8-Vio blue | Miltenyi Biotec | 53-6.7 | monoklonal | FACS |
| anti-CD19 | eBioscience | eBio1D3 | monoklonal | FACS |
| anti-CD30-PE | eBioscience | mCD30.1 | monoklonal | FACS |
| anti-α/β-TCR-PE | ImmunoTools | H57-597 | monoklonal | FACS |
| anti-CD278-APC | Miltenyi Biotec | 7E.17G9 | monoklonal | FACS |
| anti-human NPM/ALK | BD Biosciences | ALK1 | monoklonal | FACS |
| FC-Blocking Reagent | Miltenyi Biotec | - | polyklonal | FACS |
| anti-CD3 | DAKO | - | polyklonal | Immunhistochemie |
| anti-CD4 | Sino Biological | - | polyklonal | Immunhistochemie |
| anti-CD8 | Bioss Antibodies | - | polyklonal | Immunhistochemie |
| anti-CD30 | LS Bio | - | polyklonal | Immunhistochemie |
| anti-CD79a | Acris | HM57 | monoklonal | Immunhistochemie |
| anti-CD246 (ALK) | DAKO | ALK1 | monoklonal | Immunhistochemie |
| Sek. Antikörper Schwein-anti-Kaninchen | DAKO | - | polyklonal | Immunhistochemie |
| Sek. Antikörper Ziege-anti-Kaninchen | Abcam | - | polyklonal | Immunhistochemie |
| Sek. Antikörper Pferd-anti-Maus | Vector Lab | - | polyklonal | Immunhistochemie |

### 5.1.2 Plasmide und Vektoren

**Tabelle 2 Plasmide und Vektoren**

| Plasmide | Beschreibung | Herkunft |
|---|---|---|
| M187 | Env Plasmid , GALV-basiert | Plasmid Factory, Bielefeld, Deutschland |
| M579 | GagPol Plasmid, aus MLV (murines Leukämievirus) | Plasmid Factory, Bielefeld, Deutschland |
| P52 | Transfervektor, NPM/ALK - Luciferase | Dr. Cornils, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf |
| P53 | Transfervektor, T-Sapphire - Luciferase | Dr. Cornils, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf |

### 5.1.3 Enzyme und Größenstandards

**Tabelle 3 Enzyme und Größenstandards**

| Enzym/Größenstandards | Hersteller |
|---|---|
| 100bp-Standard marker | New England Biolabs, Massachusetts, USA |
| 1kb-Standard marker | New England Biolabs, Massachusetts, USA |
| NEBBuffer 4 | New England Biolabs, Massachusetts, USA |
| CutSmart Buffer | New England Biolabs, Massachusetts, USA |
| BsrGI | New England Biolabs, Massachusetts, USA |
| EcoRI | New England Biolabs, Massachusetts, USA |
| Proteinase K, Ready-to-use | Dako, Hamburg, Deutschland |

### 5.1.4 Peptide und Zytokine

**Tabelle 4 Peptide und Zytokine**

| Peptid/Zytokin | Hersteller |
|---|---|
| Humanes Interleukin-2 (IL-2) (10000U/ml) | Novartis, Basel, Schweiz |
| OVA (Ovalbumin, 257 - 264), SIINFEKL | AnaSpec, Fremont, California, USA |
| RetroNectin | Takara/Clontech, Mountain View, California, USA |

### 5.1.5 Bakterien

Für die molekularbiologische Arbeiten diente der Escherichia coli (E.coli) - Stamm „One Shot Top 10“ von Invitrogen (Karlsruhe) als Wirtsstamm.

Genotyp: (**F**- F´{lacIq Tn10(TetR)} mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1araD139 D(ara- leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG).

### 5.1.6 Zelllinien und primäre Zellen

**Tabelle 5 Zelllinien und primäre Zellen**

| Bezeichnung | Beschreibung/Medium |
|---|---|
| 293T | Humane, embryonale Nierenepithelzelllinie. 293T- Zellen sind ein Derivat von 293- Zellen und enthalten das T- Antigen von SV40. Wurde als Verpackungszelllinie benutzt. Kultiviert in DMEM complete Medium. |
| SC1 | Murine Fibroblastenzellinie. Wurde für die Titration retroviraler Überstände benutzt. Kultiviert in DMEM complete Medium. |
| Primäre T-Lymphozyten | Isoliert aus der Milz von OT-I Spendermäusen. Gehalten in RPMI 1640 mouse medium special. |

### 5.1.7 Mausmodelle

Alle Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (V54-19c 20/15 - F21/03).

**Tabelle 6 Mausmodelle**

| Name/Referenz | Interner Name | Funktion | Produzent |
|---|---|---|---|
| B6.129S7-Rag-1tm1Mom/J | Rag-1 | Rag-1-Gen-Defizienz | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA |
| C57BL/6Tg (TcraTcrb) 1100Mjb/j | OT-1 | Transgener, monoklonaler T-Zellrezeptor | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA |

Etwa 6 - 8 Wochen alte OT-1 –Mäuse wurden als Spendertiere verwendet. Das Lymphozytenreservoir von OT-1-Mäusen besteht fast ausschließlich aus CD8-positiven Lymphozyten. Diese T-Lymphozyten besitzen einen monoklonalen TCR (T cell receptor, *deutsch:* T-Zellrezeptor), der spezifisch nur das Peptid OVA (SIINFEKL) bindet. Etwa 5 – 9 Wochen alte Rag-1-Mäuse wurden als Empfängertiere verwendet. Rag-1-Mäusen fehlt das Gen Rag-1, welches für die Aktivierung der V(D)J-Rekombination verantwortlich ist. Somit entwickeln diese Tiere keine reifen B- oder T-Lymphozyten. In Tabelle 7 sind die in dieser Studie verwendeten Versuchstiere aufgelistet. Kapitel 5.2 gibt einen Überblick über die Versuchsplanung.

**Tabelle 7 Versuchsmäuse**

| Bezeichnung | Anzahl Tiere | Geburts-datum | Anzahl transplantierter Zellen | Transduktions-effizienz | Transplantations-datum |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrollgruppe 1** | 4 | 06.01.2014 | $5x10^6$ | 22% | 14.03.2014 |
| **Kontrollgruppe 2** | 2 | 26.11.2014 | $5x10^6$ | 7% | 07.03.2014 |
| **Kontrollgruppe 3** | 5 | 26.02.2014 (1), 07.03.2014 (4), 24.02.2014 (3) | $9x10^6$ | 25% | 02.05.2014 |
| **Kontrollgruppe 4** | 2 | 26.02.2014 | $1,5x10^6$ | 95% | 17.04.2014 |
| **Onkogengruppe 1** | 2 | 06.01.2014 | $5x10^6$ | 0,5% | 14.03.2014 |
| **Onkogengruppe 2** | 9 | 19.04.2014 | $5x10^6$ | 9,5% | 29.05.2014 |

Die Tiere der Kontrollgruppe 4 wurden mit sortierten Zellen transplantiert. Das bedeutet, dass die transduzierten Zellen maschinell (Cell Sorter) aus der Lymphozytenpopulation aussortierten wurden und somit beinahe ausschließlich T-Sapphire-positive Zellen transplantiert wurden. Die Kontrollgruppe 4 schied nach etwa 7 Wochen aus dem Versuch aus, da sich die transduzierten Zellen nicht in den Empfängertieren ansiedelten. Es ist anzunehmen, dass die Zellen den Sortiervorgang nicht gut überstanden haben, dies ist ein häufig beobachtetes Problem.

Die Onkogengruppe 2 bestand ursprünglich aus 9 Tieren. Leider mussten acht Mäuse dieser Gruppe nach kurzer Zeit euthanasiert werden, da sie an einer schweren Infektion

der oberen Atemwege litten, welche den gesamten Mausstall der Tieranlage betraf und in keinem Zusammenhang mit dem Experiment stand, sodass lediglich eine Maus für den Versuch verblieb.

## 5.2 Versuchsplanung

Im ersten Teil dieser Arbeit ging es darum, das Repopulierungsverhalten genetisch-modifizierter, reifer T-Zellen sowie die Entstehung von T-Zell-Lymphomen in vivo mithilfe von in-vivo-Bildgebungsverfahren (Biolumineszenz), zu beobachten. Dazu mussten zunächst T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von OT-1-Spendertieren extrahiert werden. Die Tiere wurden zu diesem Zweck, gemäß dem Tierschutzgesetzt, betäubt und getötet (s. 5.3.4.4 Tötung und Sektion der Tiere). In weiteren Schritten, wurden die gammaretroviralen Viruspartikel entwickelt und mithilfe von retroviralem Gentransfer entweder der Kontroll- oder der Onkogenvektor in das Genom der T-Zellen eingebracht.

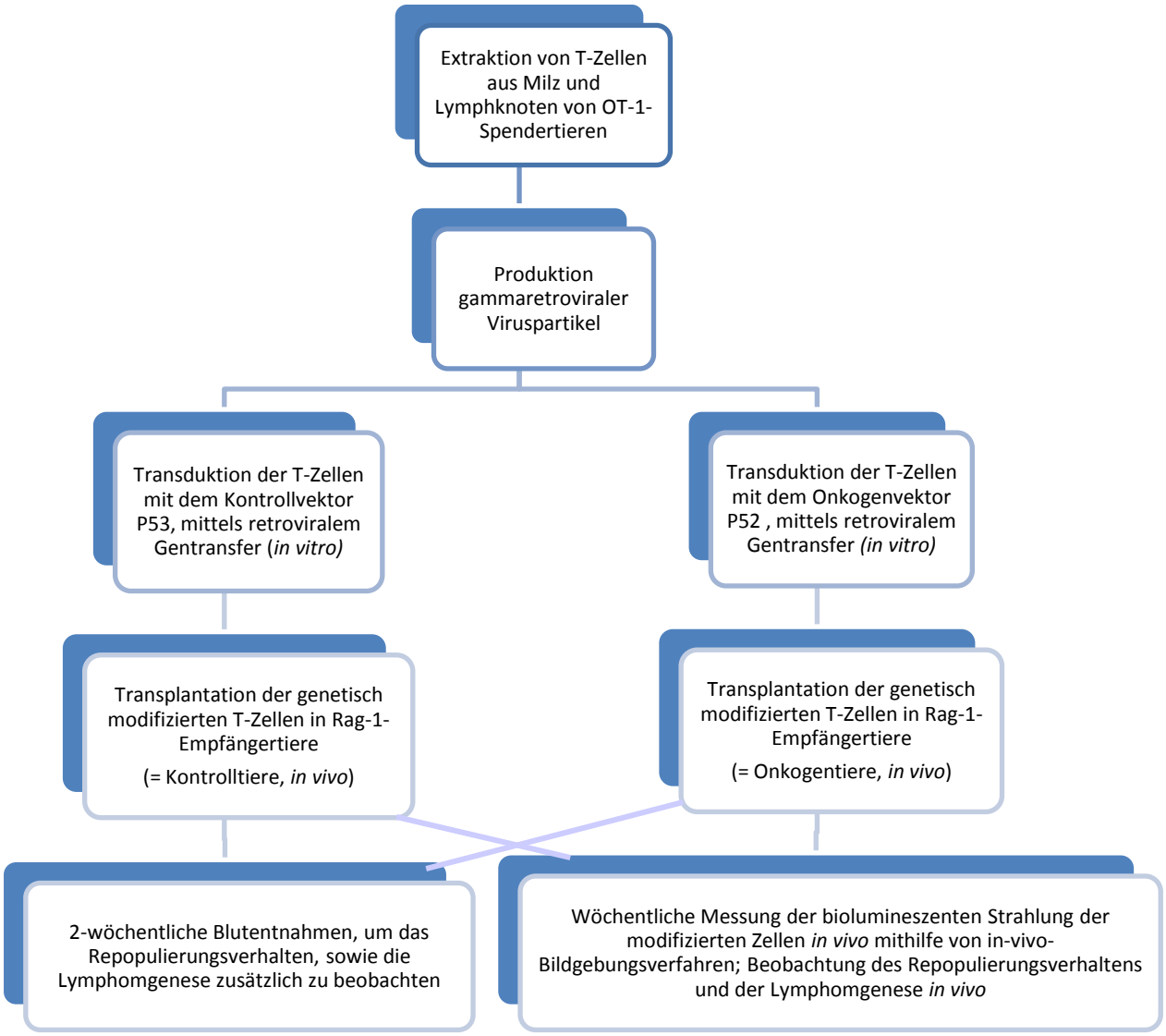



**Abb. 8 Vereinfachte Darstellung der Versuchsplanung (1)**

Anschließend wurden die Zellen in lymphopenische Rag-1-Empfängertiere transplantiert und schließlich im wöchentlichen Abstand auf ihre biolumineszente Strahlung hin untersucht. Alle zwei Wochen wurde das Blut der Tiere zusätzlich auf bestimmte Marker untersucht, um die Repopulierung und Lymphom-Entstehung beobachten zu können.

Im Zweiten Teil dieser Arbeit ging es darum, die zuvor generierten T-Zell-Lymphome aus dem Mausmodell histologisch und immunhistologisch mit dem humanen ALK-positiven ALCL zu vergleichen. Des Weiteren sollten T-Zell-Lymphome von Hunden und Katzen histologisch und immunhistologisch mit dem humanen ALK-positiven ALCL verglichen werden.

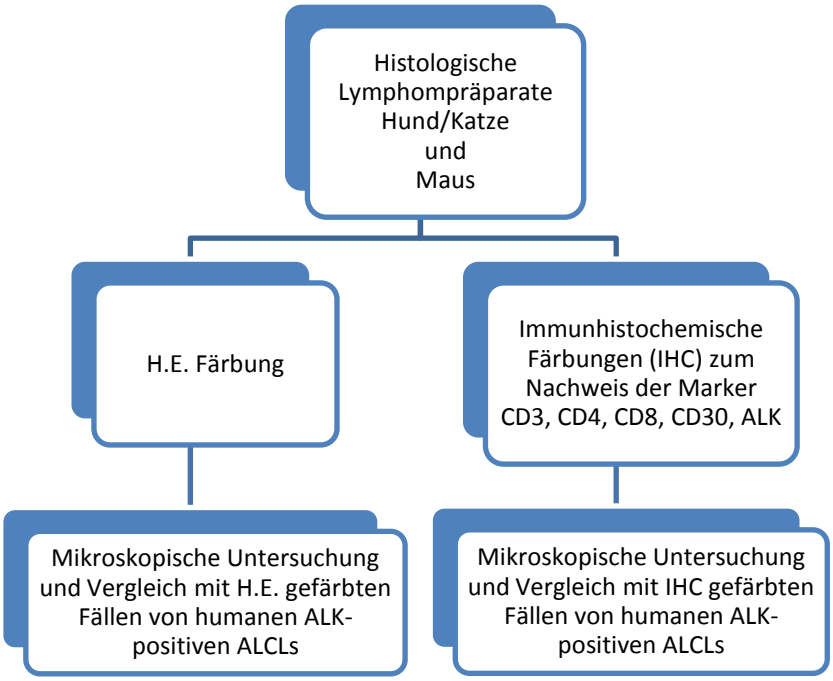



**Abb. 9 Vereinfachte Darstellung der Versuchsplanung (2)**

## 5.3 Methoden

### 5.3.1 Molekularbiologische Techniken

#### 5.3.1.1 Verwendete gammaretrovirale Vektoren

Für die Transduktion der OT-1-Spenderlymphozyten wurden von Frau Dr. Cornils in der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf gammaretrovirale Vektoren kloniert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die bicistronischen Vektoren kodierten für das Markergen Luciferase, in Kombination mit dem Onkogen NPM-ALK bzw. dem Kontrollgen T-Sapphire und waren folgendermaßen aufgebaut (Abb. 10): LTR (long terminal repeat) sind DNS-Wiederholungseinheiten, die Genabschnitte flankieren und eine wichtige Rolle bei der reversen Transkription, der Integration ins Wirtsgenom, sowie der Initiation der Transkription spielen. Sie bieten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die virale IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle) vermittelt die Bindung der mRNS (*messenger RNA*, deut. Boten-RNS) an die Ribosomen cap-unabhängig, somit kann die Produktion von Proteinen unabhängig der 5'-Cap-Struktur ermöglicht werden, welche eukaryotische mRNS typischerweise benötigen, um an Ribosomen binden zu können. Das wPRE-Element (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) wird in der Molekularbiologie häufig verwendet, um die Expression von Transgenen durch eine effizientere Transduktion und Translation zu verbessern. Dabei wird die RNS Prozessierung verbessert und somit die RNS Stabilität erhöht.

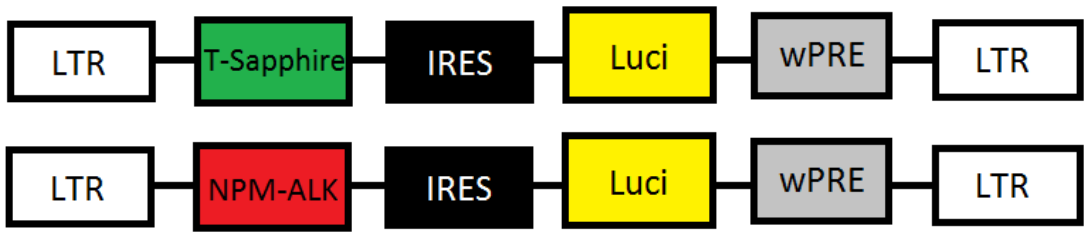



**Abb. 10 Verwendete gammaretrovirale Vektoren**
Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten gammaretroviralen Vektoren, bestehend aus LTRs, Kontroll- bzw. Onkogen, IRES, Luciferase und wPRE.

#### 5.3.1.2 Bakterientransformation

Unter der Transformation versteht man das Einbringen fremder DNS in Bakterienzellen. Hierzu wurden „superkompetente One Shot Top 10 Escherischia coli“ von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die E.coli Bakterien wurden ca. 3-5 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden vorsichtig etwa 5µl Plasmid-DNS zu den Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein „Hitzeschock“ im Wasserbad bei 42°C für 45 Sekunden. Beim Hitzeschock dehnt sich die Bakterienmembran plötzlich aus, sodass die Plasmid-DNS aufgenommen werden kann. Um dem Stress durch den raschen Temperaturwechsel entgegen zu wirken, wurden die Bakterien anschließend nochmal für 5 Minuten auf Eis gestellt. Nun wurden etwa 1,5 ml LB-Medium mit Ampicillin zu den Bakterien pipettiert und diese für 1 Stunde in den Schüttelinkubator bei 220 rpm und 37°C gestellt. Während dieser Zeit konnten sich die Bakterien und die darin enthaltene DNS vermehren. Auf vorgewärmten (37°C) LB-Ampicillin-Agarplatten wurden zwischen 5 – 20µl der Bakteriensuspension ausgestrichen und über Nacht im Inkubator bei 37°C gelagert. Die LB-Ampicillin-Agarplatten dienten auch als Selektionsmedium, da hier nur solche Bakterien wachsen konnten, welche transformiert wurden und somit das Ampicillinresistenzgen exprimierten. Die über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien konnten am nächsten Morgen einzeln „gepickt“ (das bedeutet, dass die Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig abgetragen wurden) und in LB-Ampicillin-Selektionsmedium überführt werden.

#### 5.3.1.3 Plasmidpräparationen

5.3.1.3.1 Analytische Plasmidpräparation (Minipräp)

Die analytische Plasmidpräparation dient der zügigen Freisetzung kleiner Mengen der Plasmid-DNS aus Bakterien und deren nachfolgender Analyse. Die positiven Klone werden anschließend für die präparative Plasmidpräparation verwendet. Über Nacht gewachsene Bakterienkolonien (s. 5.3.1.2 Transformation) wurden morgens einzeln „gepickt“ und in 2 ml LB-Selektionsmedium angeimpft. Im Schüttelinkubator, bei 220 rpm und 37°C erfolgte die Inkubation der Bakteriensuspension für mindestens 5 Stunden. Anschließend wurden je 2ml der Bakteriensuspension in Eppendorfgefäße überführt und bei 13000xg für 5 Minuten pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Die restlichen Kulturen wurden bei 4°C aufbewahrt um ein Nachzüchten zu ermöglichen. Die analytische Plasmidpräparation

wurde nach Anleitung des Kits „PureLink®Quick Plasmid Miniprep“ von Invitrogen (Tabl. 15) durchgeführt.

5.3.1.3.2 Präparative Plasmidpräparation (Maxiprep)

Die präparative Plasmidpräparation dient der qualitativen und quantitativen Gewinnung von Plasmid-DNS aus Bakterien. Hierbei wurden jeweils 200 ml Übernachtkultur nach Anleitung des „HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit“ von Invitrogen (Tabl. 15) oder des „Endofree Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen (Tabl. 15) bearbeitet. Die DNS-Konzentration wurde anschließend mithilfe des Nano-Drop ND 1000 Spectrometer von peqLab (Tabl. 13) gemessen.

#### 5.3.1.4 Restriktionsverdau

Um die Identität der präparierten Plasmid-DNS zu überprüfen, wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen an bestimmten DNS-Abschnitten geschnitten. Für jedes verwendete Restriktionsenzym musste ein vom Hersteller empfohlener Puffer verwendet werden, damit das Enzym optimal an den spezifischen Sequenzmotiven schneiden konnte. Der Ansatz aus 2,5 µl des benötigten Puffers, 1 µl des Enzymes und 1 µl der Plasmid-DNS wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit DNS-freiem, sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf ein Agarrosegel aufgetragen und die DNS-Fragmente über eine Gelelektrophorese bei 100 Volt für 30 Minuten, ihrer molekularen Größen nach, aufgetrennt.

### 5.3.2 Zellkulturarbeiten

#### 5.3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden alle an „Sterilbänken für Zellkulturen“ der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Alle Materialien, welche für das sterile Arbeiten gebraucht wurden, unterliefen der Sterilisierung durch Autoklavierung oder wurden mit Ethanol (70%) desinfiziert. Gleiches galt für Handschuhe und andere Verbrauchsmaterialen.

#### 5.3.2.2 Kultivierung von Säugetierzellen

Die kommerziellen Zelllinien und primären, isolierten Zellen, wie beispielsweise T-Zellen, wurden in begasten (5-7% $CO_2$) Brutschränken bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90% gehalten. Alle 3 Tage wurde den Zellen frisches Medium zugeführt. Adhärente Zellen (293T und SC1) wurden subkonfluent gehalten, d.h. sobald 70-80% des Flaschenbodens mit Zellen bedeckt waren, wurden die Zellen in mehrere Flaschen verteilt oder in eine größere Kulturflasche überführt.

#### 5.3.2.3 Passagierung adhärenter Zellen

Um die adhärenten Zellen (293T und SC1) vom Zellboden lösen zu können, muss der Passagierung eine Trypsinierung voraus gehen. Hierzu wird das alte Medium vollständig entfernt und die adhärenten Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Der Waschvorgang wird benötigt, um das Trypsin-blockierende FCS zu entfernen. Anschließend werden etwa 3 ml Trypsin-EDTA-Mix (Tabl. 11) zu den Zellen gegeben. Trypsin sorgte dafür, dass die Adhäsionsmoleküle der Zellen vom Boden der Flasche getrennt wurden. Das ebenfalls in der Mix-Lösung enthaltene EDTA, chelatierte Ca2+- und Mg2+-Ionen, diese Ionen werden für die Adhäsion benötigt, wodurch ein erneutes Anheften der Zellen verhindert wurde. Nach ca. 30 Sekunden Inkubationszeit konnten die Zellen leicht vom Boden gelöst und in frischem Medium, je nach Wachstumsrate 1:5 oder 1:10, verdünnt und/oder in neue Kulturflaschen überführt werden.

#### 5.3.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer improved Einmal-Zählkammer (Tabl. 14) bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 30 µl 0,05%iger Trypanblau-Lösung (Tabl. 11) vermischt. Trypanblau färbt lediglich tote Zellen an, sodass nur die nicht-blauen Zellen gezählt wurden (sog. „Lebendzählung“). Die Neubauer improved Zählkammer besteht aus 4 Großquadraten mit jeweils 16 Kleinquadraten. Alle Zellen in den insgesamt 64 Kleinquadraten wurden unter dem Mikroskop gezählt. Errechnet wurde die Zellzahl anschließend mit folgender Formel:

Zellen / 0,1 µl = gezählte Zellen ÷ 4 (Großquadrate) x Verdünnungstufe (mit Trypanblau)

Zellen / ml = (Zellen / 0,1 µl) x $10^4$

### 5.3.2.5 Isolierung und Stimulierung muriner Splenozyten

5.3.2.5.1 Isolierung muriner MNCs

Die murinen MNC (mononuclear cells) wurden aus OT-I Mäusen gewonnen. Dazu wurden die Mäuse euthanasiert (s. 5.3.4.3. Tötung und Sektion der Tiere) und anschließend die Milz und Lymphknoten entnommen und in ein 50 ml Tube mit 15 ml kalter PBS-Lösung überführt (Lagerung und Transport der Organe bis zur Werkbank des Labors verlief auf Eis). Die Milz wurde mithilfe des sterilen Stempels einer 5 ml Spritze durch einen Zellsieb (Tabl. 14) gedrückt und das Homogenisat zusammen mit PBS in ein neues 50 ml Tube übertragen. Das Sieb wurde mehrfach mit PBS ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm und 31°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer (Ansatz aus 100 µl Lyse-Puffer von BD und 900µl $H_20$) resuspendiert. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurden 10 ml PBS zugeführt und die Suspension erneut bei 1500 rpm und 31°C für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut verworfen und das Sediment mit 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

5.3.2.5.2 Stimulierung von primären, murinen T-Lymphozyten

Pro Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte (6-Lochmikrotiterplatte, Tabl. 14) wurden 7,5 x $10^6$ Zellen verwendet. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die gewonnene Zellsuspension erneut bei 1500 rpm und 31°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in der benötigten Menge Mouse Medium special aufgenommen. Zugefügt wurden pro Vertiefung noch 30 µl OVA (Tabl. 4) und 3µl IL-2. OVA stimuliert die T-Lymphozyten von OT-I Mäusen zu proliferieren, da diese durch ihre Monoklonalität spezifisch auf das OVA-Peptid reagieren. Ein Endvolumen von 3 ml (bestehend aus der errechneten Menge Zellen, dem OVA und dem IL-2, gelöst in Mouse Medium special) wurde in jede Vertiefung der 6-well-Zellkulturplatte pipettiert. Die Zellen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen (s. 5.3.2.2 Kultivierung von Säugetierzellen) kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 1:2 gesplittet und waren bereit für die Transduktion.

#### 5.3.2.6 Produktion ecotroper Viruspartikel

Um den Gentransfer an reifen T-Zellen durchführen zu können, wurden zunächst ecotrope Viruspartikel hergestellt. Der produzierte gammaretrovirale Vektor (Tabl. 2) codierte für Replikation (gagpol-Gen) und Verpackung (Eco-Env-Gen), enthielt das Transgen (hier T-Zell Onkogen oder Kontrollgen und Luciferase-Gen), das Verpackungssignal Ψ und die 5´, 3´ LTR, jedoch keine Information zur Generierung viraler Proteine (Abb. 10, S. 38). Somit waren die Vektoren auf einen Infektionszyklus beschränkt und replikationsinkompetent. Die Produktion der gammaretroviralen Partikel erfolgte mithilfe der humanen Nierenepithelzelllinie 293T, welche als Verpackungszelllinie dienten. Die Zellen (293T) wurden einer transienten Transfektion nach der Calciumphosphat-Präzipitations-Methode unterzogen. Die Zellen exprimierten die fremden Gene nach der Transfektion und verpackten sie in die Viruspartikel. Diese infektiösen Stadien wurden anschließend an das Kulturmedium abgegeben.

Für die Calciumphosphat-Präzipitations-Methode wurden etwa 24 Stunden vor der Transfektion 5-6x$10^6$ 293T-Zellen in Petrischalen (Ø 10cm) in einem Gesamtvolumen von 6 ml DMEM complete Medium (Tabl. 12) ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die DNS/CaCl2-Lösung in ein 15 ml Tube in folgender Reihenfolge pipettiert:

**Tabelle 8 Calciumphosphat-Präzipitations-Methode**

| Komponente | Menge |
|---|---|
| Transfervektor: Kontroll-/Onkogen (P52, P53) | 7,5µg |
| gagpol Hilfsplasmid (M579) | 12,5µg |
| Ecoenv Hilfsplasmid (M187) | 1µg |
| $H_2O$ ad | 450µl |
| 2,5 M CaCl2 | 50µl |

Der DNS/$CaCl_2$-Mix wurde nun tröpfchenweise zu 500µl 2xHepes Puffer zugegeben. Um eine vollständige Durchmischung zu gewährleisten, wurden mithilfe einer sterilen Pasteurpipette Luftblasen erzeugt. Um eine optimale Präzipitation der DNS in den Calciumphosphatkristallen zu sichern, wurde die Mischung 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das DNS-Präzipitat tröpfchenweise und unter leichtem Schwenken der Petrischale auf die 293T-Zellen gegeben. Nach 6-8 Stunden

Inkubation unter normalen Zellkulturbedingungen (s. 5.3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen), wurde das chloroquinhaltige Medium gegen 6 ml DMEM complete Medium ersetzt. Dieser Schritt wurde alle 12 Stunden wiederholt. Nach 36 Stunden und nach 48 Stunden wurden die Überstände steril filtriert, um die Viruspartikel von abgelösten Zellen zu trennen und bei +4°C für ca. 2 Wochen aufbewahrt.

#### 5.3.2.7 Bestimmung der Transduktionseffizienz

Um die Transduktionseffizienz der produzierten ecotropen Viruspartikel zu bestimmen, wurden einen Tag vor der Titration $5 \times 10^4$ adhärente, murine SC-1 Zellen (Tabl. 5) in 1ml DMEM- Standardmedium pro Vertiefung einer 24- Loch- Mikrotiterplatte ausplattiert. Am nächsten Tag wurde der Virusüberstand in verschiedenen Verdünnungsstufen auf die Zellen pipettiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium der adhärenten Zellen entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Trypsinierung. Die abgelösten Zellen wurden in 1 ml DMEM complete Medium aufgenommen und im FACS (fluorescence-activated cell sorting, *deutsch:* Durchflusszytometrie) gemessen (s. 5.3.3 Durchflusszytometrie). Im Falle des Kontrollvektors, erfolgte der Nachweis direkt über die T-Sapphire-Expression. Bei den beiden Onkogenvektoren erfolgte der Nachweis der Transduktion mittels einer intrazellulären Färbung. Hierzu wurde das Protokoll von „Fix & Perm“ von Biozol (Eching, Deutschland) befolgt, um die Zellwand für den jeweiligen Antikörper permeabel zu machen. Anschließend wurden 2 µl des PE-konjugierten ALK-Antikörpers (Tabl. 1) zu den Zellen pipettiert und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml PBS gewaschen und im FACS gemessen.

#### 5.3.2.8 Aufkonzentrierung der Viruspartikel

Um die Transduktionseffizienz auf primären T-Zellen zu verbessern, wurden je 50 ml Virusüberstand in 50 ml Tubes pipettiert und genau abgewogen. Anschließend wurden die Tubes in eine Ultrazentrifuge (Beckmann, Tabl. 13) überführt und 16 Stunden bei 10000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1,5µl DMEM complete Medium resuspendiert. Der so aufkonzentrierte Virusüberstand wurde auf die mit Retronektin beschichteten Platten gegeben.

#### 5.3.2.9 Transduktion mit Retronektin

Retronektin ist ein rekombinantes humanes Fibronectinfragment und besitzt drei funktionelle Bindungsstellen; die C-Bindungsstelle (C-domain), die H-Bindungsstelle (Heparin-binding domain) und die CS-1 Sequenz. Die Zellen binden in der Regel über transmembrane Integrinrezeptoren VLA-5 und VLA-4 an die C-Bindungsstelle, während Viruspartikel mit der H-Bindungsstelle interagieren. Retronektin verbessert die Transduktionseffizienz dadurch, dass es Viruspartikel und zu transduzierende Zelle näher zusammen bringt und so die Wahrscheinlichkeit der Infektion erhöht. Für die Transduktion von murinen T-Zellen wurden unbeschichtete 6-Loch-Zellkulturplatten (*non-tissue-culture*; Tabl. 14) verwendet. In jede Vertiefung wurde 1 ml Retronektin pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Retronektin abgenommen und im Kühlschrank aufbewahrt, da es bis zu vier Mal verwendet werden konnte. Anschließend wurden die Platten mit 3ml 2% BSA in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Es folgten ein Waschschritt mit 3ml HBSS und ein weiterer mit 3ml PBS. Nun wurden 2 – 3 ml Virusüberstand in jede Vertiefung pipettiert und die Platten über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Platten bei 2300 rpm und 31°C für 90 Minuten zentrifugiert. Der Virusüberstand wurde von den Platten entfernt und die gesamten kultivierten T-Zellen auf die mit Retronektin-beschichteten Platten überführt. Die Platten wurden bei 2100 rpm und 31°C für 30 Minuten zentrifugiert und anschließend unter normalen Zellkulturbedingungen (s. 5.3.2.2 Kultivierung von Säugetierzellen) gelagert. Die Transduktion der T-Zellen wurde am nächsten Tag mit einer neu beschichteten Platte wiederholt. 24 Stunden später wurden die Zellen in die Empfängertiere transplantiert. Vor der Transplantation erfolgte eine FACS-Analyse der transduzierten T-Zellen um die die Transduktionseffizienz zu ermitteln, also zu ermitteln, wie viel Prozent der T-Zellen erfolgreich transduziert wurden (s. 5.3.3. Durchflusszytometrie).

### 5.3.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

In der Durchflusszytometrie wird ein Flüssigkeitsstrom erzeugt, in welchem die Zellen hintereinander angeordnet, mittels eines Laserstrahls, untersucht werden. Es werden gleichzeitig die Zellgröße (forward scatter, FSC) und die Granularität (sideward scatter,

SSC) der Zellen, aufgrund ihrer Streulichteigenschaften, bestimmt. Exprimieren die Zellen fluoreszierende Proteine (z.B. GFP) oder wurden sie mit einem Fluorochrom angefärbt (z.B. ein Fluorochrom-gekoppelter Primärantikörper), können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Zellen lassen sich so unterscheiden.

#### 5.3.3.1 Färbung von Einzelzellsuspensionen

Im FACS wurden transduzierte Zellen oder Einzelzellsuspensionen aus isolierten Organen und Tumoren analysiert (s. 5.3.4.5 Aufarbeitung der Organe für FACS). Für die Färbung wurden 1 x $10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm bei 21°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Färbung erfolgte im Restvolumen. Von jedem Antikörper wurde unverdünnt 1µl zu den Zellen pipettiert und der Ansatz für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten 2 Waschschritte mit PBS. Für die FACS-Messung wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Für die intrazelluläre Färbung von NPM-ALK wurde das „Fix & Perm Cell Permeabilization Kit" (Biozol) verwendet (s. 5.3.2.7 Bestimmung der Transduktionseffizienz).

#### 5.3.3.2 Färbung von Leukozyten aus dem Blut

Um die Leukozyten aus dem entnommenen Blut der Mäuse analysieren zu können, mussten zunächst die Erythrozyten lysiert werden. Dazu wurden jeweils 20µl Blut mit 500µl Lyse-Puffer (Ansatz aus 100µl Lyse-Puffer von BD und 900µl $H_20$) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und bei 1100 rpm und 21°C für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Färbung erfolgte im Restvolumen. 1µl des jeweiligen unverdünnten Antikörpers wurde zu den Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit PBS. Für die FACS-Messung wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer aufgenommen. Für die intrazelluläre Färbung von NPM/ALK wurde das „Fix & Perm Cell Permeabilization Kit" (Biozol; Tabl. 15) verwendet.

## 5.3.4 Tierexperimentelle Methoden

### 5.3.4.1 Tierhaltungsbedingungen

Die Mäuse wurden entsprechend den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) in der Tierhaltungsanlage des Georg-Speyer-Hauses, auf dem Gelände des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, in individuell ventilierten Käfigen (individually ventilated cage; IVC, Firma Tecniplast) gehalten. Die Käfige arbeiteten mit Überdrucksystemen, um die Tiere vor Keimen aus der Umgebungsluft zu schützen. Um die Keimbelastung weiterhin zu reduzieren, wurde der Raum nur mit Schutzkleidung (Kittel, Gesichtsmaske, Handschuhe, Überschuhe) betreten. Die Raumtemperatur betrug konstant 22°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% bis 60%. Der Lichtrhythmus folgte einem wechselnden Hell-Dunkel-Intervall von 12 Stunden. Die Lichtmenge betrug 300 Lux. Die Tiere wurden mit einer Standarddiät der Firma ssniff (Soest) und Leitungswasser versorgt. Der Gesundheitszustand wurde adspektorisch täglich durch den Experimentator, das Tierpflegepersonal, sowie durch veterinärmedizinische Kontrollen überwacht.

### 5.3.4.2 Transplantation

Die transduzierten T-Zellen wurden aus dem Labor auf Eis zur Tierhaltungsanlage transportiert. Dort wurden den Empfängertieren zwischen $1{,}5x10^6$ bis $9x10^6$ Zellen (s. Tabl. 7) mithilfe einer Insulinspritze intravenös in die Vena caudalis mediana (Schwanzvene) transplantiert. Fixiert wurden die Tiere dazu mit einer selbstgebauten und für diesen Zweck genehmigten Mausefalle, bei welcher lediglich der Schwanz des Tieres herausragt.

### 5.3.4.3 Blutentnahme

Alle 14 Tage wurde den Mäusen Blut abgenommen, um den Status der transplantierten T-Zellen zu bestimmen. Dazu wurden die Tiere in eine Falle gelockt und so fixiert, dass lediglich der Schwanz aus der Falle heraus ragte. Dieser wurde mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um die Gefäße zu dilatieren. Mit einem 11er Skalpell erfolgte eine vorsichtige Inzision der Schwanzvene. Die ausgetretenen Bluttropfen wurden mit einer EDTA-beschichteten Microvette aufgefangen und so etwa 50µl Blut entnommen. Die

Einschnittstelle wurde anschließend mit einem Tupfer etwa 30 Sekunden lang abgedrückt, bis die Blutung nachließ.

#### 5.3.4.4 Tötung und Sektion der Tiere

Spendertiere und erkrankte Tiere wurden gemäß dem genehmigten Tierversuchsantrags mit Isofluran narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Die toten Tiere wurden in Rückenlage fixiert und mit 70% Alkohol desinfiziert. Die Haut wurde mit einer Präparationsschere (Tabl. 16) entlang der Linea alba, von caudal nach cranial bis zum Hals durchtrennt und die Unterhaut stumpf abpräpariert. Die superficialen inguinalen, axialen und cervicalen Lymphknoten konnten freipräpariert und ggf. entnommen werden. Anschließend wurden Brustkorb und Bauchhöhle mit der Präparationsschere vorsichtig eröffnet und genau inspiziert. Im Falle der Spendertiere wurde nun die Milz entnommen und in eiskaltem PBS, bis zur weiteren Verarbeitung, gelagert. Bei erkrankten Tieren erfolgte eine genaue Inspektion aller Organe und zugehöriger Lymphknoten. Alle sichtbaren Veränderungen wurden dokumentiert und folgende Organe zur weiteren Untersuchung entnommen: Milz, Lymphknoten, Thymus (wenn vorhanden), Nieren, Leber, Herz, Lunge und Knochenmark (Femur und Tibia), sowie die entsprechenden Tumore (Lymphome). Ein Teil der Organe wurde für die Histologie abgetrennt und in 4 % gepuffertes Formalin überführt. Der Rest wurde ebenfalls in PBS überführt und bis zur weiteren Präparation oder Einfrierung auf Eis gelagert.

#### 5.3.4.5 Aufarbeitung der Organe für FACS

Nach der Entnahme der lymphatischen Organe, wurden diese in PBS auf Eis gelagert. Um aus allen Organen Einzelzellsuspensionen herzustellen, wurden die Organe jeweils in einer Petrischale mithilfe des sterilen Stempels einer 5 ml Spritze durch einen Zellsieb mit 100 µm Durchmesser (BD) gedrückt und das Homogenisat zusammen mit PBS in einen 50 ml Tube übertragen. Das Sieb wurde mehrfach mit PBS ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm und 31°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer (Ansatz aus 100 µl Lyse-Puffer von BD und 900µl $H_20$) resuspendiert. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurden 10 ml PBS zugeführt und die Suspension erneut bei 1500 rpm und 31°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und anschließend gezählt. Ca. 1 x $10^6$ Zellen wurden für die FACS-Analyse aufbewahrt, die restlichen Zellen wurden in Einfriermedium (10% DMSO in FCS) aufgenommen und bei -80°C tiefgefroren.

### 5.3.5 Histologie und Immunhistochemie

#### 5.3.5.1 Aufarbeitung für die Histologie

Für die histologische Beurteilung, wurden die Organe 24 Stunden in 4% gepuffertem Formalin fixiert. Anschließend wurden die Organe in Histosetten (Einbettkasetten, Sanowa) überführt und nochmals in 4% gepuffertem Formalin fixiert. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und abschließend in Xylol und flüssigem Paraffin getränkt. Es folgte die Einbettung mit flüssigem Paraffin (60°C) zu schneidbaren Blöcken. Sobald das Paraffin ausgehärtet war, wurden die Blöcke mithilfe eines Mikrotoms zu etwa 2-5µm dicken Gewebescheiben geschnitten, welche dann auf die Glasobjektträger (Tabl. 14) aufgezogen wurden. Es folgte eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

1. Die Präparate wurden mit Hämalatoxylin nach Mayer (Kernfärbung; Tabl. 11) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2. Anschließend wurden sie unter fließendem Leitungswasser gewaschen, bis zum Sichtbarwerden einer Blautönung (Bläuen).

3. Es folgte eine Färbung mit 2%igem Eosin für 2-5 Minuten (Tabl. 11).

4. Anschließend wurden die Präparate kurz unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

5. Es folgte der Abschluss der Differenzierung und somit die beginnende Entwässerung in Stufen mit 70%igen Alkohol, 96%igen Alkohol und 100%igen Alkohol.

6. Die Schnitte wurden anschließend in Xylol gespült um den Alkohol zu entziehen. Erst dann konnten die Schnitte mit Eukitt (Tabl. 11) eingedeckt werden.

#### 5.3.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Um das Gewebe wieder zugänglich für Antikörper zu machen, wurden die paraffineingebetteten Schnitte zunächst wieder entparaffiniert und rehydriert (Xylol und absteigende Alkoholreihe). Es folgte die Vorbehandlung des Gewebes in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten, bei unterschiedlichen Temperaturen (Demaskierung). Anschließend erfolgten je nach Antikörper und Gewebe, Blockierungs- und Waschschritte um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Schließlich wurde der Primärantikörper inkubiert und anschließend wieder abgewaschen. Gegebenenfalls wurde ein Sekundärantikörper aufgebracht und ebenfalls inkubiert. Nach erneuten Waschvorgängen erfolgte die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Komplexe mithilfe des entsprechenden Detektionssystems und eines Chromogens. In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Färbeprotokolle aufgelistet. Es folgt beispielhaft ein ausführliches Protokoll zur IHC-Färbung des Oberflächenmarkers CD8 für Maus und Hund:

1. Entparaffinierung und Rehydrierung: die Glasobjektträger mit den histologischen Schnitten wurden in Objektträgerhalter eingestellt und durch folgende Reagenzien geführt:

Xylol 3 x 3 Minuten
100% Ethanol 3 x 3 Minuten
96% Ethanol 2 x 3 Minuten
70% Ethanol 2 x 3 Minuten
Aqua dest 2 x 3 Minuten

2. Waschschritt: es folgten zwei Waschschritte mit TBS-Puffer (Tris-buffered salin, auf 1x verdünnt; Tabl. 12). Dazu wurde der Objektträger nacheinander für 3 Minuten in eine Küvette mit TBS gelegt.

3. Demaskierung: es folgte eine Behandlung mit Proteinase K. Es wurden ca. 100 µl Proteinase K (Tabl. 3) auf den Objektträger pipettiert und für 8 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Dies diente dem Abbau von Proteinvernetzungen und der Freisetzung von Antikörperbindungsstellen.

4. Waschschritt: es folgten zwei weitere Waschschritte mit TBS-Puffer (Tris-buffered salin; Tabl. 12). Dazu wurde der Objektträger nacheinander für 3 Minuten in eine Küvette mit TBS gelegt.

5. Blockierung: anschließend wurde das Gewebe mit Peroxidase (unverdünnt; Tabl. 11) für 5 Minuten bei Raumtemperatur blockiert, um endogene Enzymaktivität, und somit unspezifische Färbungen, zu verhindern.

6. Waschschritt: es folgten zwei weitere Waschschritte mit TBS-Puffer; in jeder Küvette verweilten die Schnitte für 5 Minuten.

7. Blockierung: etwa 100 µl Schweineserum (Tabl. 12) wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf das Präparat pipettiert, um unspezifische Bindungen durch den Sekundärantikörper zu vermeiden. Das Schweineserum wurde nach der Inkubationszeit vorsichtig abgekippt.

8. Primärantikörper: der polyklonale Kaninchen-anti-CD8-Antikörper (Tabl. 1) wurde in 1% BSA/TBS gelöst, mit einer Konzentration von 1:100 und auf den Objektträger pipettiert, so dass das Präparat vollständig bedeckt war. Der Ansatz blieb über Nacht für etwa 24 Stunden bei 4°C stehen.

9. Waschschritt: am nächsten Morgen folgten drei weitere Waschschritte mit TBS-Puffer (Tabl. 12).

10. Sekundärantikörper: der polyklonale, biotinylierte Sekundärantikörper Schwein-anti-Kaninchen (Tabl. 1) wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 1% BSA/TBS (Tabl. 12) gelöst und mit einer Konzentration von 1:100 auf den Objektträger pipettiert, so dass das Präparat vollständig bedeckt war.

11. Waschschritt: es folgte ein Waschschritt mit TBS-Puffer.

12. Detektion, ABC-Kit: es folgte ein Ansatz mit dem ABC-Kit gemäß der Herstellerangaben (Tabl. 15), welcher zunächst 30 Minuten inkubieren musste, bevor er auf das Präparat aufgetragen werden konnte und dann erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

13. Waschschritt: es folgte ein Waschschritt mit TBS-Puffer.

14. Detektion: es erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper (gekoppelt an Enzyme) mit dem Indikator DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Ansatz: 1 Tropfen DAB-Konzentrat auf 1 ml EnVision Flex Substrate Buffer; Tabl. 11 und Tabl. 12), dieses wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser abgewaschen.

15. Gegenfärbung : Die Präparate wurden nun für 15 Sekunden mit Hämatoxylin nach Gill No. 2 (Tabl. 11) gegen gefärbt und weiterhin für zwei Minuten gebläut.

Die Präparate wurden anschließend mit Aqua Tex (wässrig; Tabl. 11) eingedeckt.

**Tabelle 9 Immunhistochemische Färbeprotokolle (1)**

| **Primärantikörper** | | | | | | **Vorbehandlung** | | **Blockierung** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Antikörper** | **Bestellnr.** | **Reaktivität** | **Wirt** | **Antigenspezies** | **Verdünnung** | **Demaskierung** | **pH/ Dauer** | **ja/ nein** | **mit** |
| | | | | | | | | | |
| **anti-CD3** | A0452 | Mensch | Kaninchen | Maus/ Cynomolgus Makake | 1:100 | HIER | EDTA pH8 1'30 | nein | - |
| **anti-CD4** | 50134-M08H | Maus | Kaninchen | - | 1:100 | HIER | pH9 10' MW | ja | Schweine-serum/ HRP |
| **anti-CD8** | bs-0648R | Maus, Ratte | Kaninchen | - | 1:100 | PIER | 15' | ja | Schweine-Serum/ HRP |
| **anti-CD30** | LSC162069/55720 | Mensch | Kaninchen | Maus | 1:100 | HIER | pH9 10' MW | ja | Schweine-serum/ HRP |
| **anti-CD79a** | AM01322PUS | Mensch | Maus | Hund, Affe, Schwein, Pferd, Rind, Meerschwein-chen, Ratte, Maus, Kaninchen, Huhn, Dammwild, Rotwild, amerik. Bison | 1:100 | HIER | pH6 25min+ 15min RT | ja | Pferde-serum/ HRP |
| **anti-ALK** | | Mensch | Maus | - | 1:100 | HIER | pH8 30' | ja | HRP |

**HIER:** ***Heat Induced Epitope Retrieval*** **(deut. Hitze-induzierte epitope Demaskierung), PIER:** ***Protease Induced Epitope Retrieval*** **(deut. Protease-induzierte epitope Demaskierung),**

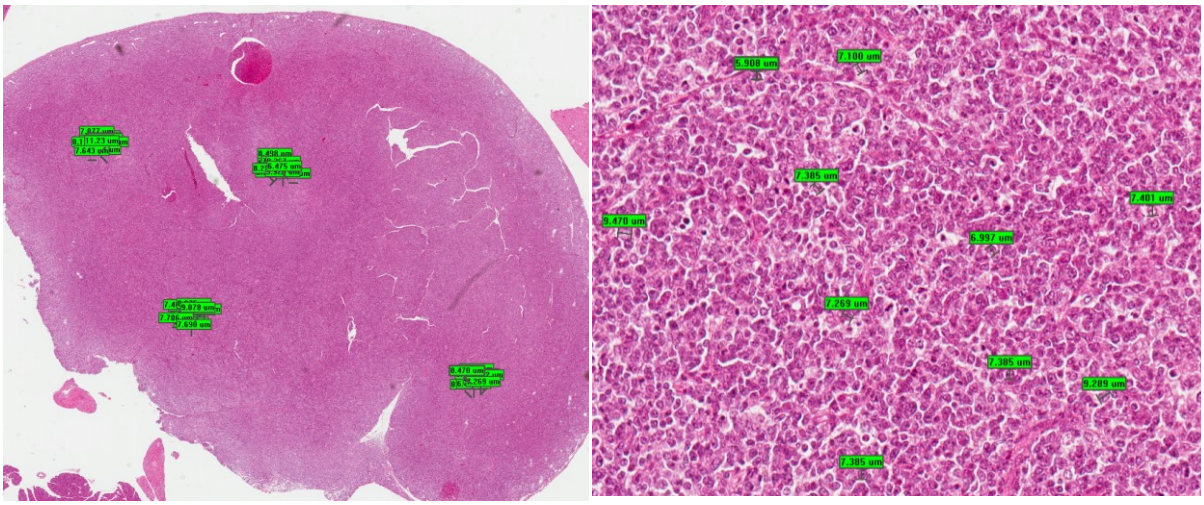
**HRP:** ***Horseradish peroxidase*** **(deut. Merrettichperoxidase)**

**Tabelle 9 Immunhistochemische Färbeprotokolle (2)**

| | Detektionssystem | | | | | | | Sekundärantikörper | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ABC | Flex | Histofine | | | | | | |
| | | | | | Mouse-Stain-Kit | | | | | | |
| **Anti-körper** | **indirekt/sek. Ab** | **indirekt/ prim. Ab** | **indirekt/ prim. Ab** | **indirekt/ prim. Ab** | **indirekt/ prim. Ab** | **Substrat** | **Antikörper** | **Bestellnr.** | **Reak-tivität** | **Wirt** | **markiert** |
| | markiert mit AP | markiert mit Biotin | markiert mit Biotin | markiert mit Polymer | markiert mit Polymer | | | | | | |
| **anti-CD3** | x | | | | | Fuchsin-rot | Ziege anti-Kaninchen IgG H&L (Alkaline Phospha-tase) | ab97048 | Kaninchen | Ziege | AP |
| **anti-CD4** | | | x | | | DAB | Polyklonal Schwein anti-Kaninchen biotinyliert | E0353 | Kaninchen | Schwein | |
| **anti-CD8** | | | x | | | DAB | Polyklonal Schwein anti-Kaninchen biotinyliert | E0353 | Kaninchen | Schwein | Biotin |
| **anti-CD30** | | | x | | | DAB | Polyklonal Schwein anti-Kaninchen biotinyliert | E0353 | Kaninchen | Schwein | Biotin |
| **anti-CD79a** | | | x | | | DAB | Pferd anti-Maus IgG (H+L) | BA2000 | Maus | Pferd | Biotin |
| **anti-ALK** | | | | | x | DAB | | | | | |

### 5.3.5.3 Bestimmung der Zellgröße

Um die Größe der Tumorzellen mikroskopisch zu bestimmen, wurden die histologischen Präparate zunächst eingescannt und dann digital mit dem Softwareprogramm „ImageJ“ (Wayne Rasband) bearbeitet. Hierzu wurden pro Tumor vier Gesichtsfelder zufällig ausgewählt und innerhalb dieser Gesichtsfelder je 10 Zellen bei 20-facher Vergrößerung an der breitesten Stelle ausgemessen (Abb. 11). Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert, sowie die Standardabweichung berechnet.




**A** **B**

**Abb. 11 Bestimmung der Zellgröße**
Pro Tumor wurden vier Gesichtsfelder ausgewählt (A). Jedes Gesichtsfeld wurde 20-fach vergrößert und anschließend je 10 Zellen an der breitesten Stelle ausgemessen (B).

## 5.3.6 In vivo Imaging

Die in vivo Bildgebung wurde mithilfe des IVIS Lumina II (Caliper Life Science) durchgeführt. Das IVIS Lumina II besteht aus einer auf -90°C thermoelektrisch gekühlten Grad 1 CCD-Kamera, sowie einer Messkammer (Abb. 12). Der CCD-Sensor ist rückseitig beleuchtet, was für eine äußerst hohe Quantenausbeute im kurzwelligen Lichtbereich sorgt. Die Auflösung beträgt 1024 x 1024 Pixel und die Größe des CCD-Sensors liegt bei 1,3 x 1,3 cm. Lichtwellen zwischen 400-900 nm können deutlich detektiert werden. Die Messkammer besteht aus einer beheizbaren und beweglichen Plattform, einem autofokussierenden Linsensystem, einem Filterrad und LED-Lichtern. Das Messprinzip beruht auf der katalytischen Wirkung von Luciferasen (Enzymen), welche zur exergonen

(= unter Freisetzung von Energie) Oxidation von Luciferin (eine Gruppe von polyzyklischen aromatischen Substanzen) mit molekularem Sauerstoff, führen. Dabei entstehen Dioxetane, die unter Abgabe von Kohlenstoffdioxid zerfallen und die gespeicherte Energie in Form von Licht freisetzen. Die CCD-Kamera des IVIS Lumina II ist in der Lage, dass an die Oberfläche treffende Licht zu erfassen und dessen Intensität und Ausbreitung zu messen.




**Abb. 12 IVIS Lumina II**
IVIS Lumina II (Caliper Life Science) mit Kamera und Messkammer.

Die Messung erfolgt nach entsprechender Expositionszeit von 1, 2 und 5 Minuten, dabei generiert das Gerät zunächst eine Schwarzweißaufnahme des Gegenstandes in der Kammer am Computer und nach Ende der Expositionszeit ein Bild der Biolumineszenz in Pseudofarben, welches darüber projiziert wird.

#### 5.3.6.1 Narkoseeinleitung und Vorbereitung der Mäuse

4-5 Wochen nach Transplantation wurden die Mäuse erstmals im IVIS Lumina II (Tabl. 13) gemessen. Für die Messung wurden je zwei Mäuse in die Narkosegas-Kammer XGI-8 (Caliper, Life Science) gesetzt, welche mit Isofluran (Tabl. 16) angeflutet wurde (Abb. 13 A). Um den Tieren die Narkoseeinleitung zu erleichtern, wurde die Kammer mit blickdichten OP-Tüchern abgedeckt. Nach etwa 2 Minuten war das Toleranzstadium erreicht. Die Tiere wurden aus der Kammer genommen und 150µl D-Luciferin (15mg/ml) intraperitoneal injiziert. Zum Schutz der Hornhaut vor Austrocknung, wurde Augensalbe (Bepanthen) aufgetragen. Anschließend wurde die gesamte ventrale Körperhälfte mit einer Akku-Tierschermaschine (Isis, B. Braun) enthaart.

A B

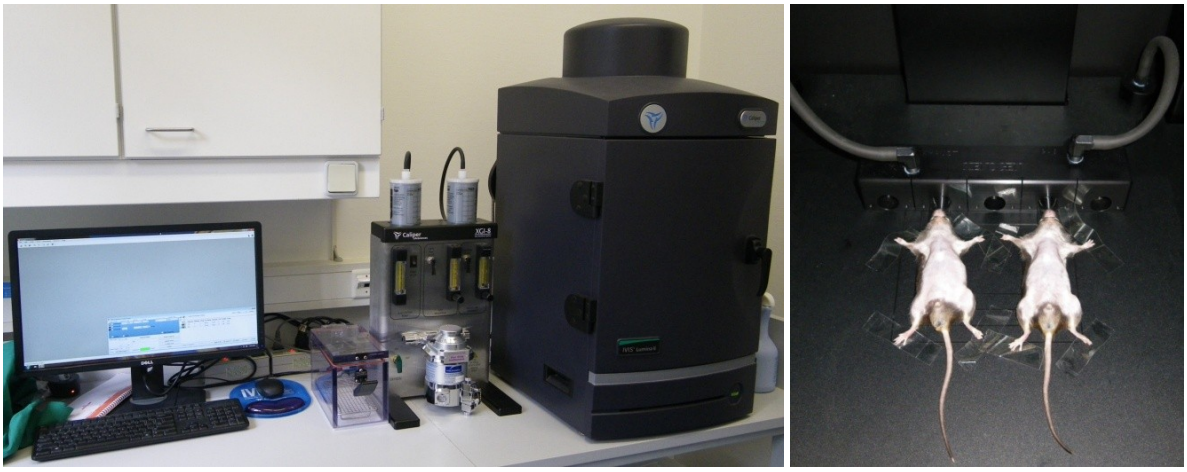


**Abb. 13 IVIS Lumina II**

(A) IVIS Lumina II mit Narkosegasanlage, Narkoseeinleitungskammer und Messkammer. (B) Die Mäuse wurden für die Messungen vorsichtig in Rückenlage mit Tesafilmstreifen fixiert. Über die Gasluken wurden sie weiterhin mit $O_2$/Isofluran-Gemisch versorgt.

Das narkotisierte Tier wurde nun in die Messkammer des IVIS Lumina II überführt. Um weiterhin die Isofluran/$O_2$-Versorgung zu sichern, wurde die Nase der Maus in eine Narkosegas-Luke geschoben und die Vorder- und Hintergliedmaße, in Rückenlage, mit Tesafilmstreifen vorsichtig auf der Unterlage fixiert (Abb. 13 B). Die Unterlage der Messkammer wurde konstant mit 37°C beheizt. Die Messungen erfolgten im wöchentlichen Abstand.

### 5.3.6.2 In vivo Imaging am IVIS Lumina II

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die erste Messung in Rückenlage (ventrodorsal, v/d) begonnen. Das injizierte Luciferin (Tabl. 16) wird vom Enzym Luciferase unter Abspaltung von Energie, umgesetzt. Diese Energie wird in Form von Licht freigesetzt, welches dann gemessen werden kann. Die Maßeinheit „Average Radiance“ (Avg. Radiance) beschriebt quantitativ die Strahlung, die von einer (oder durch eine) Oberfläche in einem räumlichen Winkel in eine bestimmte Richtung emittiert. Sie setzt sich zusammen aus Photonen (p) pro Sekunde (s) pro $cm^2$ ($cm^2$) pro Steradiant (sr). Die Biolumineszenzstrahlung wurde in Rückenlage (ventrodorsal) und in rechter Seitenlage (laterolateral) erfasst. Für die Auswertung wurde die Living Image Software 4.0 (Perkin Elmer) verwendet. Die ROI´s (Region of Interest) wurden sowohl in der ventrodorsalen, als auch in der laterolateralen Aufnahme zunächst auf den gesamten Körper der Maus gelegt und die Avg. Radiance in diesen Regionen erfasst (s. Abb. 20, Seite 67).

Anschließend, wurden acht ROI´s auf die ventrodorsale Aufnahme für die einzelnen Körperregionen (cervical, axial, abdominal, inguinal, popliteal) und drei ROI´s auf die laterolaterale Aufnahme (Abdomen, Milz- und linke Inguinalregion) gelegt, um auch hier die durchschnittliche Strahlung zu ermittel (s. Abb. 20, Seite 67). Nach den Messungen wurden die Tiere aus der Narkosegas-Luke entnommen und in Brust-Bauchlage in ihren Käfig zurück gelegt. Dort wurden sie mit Rotlichtlampen warm gehalten und bis zur vollständigen Erholung beobachtet.

# 6. Ergebnisse

Um die Repopulationsdynamiken, das biologische Verhalten, sowie die Entstehung von ALK-positiven Lymphomen und deren Auswirkung auf die T-Zell-Homöostase von reifen TCR-monoklonalen T-Zellen während einer Lymphopenie-induzierten Proliferation zu charakterisieren und in vivo darzustellen, wurde ein bereits etabliertes Mausmodell der Arbeitsgruppe Newrzela (Newrzela et al., 2008) weiterentwickelt und die biolumineszente Bildgebung verwendet. Hierzu wurden T-Zellen von OT-1 Spendertieren, welche einen transgenen TCR aufweisen nach Transduktion mittels retroviralem Gentransfer in lymphopenische Rag-1-defiziente Empfängertiere transplantiert. Für die Transduktion wurden entweder T-Sapphire, als Kontrollvektor oder NPM-ALK, als Onkogenvektor, verwendet. Die Analysen erfolgten am lebenden Tier mittels durchflusszytometrischer Analysen von Blut und Geweben, sowie biolumineszenter Bildgebung.

## 6.1 Analyse der Spenderzellen

Nach Euthanasie der OT-1-Mäuse wurden die TCR monoklonalen Spenderlymphozyten aus der Milz und den Lymphknoten gewonnen. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den Spendertieren um transgene OT-1-Mäuse handelt, wurden die Splenozyten und Lymphozyten der Tiere hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker untersucht. Erwartungsgemäß ergab die durchflusszytometrische Analyse der Zellen überwiegend CD3- (T-Zellmarker) und CD8- (Marker von zytotoxischen T-Zellen) positive und nur vereinzelt CD4- (T-Helferzellmarker) positive Lymphozyten. Da der transgene TCR der OT-1-Mäuse aus den Domänen Vα2 und Vβ5 besteht, wurden auch diese Oberflächenmarker mit Antikörpern gefärbt. Die Analyse der Splenozyten ergab ein doppelt-positives Ergebnis für beide transgenen Ketten des TCR (Abb. 14).

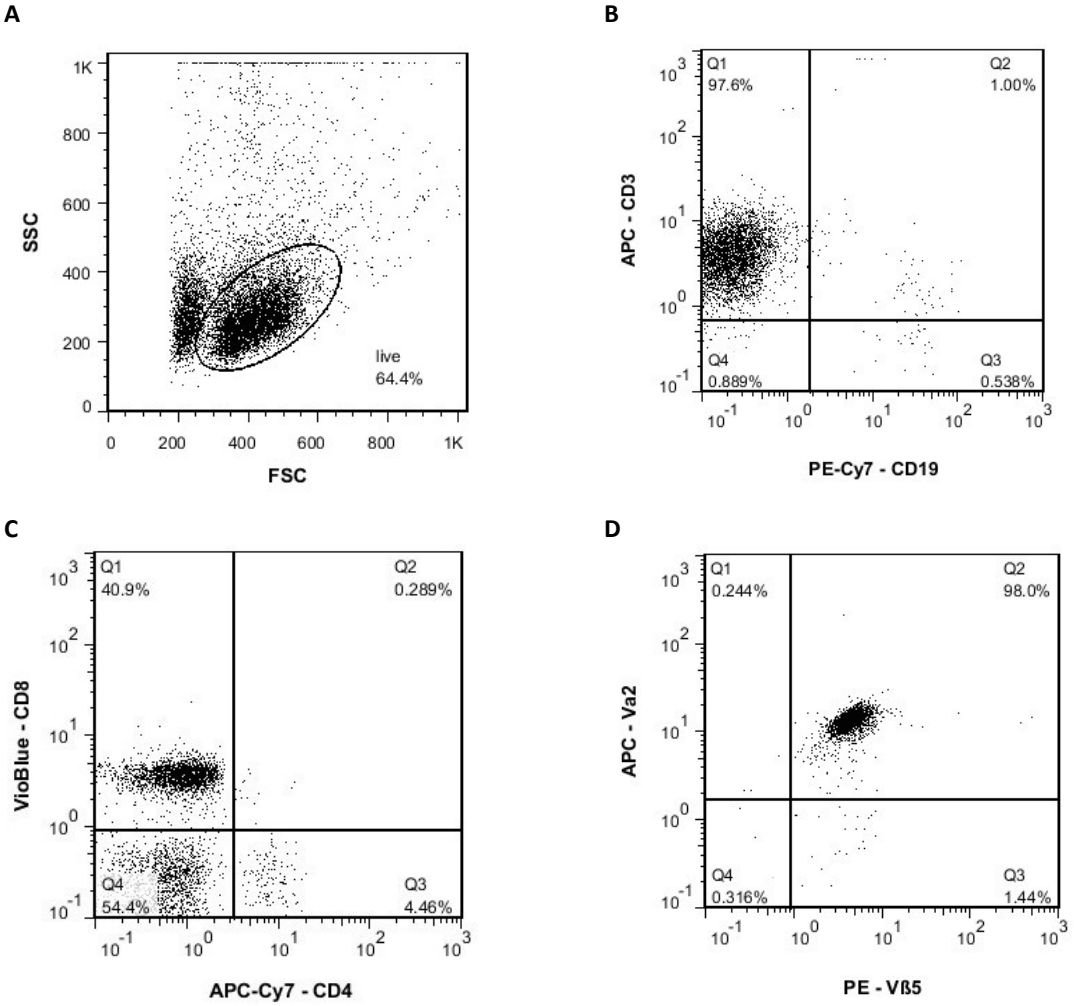



**Abb. 14 Durchflusszytometrische Analyse der OT-1 Spenderzellen**

Die Oberflächenmarker CD3, CD19, CD4, CD8, Va2 und Vß5 wurden auf den Splenozyten des OT-1-Spendertieres gefärbt. Entsprechend der Zellgröße und Granularität wurden zunächst die lebenden Zellen markiert (A). CD3-positive Zellen wurde im APC-Kanal, in Quadrant 1 sichtbar (B), CD19-positive Zellen hingegen im PE-Cy7-Kanal, in Quadrant 3 (B). CD8-positive Zellen konnten im VioBlue-Kanal, in Quadrant 1 dargestellt werden (C), sowie CD4-positive Zellen im APC-Cy7-Kanal in Quadrant 3 (C). Da der TCR der Spenderlymphozyten sowohl aus der Domäne Va2 (im APC-Kanal), als auch aus der Domäne Vß5 (im PE-Kanal) besteht, vielen beide Färbungen positiv aus und wurden in Quadrant 2 sichtbar (D).

## 6.2 Transgene, reife T-Zellen repopulieren eine lymphopenische Maus innerhalb weniger Wochen

Nach Stimulation der Spenderlymphozyten wurden die Zellen mithilfe von retroviralem Gentransfer transduziert. Hierzu wurde P53, der Kontrollvektor welcher T-Sapphire als Kontrollgen enthielt, bzw. P52, der Onkogenvektor, welcher NPM-ALK als Onkogen

enthielt, verwendet. Um den Transduktionserfolg zu ermitteln, wurde mithilfe der Durchflusszytometrie, die Effizienz bestimmt mit welcher die Spenderzellen transduziert wurden (Abb. 15). Nach erfolgreicher Transduktion wurden die Zellen intravenös in die lymphopenischen Rag-1-Empfängertiere transplantiert. Beginnend 4 Wochen nach intravenöser Transplantation der genetisch modifizierten, reifen T-Zellen, wurde den Mäusen in regelmäßigen Abständen von 2 Wochen, Blut aus der Schwanzvene abgenommen um deren Anreicherung, sowie die Populationsdynamiken der Zellen zu beobachten.

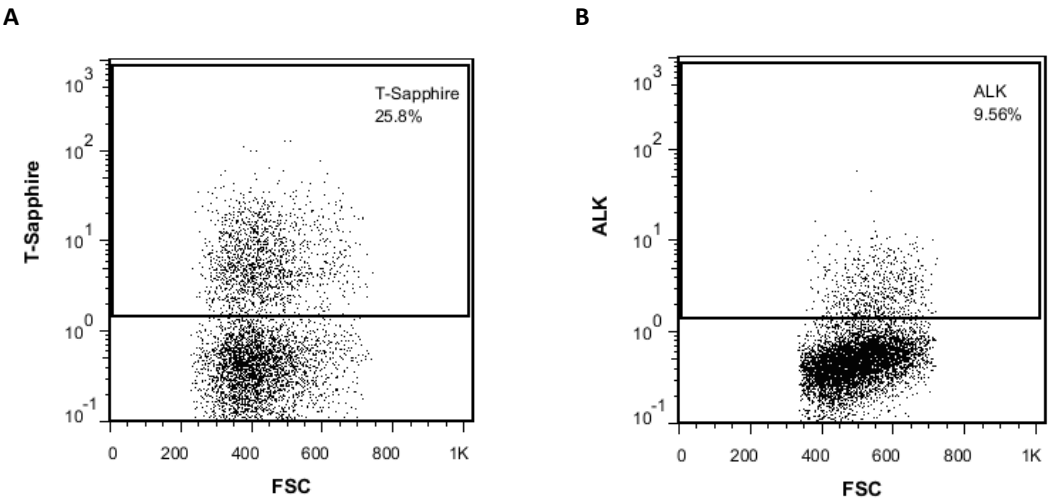



**Abb. 15 Analyse der transduzierten OT-1 Spenderzellen**

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde der Anteil transduzierter T-Zellen vor der Transplantation ermittelt. Für den Kontrollvektor wurde das T-Sapphire-Signal gemessen. In dieser beispielhaften Abbildung wurden 25,8% der Zellen transduziert (A). Für den Onkogenvektor wurden die Zellen intrazellulär auf humanes NPM-ALK gefärbt (B). In dieser beispielhaften Abbildung wurden 9,56% der Zellen transduziert.

Abhängig von den Transduktionseffizienzen der transduzierten Zellen und dem Vektor (Kontroll- oder Onkogenvektor), ergaben sich folgende Kontroll- und Onkogen-Gruppen mit folgenden Transduktionseffizienzen (s. 5.1.7 Mausmodelle, sowie 5.3.2.7 Bestimmung der Transduktionseffizienz, Tabl. 10):

**Tabelle 10: Versuchstiergruppen**

| Bezeichnung | Anzahl Tiere | Transduktionseffizienz |
|---|---|---|
| **Kontrollgruppe 1** | 4 | 22% |
| **Kontrollgruppe 2** | 2 | 7% |
| **Kontrollgruppe 3** | 5 | 25% |
| **Onkogengruppe 1** | 2 | 0,5% |
| **Onkogengruppe 2** | 9 (1) | 9,5% |

Die Analyse der Blutzellen von Kontrollgruppe 1 ergab, dass zu Beginn ein Anteil von 20% der Lymphozyten die Oberflächenmarker CD8 und CD3 trugen (Abb. 16 A). Der Anteil der transgenen T-Sapphire-positiven Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation betrug 1,5%. Trotz individueller Schwankungen lässt sich deutlich erkennen, dass die Anzahl der T-Zellen sich nach 7 Wochen bereits annähernd verdoppelt und um Woche 9 ein Maximum von etwa 50% erreicht hat. Um Woche 11 wurde ein leichter Abfall der T-Zellen um etwa 10% beobachtet und ab Woche 13 blieb die Verteilung bei 45% in etwa stabil. CD8-positive T-Zellen bildeten hierbei die Mehrzahl der Blutzellen, wohingegen CD4-positive Zellen mit maximal 6% nur eine untergeordnete Rolle spielten. Dieses Ergebnis war nicht anders zu erwarten, da die Lymphozyten der OT-1-Spendertiere fast ausschließlich aus monoklonalen CD8-positiven T-Zellen bestehen. Das T-Sapphire-Signal lag bei maximal 5%. Misst man das T-Sapphire-Signal ausschließlich in den CD3-positiven Zellen (T-Zellen; Abb. 16 B), finden sich maximal 18% positive Zellen. Das bedeutet, dass etwa 18% der T-Zellen mit T-Sapphire transduziert waren.

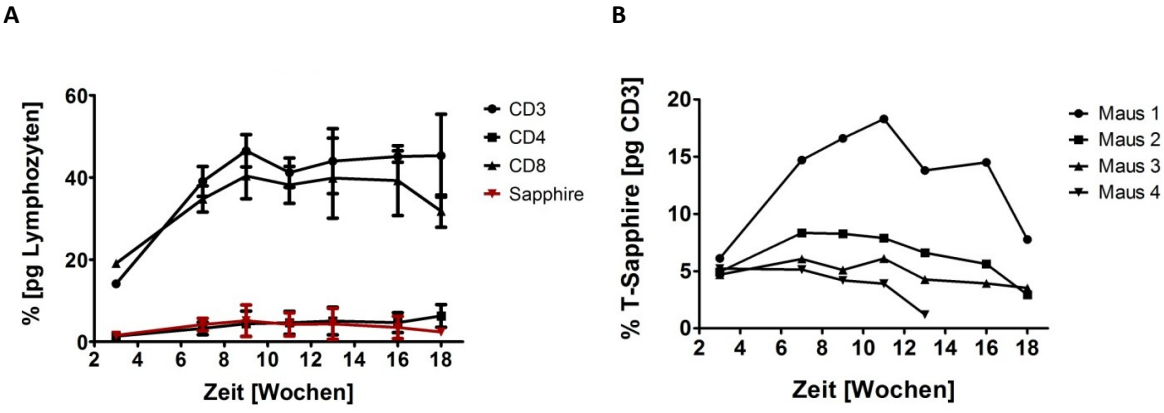



**Abb. 16 Blutanalyse der Kontrollgruppe 1**

(A) Mittelwerte der Blutanalysen der Kontrollgruppe 1 von Woche 3 – 18. (B) Anteile der T-Sapphire-positiven Zellen innerhalb der CD3-positiven Population.

Deutlich zu sehen waren die individuellen Schwankungen der einzelnen Tiere. Zwei von vier Tieren erreichten einen T-Sapphire-Maximalwert in Woche 11, ein Tier in Woche 3 und ein weiteres in Woche 7. Für alle Tiere galt, dass die Werte nach Erreichen des Maximums, stetig absanken. Die Blutanalysen der Kontrollgruppen 2 und 3 zeigten eine ähnlich erfolgreiche Repopulation der Lymphozyten in den lymphopenischen Empfängermäusen (Abb. 17 A-D). Auch hier waren stetig ansteigende Anteile von CD3- und CD8-positiven Blutzellen zu beobachten. In Kontrollgruppe 2, bestehend aus zwei Rag-1-defizienten Mäusen, entstand zwischen den Anteilen der CD3- und CD8-positiven Zellen in Woche 4 eine Differenz von etwa 20%.

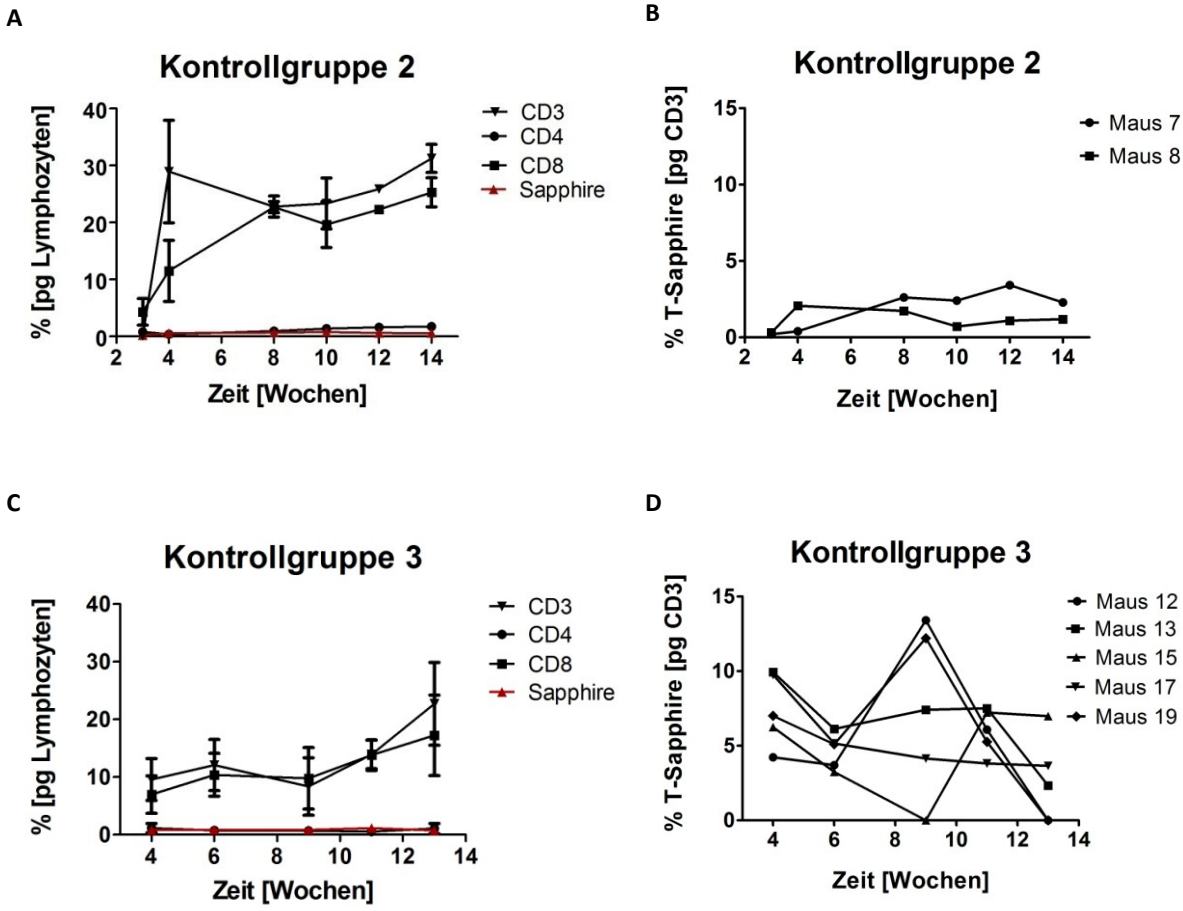



**Abb. 17 Blutanalyse der Kontrollgruppen 2 und 3**

(A) Mittelwerte der Blutanalysen der Kontrollgruppe 2. (B) Anteile der T-Sapphire-positiven Zellen innerhalb der CD3-positiven Population der Kontrollgruppe 2. (C) Mittelwerte der Blutanalysen der Kontrollgruppe 3. (D) Anteile der T-Sapphire-positiven Zellen innerhalb der CD3-positiven Population der Kontrollgruppe 3.

Die Blutanalysen der Kontrollgruppe 3, bestehend aus 5 Rag-1-defizienten Mäusen, ergaben ebenfalls steigende CD3- und CD8-Anteile von Woche 4 bis Woche 13. Jedoch lag

der Anteil von CD3-positiven Blutzellen maximal bei 22% (Woche 13) und somit niedriger als die Anteile CD3-positiver Blutzellen in den Kontrollgruppen 2 (zwischen 25% und 31%) und 1 (43%) in derselben Woche nach Transplantation. Im Durchschnitt erreichten die Kontrollgruppen 1-3 den größten Anteil CD3-positiver Blutzellen in Woche 9 mit 30%. Dabei lag der Anteil CD8-positiver Blutzellen bei durchschnittlich 25% der Blutzellen. In Woche 11 sank der Anteil CD3-positiver Blutzellen auf durchschnittlich etwa 19% ab (Abb. 18).

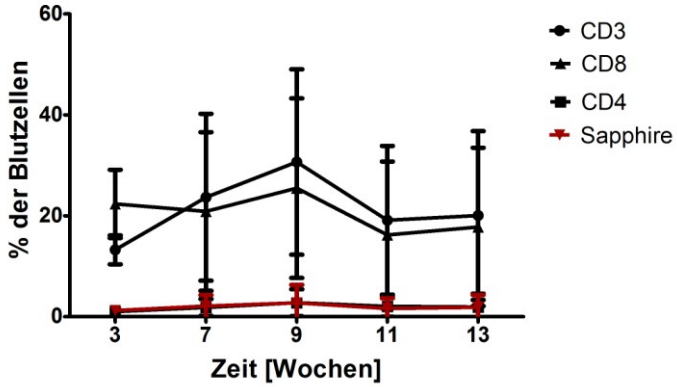



**Abb. 18 Blutanalyse der Kontrollgruppen 1-3**
Mittelwerte der Blutanalysen der Kontrollgruppen 1-3.

Auch in der Onkogengruppe 1, bestehend aus zwei Rag-1-defizienten Mäusen, konnte eine erfolgreiche Repopulierung der lymphopenischen Empfängertiere beobachtet werden (Abb. 19 A). In der 3. Woche nach Transplantation lag der Anteil CD3-positiver Blutzellen bei etwa 16%. Vier Wochen später stieg dieser Wert bereits auf 38%. Das Maximum an CD3-positiven Zellen wurde mit 51% in Woche 13 erreicht. Bis auf einen etwas höheren Wert in Woche 3, lag der Anteil CD8-positiver Blutzellen durchgehend etwa 5% unter dem der CD3-positiven. CD4-positive Zellen waren auch in dieser Gruppe so gut wie nicht zu finden und erreichten maximal einen Anteil von 1,5% der Blutzellen. ALK-positive Zellen konnten, ähnlich wie CD4-positive Zellen, kaum im Blut nachgewiesen werden. In Woche 3 lag der Anteil ALK-positiver Zellen bei 1%, in Woche 11 erreichten sie einen Maximalwert von 1,7%, in den restlichen Wochen konnte kein Signal gemessen werden. Ein ähnliches Resultat war auch in Onkogengruppe 2 zu vermerken (Abb. 19 B). 5 Wochen nach Transplantation lag der Anteil CD3-positiver Blutzellen bei 16% und stieg in Woche 7 auf ein Maximum von 21%. ALK-positive Zellen waren auch in dieser Gruppe nicht wiederzufinden.

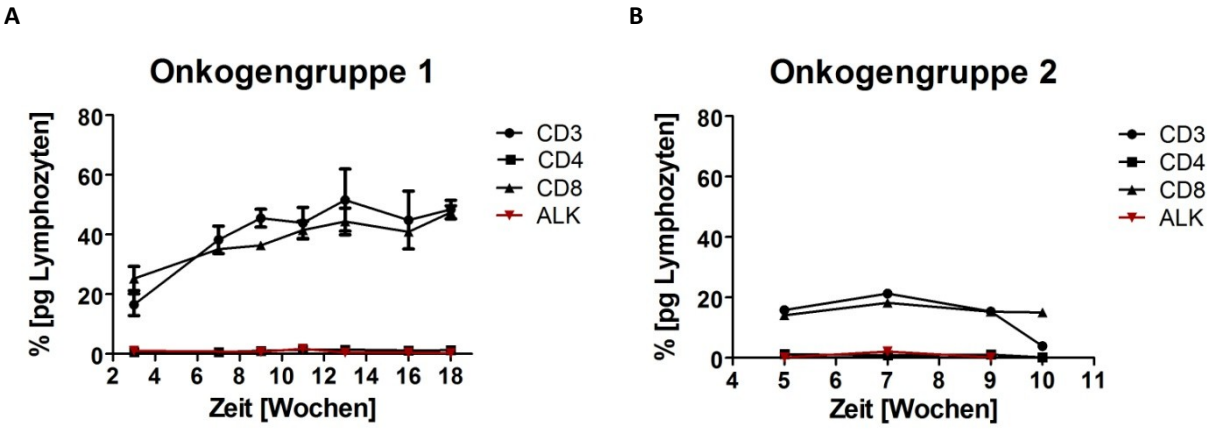



**Abb. 19 Blutanalysen der Onkogengruppen 1 und 2**
(A) Mittelwerte der Blutanalysen der Onkogengruppe 1. (B) Mittelwerte der Blutanalysen der Onkogengruppe 2.

Mithilfe der Blutanalysen konnte kontrolliert werden, dass die Zellen in den Empfängertieren gut anwuchsen und die lymphopenischen Mäuse innerhalb weniger Wochen repopulierten.

## 6.3 Repopulationsverhalten und Populationsdynamiken der genetisch modifizierten und transplantierten T-Zellen in den Kontrollgruppen

Um das Repopulierungsverhalten und die Populationsdynamiken der genetisch modifizierten transplantierten Zellen, sowie die Tumorgenese von Lymphomen zu beobachten, wurden in regelmäßigen Abständen, zusätzlich zu den Blutuntersuchungen, in vivo Biolumineszenzmessungen (BLI, Bioluminescence Imaging) durchgeführt. Beginnend ab der 4. Woche nach Transplantation wurde die biolumineszente Strahlung der transduzierten Zellen wöchentlich gemessen. Die Biolumineszenzstrahlung wurde dabei am narkotisierten Tier in Rückenlage (ventrodorsal) und in rechter Seitenlage (laterolateral) mit dem IVIS Lumina II (Caliper Life Science) erfasst. Somit konnte das Verhalten der transplantierten Zellen, sowie die Entstehung von Lymphomen über einen Verlauf von bis zu 24 Wochen im lebenden Tier verfolgt werden. Um den Verlauf der Repopulierung der transplantierten Zellen in den Empfängertieren beobachten zu können, wurde die biolumineszente Strahlung der transplantierten Zellen in den Mäusen, wie bereits erwähnt (s. 5.3.6.2 In vivo Imaging am IVIS Lumina II) in verschiedenen Positionen, mittels ROIs, gemessen. Es erfolgten Messungen in Rücken- und Seitenlage,

wobei jeweils eine Ganzkörper- und mehrere Einzelmessungen erfolgten. Die Messungen der Einzelregionen bezogen sich auf cervicale, axiale, abdominale, inguinale und popliteale Bereiche in Rückenlage und auf abdominale, splenale und inguinale Bereiche in Seitenlage (Abb. 20). 7 Wochen nach Transplantation konnten erstmals transduzierte Zellen in den Empfängertieren, mithilfe der Biolumineszenzmessung, detektiert werden. Selbstverständlich wurden außerdem täglich Verhalten, Futter- und Wasseraufnahme, Körperhaltung, Ernährungszustand, Pflegezustand, sowie die Ausscheidungen der Tiere durch einen Tierarzt adspektorisch beurteilt. Sofern nicht anders erwähnt waren die Tiere die gesamte Dauer der Studie über unauffällig.

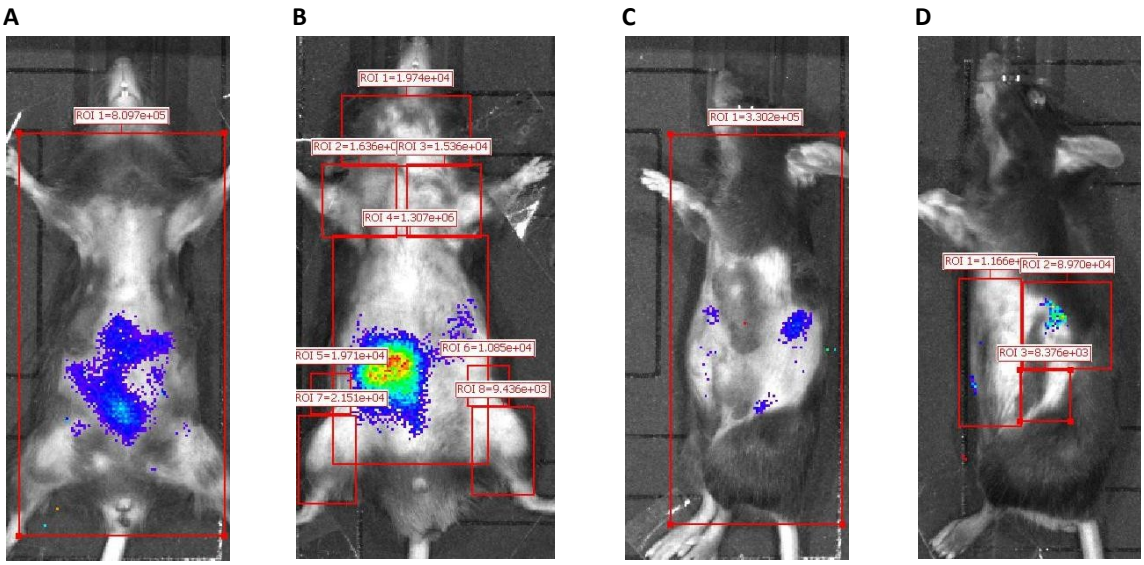



**Abb. 20 Region of Interest (ROI) in der BLI-Messung**

(A) Eine ROI wurde auf den gesamten Körper der Maus in ventrodorsaler Lage gelegt . (B) In der selben Position wurden Einzel-ROIs positioniert. In laterolateraler Lage wurde ebenfalls die Strahlung im gesamten Körper gemessen (C), sowie die Strahlung in den einzelnen Regionen (D).

Durch die Messung einzelner Körperregionen (ROIs) sollte ermittelt werden, ob die transplantierten T-Zellen bevorzugt bestimmte lymphatische Gewebe besiedeln oder sich gleichmäßig in allen lymphatischen Organen verteilen. Obgleich die biolumineszente Strahlung im Abdomen der meisten Tiere am höchsten war, konnte die Ansiedlung in den peripheren lymphatischen Organen beobachtet werden. Die stärksten Signale konnten hierbei im Bereich der inguinalen Lymphknoten verzeichnet werden. Besonders im linken inguinalen Lymphknoten waren die transduzierten Zellen oft präsent. Oft war die Ansiedlung der Zellen in periphere Lymphknoten intermittierend zu beobachten. In anderen Körperregionen, wie etwa den Bereichen der axillaren, poplitealen oder

cervicalen Lymphknoten, ebenso wie im Thorax, waren kaum Zellen detektierbar. In Abbildung 21 ist exemplarisch für die Kontrolltiere der Messverlauf von Maus 3 aus Kontrollgruppe 1 dargestellt. In Woche 7 wurde bei dieser Maus, ebenso wie bei allen anderen, das stärkste Signal im Abdomen gemessen. Deutlich zu sehen, waren die biolumineszierenden Zellen aber auch in den axillaren und inguinalen Lymphknoten (Abb. 21). In Woche 8 und 9 verschwanden die Zellen aus den peripheren Lymphknoten und kehrten in Woche 10 wieder.

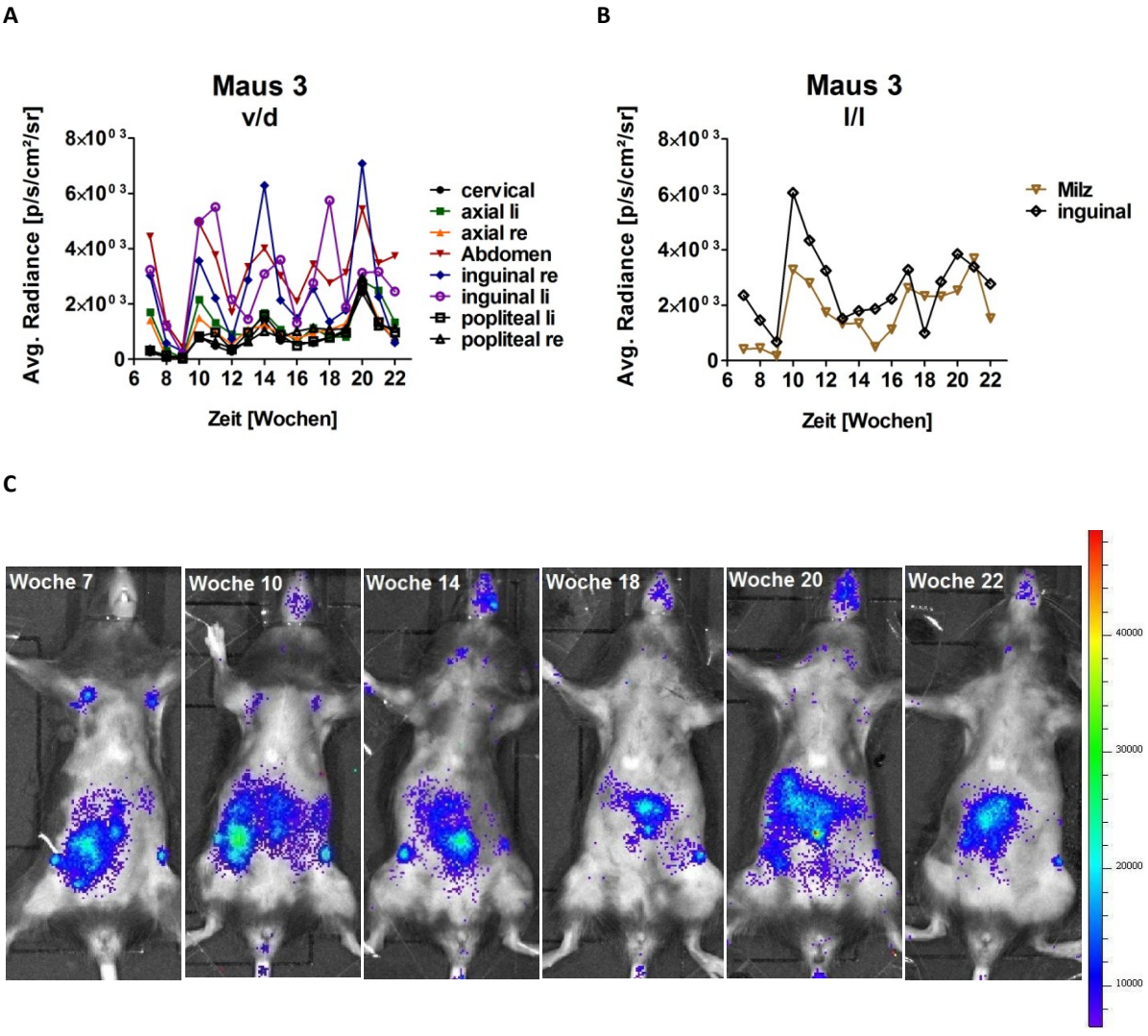



**Abb. 21 Exemplarische BLI-Messung von Kontrollmaus 3**

(A) Ventrodorsale BLI-Einzelmessungen der Maus 3 aus Kontrollgruppe 1 von Woche 7 – 22 im wöchentlichen Abstand. (B) Laterolaterale BLI-Einzelmessung der Maus 3 von Woche 7 – 22. (C) Exemplarische Aufnahmen der BLI-Messungen der Wochen 7, 10, 14, 18, 20 und 22.

Nach Woche 10 wurde kein signifikantes Signal mehr im Bereich der axillaren Lymphknoten messbar, während im (von der Maus aus gesehen) linken inguinalen Lymphknoten, ab der 10. Woche nach Transplantation, bis zur 22. Woche, durchgehend

ein biolumineszente Signal gemessen werden konnte. Im rechten inguinalen Lymphknoten hingegen wurde in Woche 12, 18 und 22 keine Strahlung messbar. Auch die Verteilung der transduzierten Zellen im Abdomen variierte; während in Woche 7 und 10 die Hauptstrahlungsquelle im linken unteren Quadranten zu sein schien, wanderten die transduzierten Zellen in den Wochen 14 und 18 eher ins mittlere Abdomen. In der 20. Woche konnten sie zusätzlich im linken oberen Quadranten, im Bereich der Leber, detektiert werden. In Woche 14 und 20 wurde ein schwaches Signal im Bereich der cervicalen und poplitealen Lymphknoten sichtbar, ansonsten spielten diese Regionen für die Populationsdynamiken der transplantierten Zellen keine bedeutende Rolle. In den laterolateralen Messungen wurden erwartungsgemäß biolumineszierende Zellen im Bereich der Milz und des (von der Maus aus gesehen) linken inguinalen Lymphknoten sichtbar. Interessanterweise wurde im inguinalen Lymphknoten durchschnittlich mehr Strahlung gemessen als in der Milz. Trotz individueller Schwankungen, waren die Prävalenzen der transplantierten Zellen und die dadurch entstehenden Populationsdynamiken in allen Kontrolltieren ähnlich. Mithilfe dieser Messungen konnte somit gezeigt werden, dass sich die transplantierten Zellen intermittierend in peripheren Lymphknoten, insbesondere im linken poplitealen Lymphknoten, ansiedeln. Während den wöchentlichen Biolumineszenzmessungen fiel weiterhin auf, dass die Signalstärke in den Versuchstieren zum Einen stark variierte und zum Anderen meist nur knapp über dem messbaren Bereich lag. Die Nullmessung wurde mit zwei gesunden Mäusen durchgeführt, welche keine transduzierten Zellen transplantiert bekommen hatten und somit keine Luciferase in sich trugen. Diese Nullmessung ergab ein unspezifisches Hintergrundsignal von circa 158 p/s/cm$^2$/sr in der ventrodorsalen Ganzkörpermessung und 100 p/s/cm$^2$/sr in der laterolateralen Ganzkörpermessung. Oberhalb dieses Wertes konnten also signifikante biolumineszente Strahlungen gemessen werden. In Abbildung 22 wird die individuelle Varianz zwischen den Tieren dargestellt. Obwohl die Spenderzellen der Kontrollgruppe 1 und Kontrollgruppe 3 mit beinahe identischen Transduktionseffizienzen transplantiert wurden, konnten die Zellen in Maus 3 (Kontrollgruppe 1), mit Ausnahme von zwei Messtagen, durchgehend detektiert werden (Abb. 22 A). Während in Maus 17 (Kontrollgruppe 3) die transduzierten Zellen nur an 2-3 Tagen sicher detektiert wurden und an den restlichen Messtagen keine signifikante biolumineszente Strahlung vernommen werden konnte. Zwar konnten die transduzierten Zellen in Maus 3

erfolgreich verfolgt werden, die Signalstärke blieb mit maximal 2600 p/s/cm$^2$/sr in der Ganzkörpermessung jedoch recht gering (Abb. 22 B).

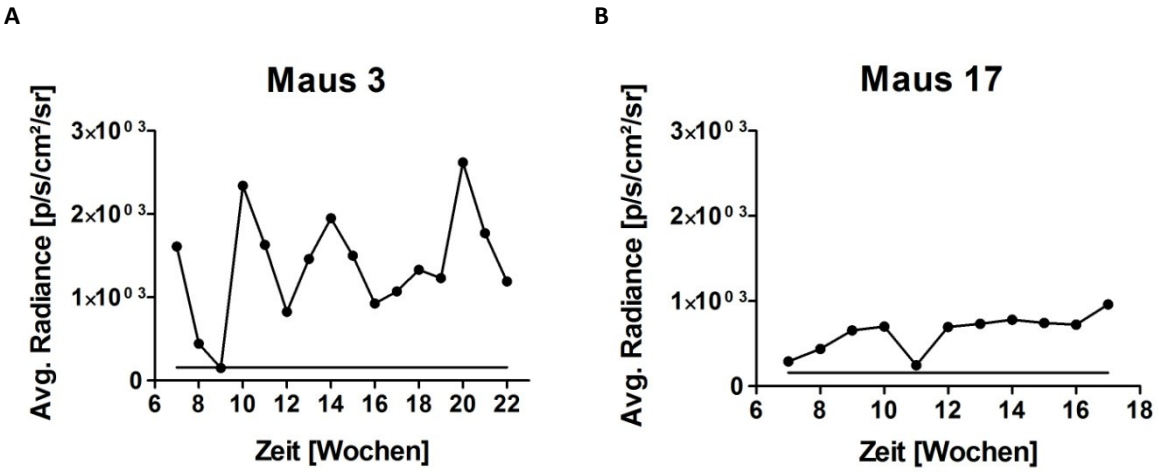



**Abb. 22 BLI Ganzkörpermessung von Maus 3 und Maus 17**

(A) Beispielhafte BLI-Ganzkörpermessung der Maus 3 aus Kontrollgruppe 1, von Woche 7-22. (B) Exemplarische BLI-Ganzkörpermessung der Maus 17 aus Kontrollgruppe 3, von Woche 7-19. Die horizontale Linie stellt die Grenze des unteren Messbereichs dar.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei den restlichen Tieren der Kontrollgruppe 1 und 3 ermittelt; obgleich die Transduktionseffizienz der transplantierten Zellen gleich hoch war, konnten in Kontrollgruppe 1 höhere Strahlungswerte gemessen werden, als in Kontrollgruppe 3. Die Untersuchung der Versuchstiere der Kontrollgruppe 1 ergab im Mittel eine biolumineszente Strahlung von $1x10^3$ – $3x10^3$ p/s/cm$^2$/sr im Verlauf der Wochen 7- 18 (Abb. 23 A). Der höchste Strahlungswert wurde in Woche 18 mit etwa 3300 p/s/cm$^2$/sr gemessen, während der niedrigste in Woche 16 mit etwa 1600 p/s/cm$^2$/sr zu verzeichnen war. In Kontrollgruppe 3 konnte ein stetiger Anstieg der durchschnittlichen Strahlung von Woche 7 bis Woche 11 beobachtet werden. Diese pendelte sich in den folgenden Wochen auf $1x10^3$ – $2x10^3$ p/s/cm$^2$/sr ein und erreichte ein Maximum mit $2{,}4x10^3$ p/s/cm$^2$/sr in Woche 17 (Abb. 23 C). Bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe 2 wurde insgesamt eine noch niedrigere Strahlungsintensität beobachtet (Abb. 23 B). Die Spenderzellen, welche den Tieren der Kontrollgruppe 2 transplantiert wurden, wiesen die niedrigste Transduktionseffizienz auf.

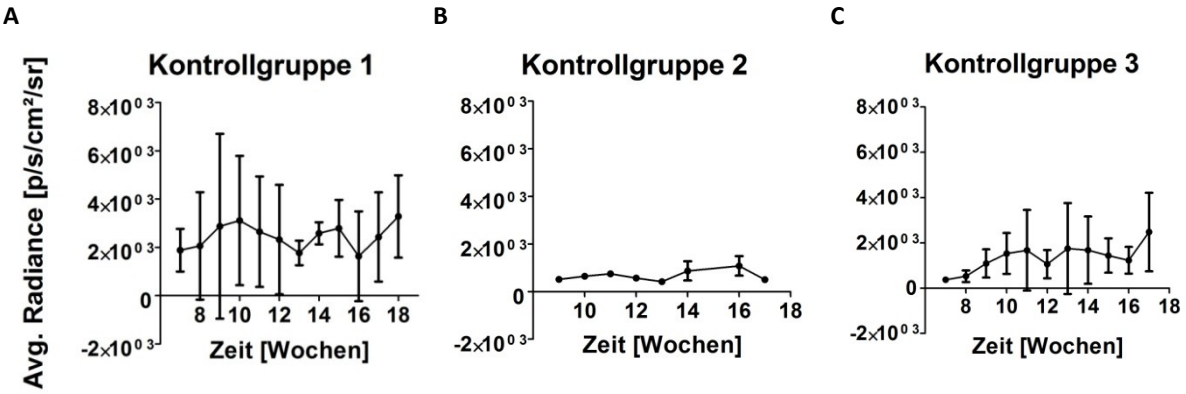



**Abb. 23 Mittlere BLI-Messwerte der Kontrollgruppen 1, 2 und 3**
Mittlere BLI-Messwerte der Versuchstiere der Kontrollgruppen 1, 2 und 3 von Woche 7 – 18 (A und C) bzw. Woche 9 – 17 (B).

Mithilfe dieser Ganzkörpermessung konnte die Korrelation zwischen Transduktionseffizienz und messbarer biolumineszenter Strahlung untersucht werden. In einigen Versuchstieren blieb das Biolumineszenzsignal während des gesamten Messzeitraumes in etwa konstant. In Anderen allerdings, waren größere Schwankungen der Strahlungsintensität, bis hin zum vorübergehenden, vollständigen Signalverlust zu beobachten (Abb. 24). Beinahe allen Tieren war eine Art periodische Schwankung, welche in einem Zyklus von etwa 3 – 6 Wochen auftrat, gemein. Dabei stieg das Biolumineszenzsignal während der ersten Zyklushälfte auf ein vorläufiges Maximum an, um während der zweiten Hälfte auf ein vorläufiges Minimum zu sinken.

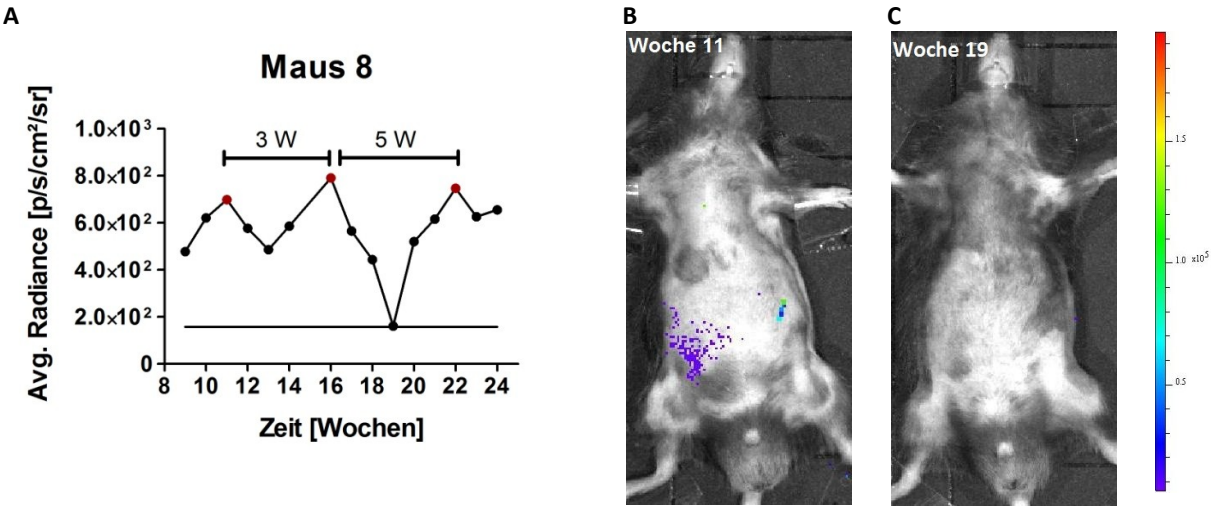



**Abb. 24 BLI-Ganzkörpermessungen der Kontrollmaus 8**
(A) Wöchentliche BLI-Ganzkörpermessungen der Maus 8 aus Kontrollgruppe 2 von Woche 9-24. Die horizontale Linie stellt die Grenze des unteren Messbereichs dar. Die Höhepunkte der Strahlungsintensität sind rot dargestellt, die Abstände zwischen den Höhepunkten sind in Wochen angegeben. (B) Exemplarische Aufnahmen der BLI-Messung von Maus 8 in Woche 11 und in Woche 19 (C).

Bei Tieren mit gutem Repopulationserfolg und hohen Transduktionseffizienzen erschien die Zyklusdauer etwas kürzer als bei Tieren mit schlechterer Repopulierung der transplantierten Zellen und niedrigerer Transduktionseffizienz. Abbildung 24 macht diese Schwankungen exemplarisch anhand der Ganzkörpermessungen von Kontrollmaus 8 deutlich. 3 Wochen später, in Woche 22 konnte der nächste Höhepunkt gemessen werden. Zwischen den ersten beiden Höhepunkten der Biolumineszenzstrahlung lagen 3 Wochen, während zwischen dem 2. und 3. Höhepunkt 5 Wochen lagen. In den Kontrollgruppen 1 und 3 konnte eine bessere Repopulierung beobachtet werden und die Zellen, welche diesen Tieren transplantiert wurden, erzeugten eine höhere Strahlungsintensität. Beispielhaft für diese Gruppen, seien hier Maus 3 (aus Kontrollgruppe 1) und Maus 13 (aus Kontrollgruppe 3) erwähnt (Abb. 25). In Maus 3 waren Strahlungshöhepunkte im Abstand von 2, 3 und 5 Wochen zu vermerken. Während diese bei Maus 13 im Abstand von 1 und 3 Wochen auftraten.

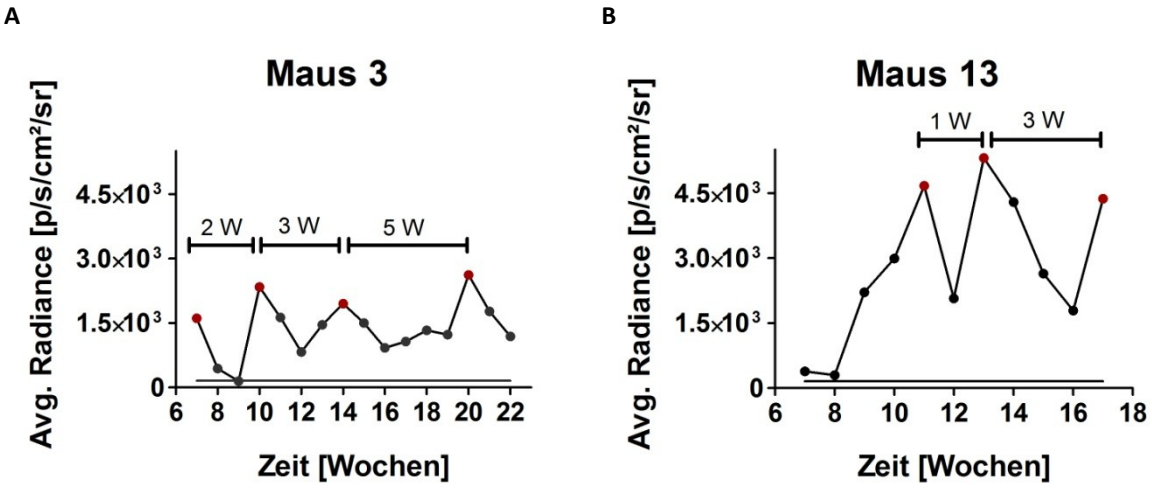



**Abb. 25 BLI-Ganzkörpermessung der Kontrollmäuse 3 und 13**
(A) BLI-Ganzkörpermessung der Maus 3 aus Kontrollgruppe 1 von Woche 7 -22. (B) BLI-Ganzkörpermessung der Maus 13 aus Kontrollgruppe 4 von Woche 7 – 18. Die horizontale Linie stellt die Grenze des unteren Messbereichs dar. Die Höhepunkte der Strahlungsintensität sind rot dargestellt, die Abstände zwischen den Höhepunkten sind in Wochen angegeben.

Durch die Ganzkörpermessung der Versuchstiere und die hohe Sensitivität des IVIS Lumina II (Caliper Life Science) konnten selbst kleinste Schwankungen wahrgenommen und über einen längeren Zeitraum im lebenden Tier beobachtet werden. Die wöchentliche Messung der Tiere ermöglichte die Beobachtung von periodisch wechselnden Biolumineszenzsignalen. Auffällig war, dass beinahe die gesamte Strahlung

bei allen Versuchstieren aus dem mittleren Abdomen gemessen wurde (Abb. 26 A und C). Zu Beginn der Repopulierung der transplantierten Lymphozyten in den lymphopenischen Empfängertieren siedelten sich die Zellen also im Bereich der abdominalen Lymphknoten, vermutlich überwiegend in den darmassoziierten Lymphknoten des Mesenteriums (Lnn. jejunales, Lnn. colici, Lnn. mesenterici caudales, etc.) an (Abb. 26 C).

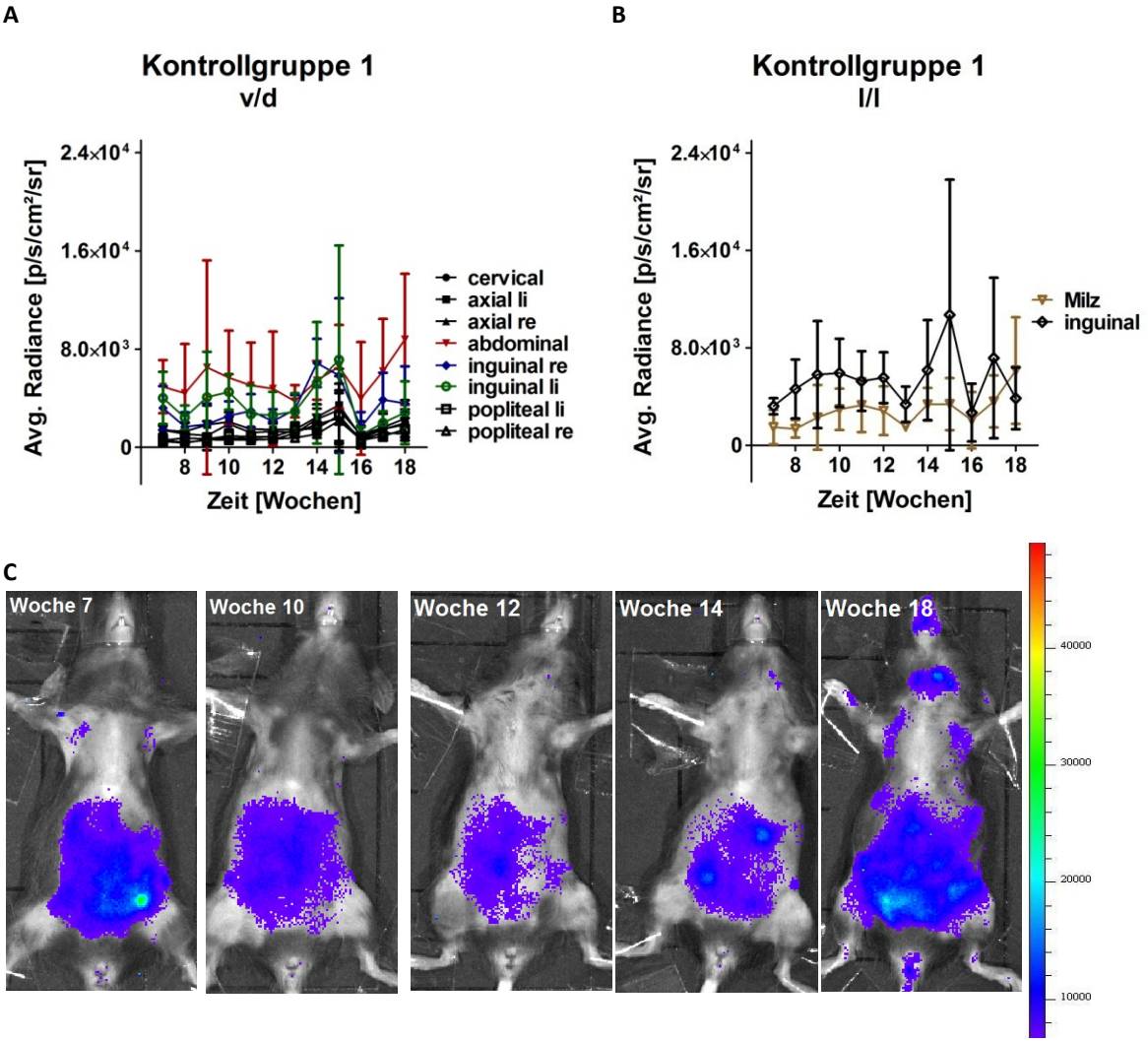



**Abb. 26 BLI der Einzelregionen der Kontrollgruppe 1**

(A) Mittelwerte der Biolumineszenzmessungen der einzelnen Regionen der ventrodorsalen Aufnahmen der Kontrollgruppe 1. (B) Mittelwerte der Biolumineszenzmessungen der einzelnen Regionen der laterolateralen Aufnahmen der Kontrollgruppe 1. (C) Überwiegend abdominal messbare biolumineszente Strahlung einer Maus aus Kontrollgruppe 1.

Bei den meisten Tieren konnte auch im Bereich der inguinalen Lymphknoten ein deutliches Signal gemessen werden. Die restlichen Regionen (cervical, axial, popliteal) spielten eine untergeordnete Rolle. Durchaus ließen sich im Bereich der Milz transduzierte Zellen finden, interessanterweise schien der linke inguinale Lymphknoten

aber eine größere Rolle zu spielen (Abb. 26 B). In diesem Bereich lag die durchschnittliche Strahlungsintensität meist etwa $2x10^3 – 3x10^3$ p/s/cm$^2$/sr über der Strahlungsintensität im Bereich der Milz. Dass die Strahlungswerte in der laterolateralen Darstellung verhältnismäßig höher erscheinen liegt daran, dass die Körpermasse, durch welche die Strahlung aus den transduzierten Zellen bis zur Oberfläche dringen musste, geringer war und somit weniger Strahlung abgelenkt wurde. Milz und Lymphknoten lagen hier also näher an der Körperoberfläche. Bei den Kontrollgruppen 2 und 3 wurden zwar insgesamt etwas niedrigere Strahlungswerte gemessen, die Verteilung war aber in etwa dieselbe (Abb. 27).

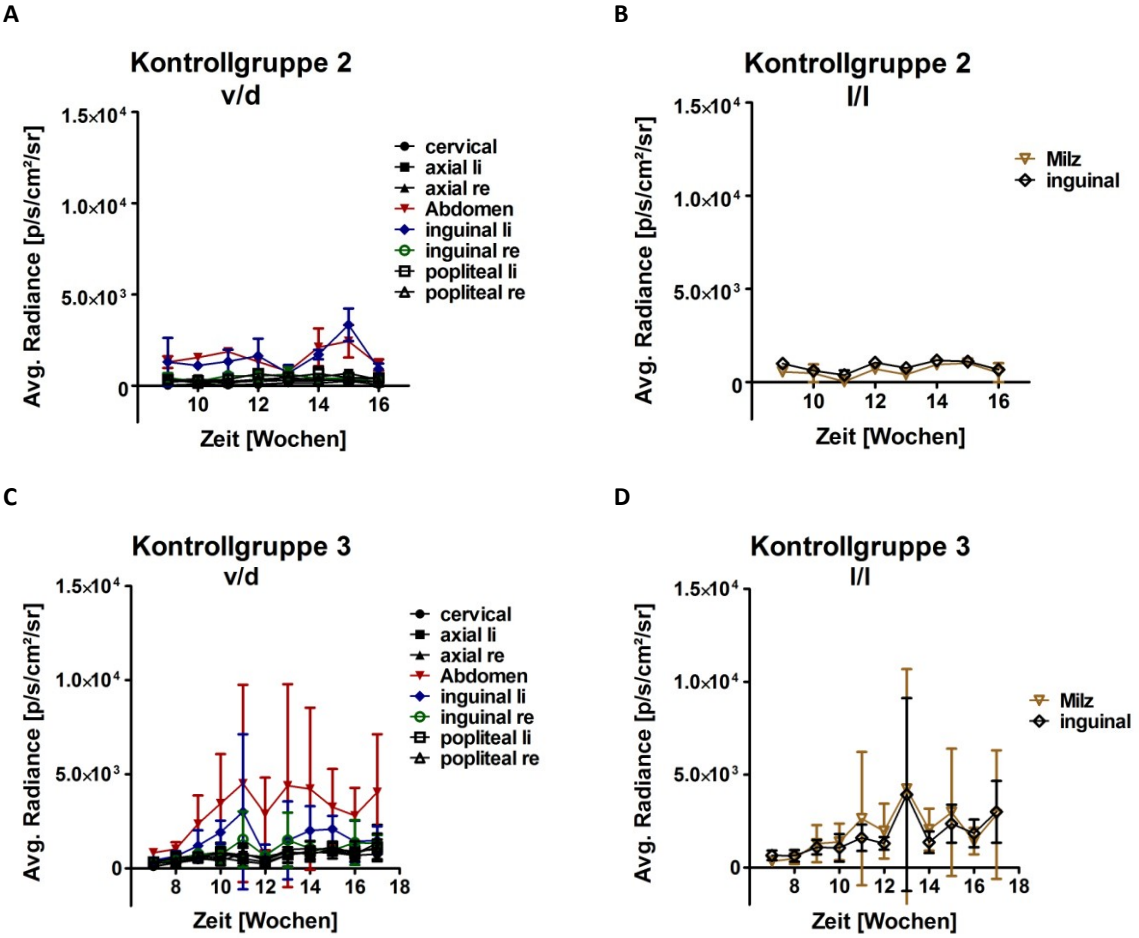



**Abb. 27 BLI-Einzelmessungen der Kontrollgruppen 2 und 3**

(A) Mittelwerte der Biolumineszenzmessungen der einzelnen Regionen der ventrodorsalen Aufnahmen der Kontrollgruppe 2. (B) Mittelwerte der Biolumineszenzmessungen der einzelnen Regionen der laterolateralen Aufnahmen der Kontrollgruppe 2. (C) Mittelwerte der Biolumineszenzmessungen der einzelnen Regionen der ventrodorsalen Aufnahmen der Kontrollgruppe 3. (D) Mittewerte der Biolumineszenzmessungen der einzelnen Regionen der laterolateralen Aufnahmen der Kontrollgruppe 3.

Durch die Messung einzelner Körperregionen konnte gezeigt werden, dass sich die transplantierten Zellen bei den Empfängertieren zunächst überwiegend in den abdominalen Lymphknoten ansiedelten.

## 6.4 Repopulationsverhalten und Lymphomagenese der genetisch modifizierten und transplantierten T-Zellen in den Onkogengruppen

Die mit NPM-ALK transduzierten Zellen wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer biolumineszenten Strahlung in vivo untersucht. Nach Transduktion von lediglich 0,5% mit NPM-ALK wurden zwei Rag-1-defiziente Empfängertiere transplantiert (Onkogengruppe 1). Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte am Tag der Transplantation. Die Zellen repopulierten die lymphopenischen Mäuse erfolgreich, wie sowohl die Blut-, als auch die BLI-Ergebnisse zeigten. In beiden Mäusen der Onkogengruppe 1 konnte nur sehr wenig biolumineszente Strahlung gemessen werden. Über Wochen schwankten die Werte, ähnlich der Kontrolltiere, ohne dass die Tiere ein Lymphom entwickelten. Erst ab der 20. Woche nach Transplantation konnte plötzlich ein deutlicher Anstieg der Strahlungsintensität in beiden Tieren beobachtet werden (Abb. 28 A). In Maus 6 stieg die Intensität der biolumineszenten Strahlung in den folgenden 2 Wochen auf über 11.500 p/s/cm$^2$/sr an und es konnte die Entstehung eines etwa 0,5cm großen Lymphoms im Bereich der Milz und eines etwa 0,4cm großen Lymphoms im Bereich des (von der Maus aus gesehen) linken poplitealen Lymphknotens beobachtet werden. Interessanterweise konnte dasselbe Signal im Bereich der Milz und auch des linken poplitealen Lymphknotens bereits in Woche 15 erstmals beobachtet werden (Abb. 28 B). Die folgenden 3 Wochen waren die Zellen nicht mehr in der Maus detektierbar. Erst ab der 20. Woche blieb das Signal stabil. In Maus 5 stieg das Signal ebenfalls weiter an, erreichte aber maximal 1700 p/s/cm$^2$/sr. Die Entstehung eines soliden Tumors konnte bei dieser Maus nicht beobachtet werden. Neun Mäuse der Onkogengruppe 2 wurden ebenfalls mit NPM-ALK-exprimierenden Spenderlymphozyten transplantiert, wobei die Transduktionseffizient 9,5% betrug. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte ebenfalls am Tag der Transplantation und lag in dieser Gruppe also etwa 15-fach höher, als in Onkogengruppe 1. Leider mussten acht Mäuse dieser Gruppe nach kurzer Zeit

euthanasiert werden, da sie an einer schweren Infektion der oberen Atemwege litten, welche den gesamten Mausstall der Tieranlage betraf und in keinem Zusammenhang mit dem Experiment stand, sodass lediglich eine Maus für den Versuch verblieb.

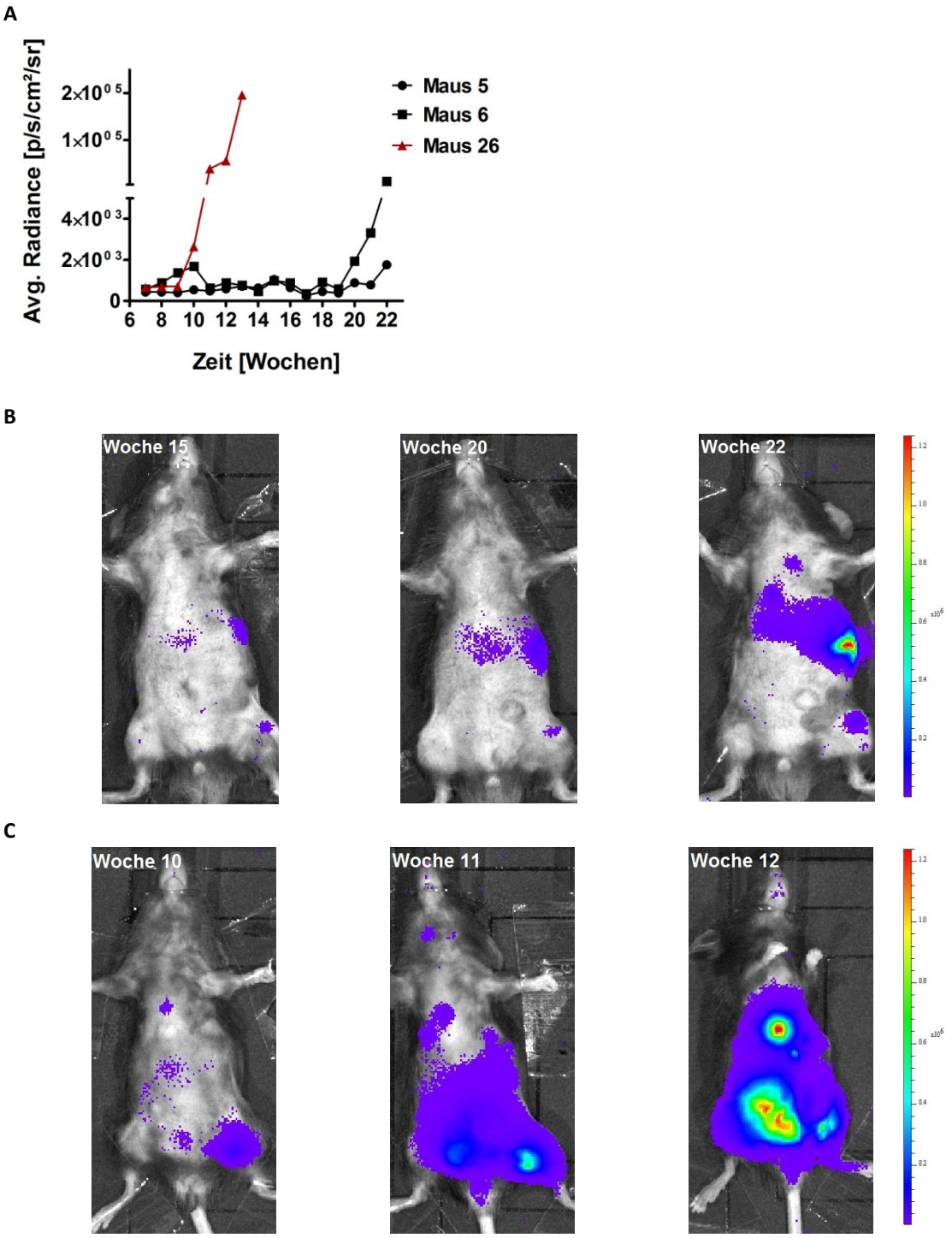



**Abb. 28 BLI-Ganzkörpermessungen der Onkogengruppen 1 und 2**

(A) BLI-Ganzkörpermessungen der Mäuse aus Onkogengruppe 1 und 2 von Woche 7 – 22. (B) Exemplarische Aufnahmen der BLI-Messungen der Maus 6 von Woche 15, 20 und 22. (C) Exemplarische Aufnahmen der BLI-Messungen der Maus 26 von Woche 10, 11 und 12.

In den ersten Messungen ab Woche 7 nach Transplantation lag die Strahlungsintensität der transduzierten Zellen mit etwa 700 p/s/cm$^2$/sr nur knapp über dem messbaren Bereich (Abb. 28 A und C). Zunächst siedelten sich die Zellen in Maus 26 ebenfalls im Bereich des mittleren Abdomens an. Ab der 10. Woche bereits stieg das Signal plötzlich deutlich an, auf über 2600 p/s/cm$^2$/sr und die biolumineszierenden Zellen konnten im mittleren Abdomen, im Bereich des caudalen Sternums und vor allem mit starker Intensität im Bereich des linken poplitealen Lymphknotens gefunden werden. Ab der 10. Woche war eine Vergrößerung des poplitealen Lymphknotens auch palpatorisch nachvollziehbar, ohne dass die Maus unter einer mechanischen Beeinträchtigung oder einem gestörten Allgemeinbefinden gelitten hätte. Nur eine Woche später, erreichte die Strahlung eine durchschnittliche Intensität von mehr als 38000 p/s/cm$^2$/sr und blieb in der Verteilung stabil. Zusätzlich zum Kniekehllymphknoten, wurde in Woche 11 eine zweite Hauptstrahlungsquelle im rechten, unteren Quadranten des Abdomens erkennbar und auch im Bereich der cervicalen Lymphknoten waren einige biolumineszierende Zellen sichtbar (Abb. 28 C). In Woche 12 stieg das Signal nochmal an, auf über 196000 p/s/cm$^2$/sr. Mit Hilfe der optischen Bildgebung (BLI), konnte die Entstehung von 4 soliden Tumoren in der Maus 26 beobachtet werden. In Woche 12 verschlechterte sich der Allgemeinzustand der Maus zunehmend, sodass sie euthanasiert wurde. Die Organe wurden 10 Minuten nach erneuter Injektion von D-Luziferin und Entnahme aus dem Tierkörper, einzeln hinsichtlich ihrer bioluminezierenden Strahlung untersucht (Abb. 29).

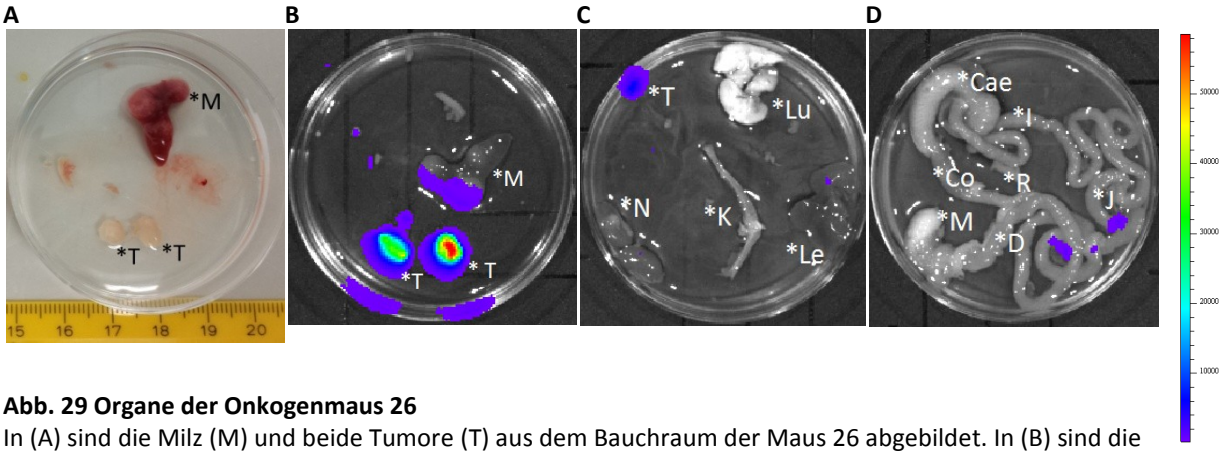



**Abb. 29 Organe der Onkogenmaus 26**
In (A) sind die Milz (M) und beide Tumore (T) aus dem Bauchraum der Maus 26 abgebildet. In (B) sind die Milz (M) und die Tumore (T) des Bauchraums in der Bioluminezenzmessung dargestellt. In (C) sind oben links der Tumor (T) des linken poplitealen Lymphknotens, oben mittig die Lungen (Lu), unten mittig die Knochen (K) des linken Ober- und Unterschenkels, unten rechts die Leber (Le) und unten links beide Nieren (N), zu sehen. In (D) ist der gesamte Magen-Darm-Trakt, mit Magen (M), Duodenum (D), Jejunum (J), Ileum (I), Caecum (Cae), Colon (Co) und Rektum (R), in der Bioluminezenzmessung dargestellt.

Milz und Leber waren stark vergrößert, deformiert und mit multifokalen, speckigen, erhabenen, derb-elastischen Umfangsvermehrungen überseht. Im Bereich der rechten Leiste war ein etwa linsengroßer (0,5 cm im Durchmesser), rundlicher, weißlich-speckiger Tumor zu sehen. Ein ähnlicher Tumor (etwa erbsengroß; 0,7 cm im Durchmesser) war weiter ventral, nahe dem Colon descendens zu finden (Abb. 29 A und B). Ebenso konnte ein etwa 0,4 cm (im Durschnitt) großer Tumor caudal am linken Knie entnommen werden (Abb. 29 C). In den Tumoren wurde eine hohe Strahlungsintensität, von jeweils mehr als 50000 p/s/cm$^2$/sr gemessen. Andere Organe, wie etwa die Lunge, die Nieren oder die langen Röhrenknochen der Hintergliedmaße waren nicht erkrankt. Im Magen-Darm-Trakt konnten 2 leichte Signale im Bereich des Duodenums und Jejunums erfasst werden (Abb. 29 D), ebenso in der Leber (Abb. 29 C). Obgleich die Strahlungsintensität in Onkogenmaus 26 um ein vielfaches höher liegt als in Onkogenmaus 6, fällt doch auf, dass die Lokalisationen der entstandenen Lymphome sich sehr ähneln (Abb. 30).

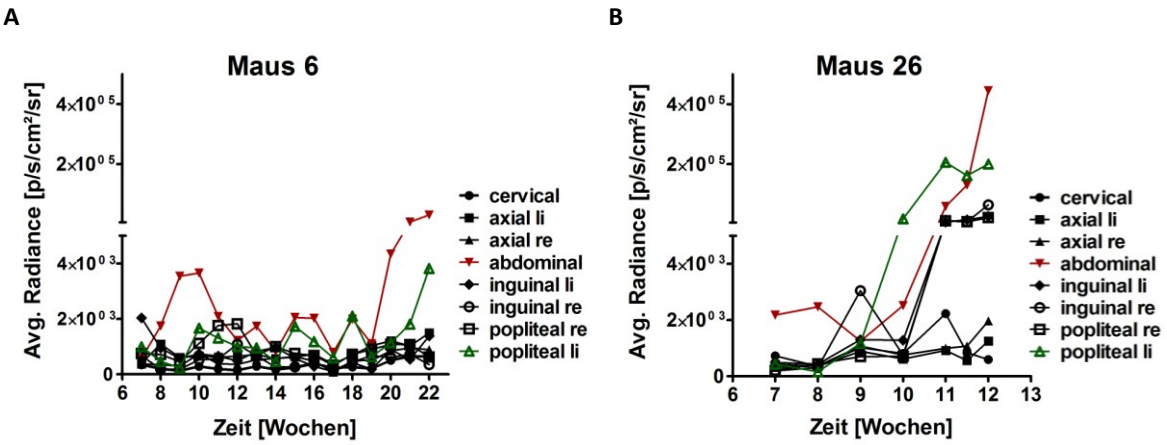



**Abb. 30 BLI- Einzelmessungen der Mäuse 6 und 26**

(A) Ventrodorsale BLI-Einzelmessungen der Maus 6 aus Onkogengruppe 1 von Woche 7 – 22. (B) Ventrodorsale BLI-Einzelmessungen der Maus 26 aus Onkogengruppe 2 von Woche 7 – 12.

In beiden Fällen wurde die meiste Strahlung im Bereich des Abdomens und die zweit meiste Strahlung im linken Knielymphknoten gemessen. Bei Maus 26 konnte sogar festgestellt werden, dass das Lymphom im Bereich des Knielymphknotens oder linken Inguinalbereichs seinen Ursprung zu haben schien (Abb. 30 B). Die Transformation der Lymphozyten zu malignen Tumorzellen verlief in Maus 26 beinahe doppelt so schnell wie in Maus 6. Diese Beobachtung erweckt den Eindruck, als könnte die Transduktionseffizienz mit der Latenzzeit der Tumorgenese zusammen hängen.

Erwartungsgemäß lag die Strahlungsintensität der Onkogentiere nach Ausbildung eines Lymphoms deutlich über der Strahlungsintensität der Kontrolltiere. Die höchste durchschnittliche Strahlung, welche in den Kontrolltieren gemessen werden konnte, wurde in Maus 1 (Kontrollgruppe 1) in Woche 9 beobachtet. Sie betrug über 8500 p/s/cm$^2$/sr und wurde überwiegend im Abdomen gefunden (Abb. 26 A). Auch in den Onkogentieren wurden vor Entstehung der Lymphome entweder niedrige Strahlungswerte oder sogar gar keine Strahlung gemessen. Erst als die Tumore entstanden, stiegen die Strahlungswerte stark an. In Onkogenmaus 6 (Onkogengruppe 1) wurde ein maximaler Strahlungswert von etwa 11500 p/s/cm$^2$/sr gemessen (Abb. 31 A).

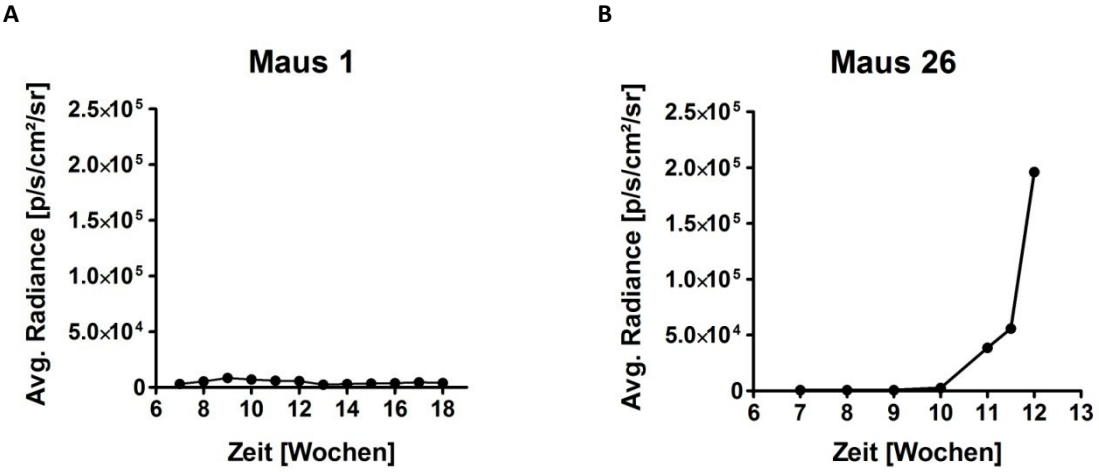



**Abb. 31 Maximale Strahlungsintensitäten**
(A) BLI-Ganzkörpermessung der Maus 1 aus Kontrollgruppe 1 von Woche 7 – 18. (B) BLI-Ganzkörpermessung der Maus 16 aus Onkogengruppe 2 von Woche 7 – 12.

In Maus 26 (Onkogengruppe 2) erreichten die transduzierten Zellen sogar eine Strahlungsintensität von über 196000 p/s/cm$^2$/sr (Abb. 31 B). Mithilfe der BLI-Ganzkörpermessung von gesunden, repopulierten Versuchsmäusen und an Lymphomen erkrankten Versuchsmäusen konnte gezeigt werden, dass die Lymphome eine vielfach höhere Strahlungsintensität aufweisen, als gesunde lymphatische Organe. Diese Beobachtung kann unter anderem helfen, die Entstehung von Lymphomen mithilfe von in vivo Bildgebungsverfahren früher zu erkennen.

## 6.5 Vergleichbarkeit der ALK-positiven ALCLs des Menschen mit den artifiziell erzeugten ALK-positiven Lymphomen in der Maus

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich das in dieser Studie benutzte Mausmodell dazu eignet, Rückschlüsse auf die Humanmedizin schließen zu können. Hierzu wurden H.E. und immunhistochemisch gefärbte, histologische Präparate von humanen ALK-positiven ALCL-Fällen (n=10, davon kleinzellige Variante n= 5) mit denen von artifiziell erzeugten ALK-positiven Tumoren in der Maus (n= 8) vergleichen. Hierzu wurden archivierte Tumore der Arbeitsgruppe Newrzela verwendet, welche demselben Mausmodell entsprachen wie dem in dieser Arbeit verwendeten (OT-1-Spendertiere, ALK als Onkogen, Rag-1-Empfängertiere).

### 6.5.1 Ähnlichkeiten in der Morphologie

Die Tumorzellpopulation der artifiziell erzeugten, ALK-positiven Lymphome bestand in der Maus überwiegend aus mittelgroßen, zytoplasmaarmen, monomorphen Zellen, mit zentral gelegenem, runden Zellkern und vielen kleinen Kernkörperchen (Abb. 32 A). Auch die kennzeichnenden „Hallmark-Zellen“ mit ihrem hufeisenförmigen Kern konnten mehrfach im Lymphom der Maus gefunden werden (Abb. 32 B).

**A** **B**

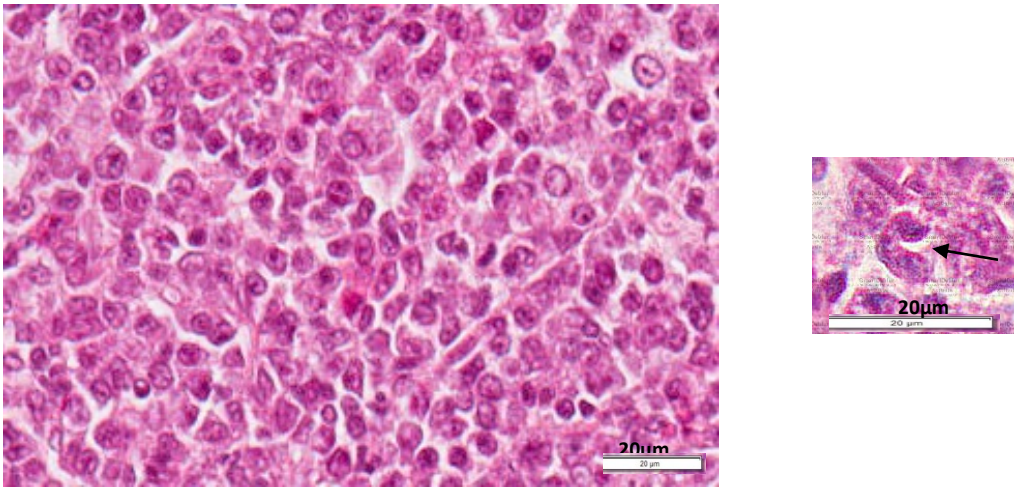



**Abb. 32 ALK-positives Lymphom in der Maus (H.E.)**
(A) Histologisches Präparat eines ALK-positiven Lymphoms in der Maus. (B) Sog. „Hallmark-Zelle“ im Mauslymphom. H.E. Färbung. Vergrößerung: 40x. Markierung: 20µm.

Die durchschnittliche Größe der Tumorzellen betrug bei den humanen Fällen der kleinzelligen ALK-positiven ALCLs (n=5) 7,96 µm. Die Tumorzellen in der Maus (n=8) erreichten eine sehr ähnliche Größe von durchschnittlich 7,82 µm (Abb. 33).

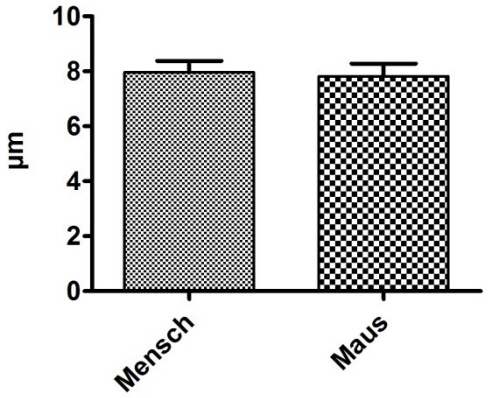



**Abb. 33 Durchschnittliche Tumorzellgröße**

Am häufigsten tritt das ALK-positive ALCL im Menschen in den Lymphknoten oder extranodal in Haut, Knochen, Lunge und Leber auf. Tumore im ZNS, dem Gastrointestinaltrakt oder im Mediastinum (beim Hodgkin-Lymphom häufiger zu sehen) sind selten (Swerdlow, 2008). Im von uns verwendeten Mausmodell traten die Tumore in der Milz und den Lymphknoten (fokal oder multifokal) auf. Zudem wurden häufig, vermutlich metastasierte Tumorzellen in der Leber gefunden. All diese Beobachtungen, die Morphologie und das biologische Verhalten betreffend, lassen darauf schließen, dass die in den Versuchsmäusen entstandenen Lymphome morphologisch eher der kleinzelligen, als der klassischen Variante des ALCL ähneln.

### 6.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Die morphologische Erscheinung des humanen ALK-positiven ALCL kann stark variieren. Um die Diagnose sicher stellen zu können, wird die Immunhistochemie hinzugezogen. Je nach Grad der Entartung der Tumorzellen sind entweder noch spezifische Zellmarker auf der Zelloberfläche vorhanden oder aber die Zellen sind so stark entdifferenziert, dass keine Marker mehr zu finden sind und die Zellen dem Phänotyp einer „Nullzelle“ entsprechen. Die histologischen Präparate der Versuchsmäuse wurden qualitativ auf die Expression der Marker ALK, CD30, CD79a, CD3, CD8 und CD4 getestet. Da es sich bei den transplantierten Zellen um Lymphozyten einer OT-1 Maus handelte, deren T-

Lymphozytenreservoire fast ausschließlich aus CD8-positiven Lymphozyten besteht, wäre in der IHC ein positives Färbeergebnis zu erwarten gewesen, insofern die Zellen aufgrund der Transformierung ihre typischen Oberflächenmarker nicht verloren hätten. Für CD4, den Marker für T-Helferzellen, erwarteten wir dementsprechend ein überwiegend negatives Ergebnis in der IHC. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der histologischen Mauspräparate dargestellt. CD3-positive Zellen konnten immunhistochemisch in den Mauspräparaten nachgewiesen werden. CD3-positive Zellen fanden sich sowohl in der Milz, als auch im Tumor, sowie den Tumormetastasen wieder. CD8 ließ sich ebenfalls immunhistochemisch darstellen. CD8-positive Zellen fanden sich ebenfalls in der Milz, den Tumoren und Tumormetastasen in anderen Organen. Ob es sich bei den CD3- bzw. CD8-positiven Zellen tatsächlich auch um die Tumorzellen handelt oder um untransduzierte Spenderlymphozyten, müsste mit einer Doppelfärbung eruiert werden. Der Nachweis der Oberflächenmarker CD79a und CD4 fiel entsprechend negativ aus (s. Anhang). Desweiteren konnte der spezifische Marker für ALK-positive ALCLs, ALK, in den histologischen Präparaten nachgewiesen werden (Abb. 34 C). ALK ließ sich sowohl an der Zellmembran und im Zytoplasma, als auch im Kern anfärben. Der Oberflächenmarker CD30 ließ sich immunhistochemisch in den formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben nicht bzw. nur sehr schwach darstellen (Abb. 34 D).

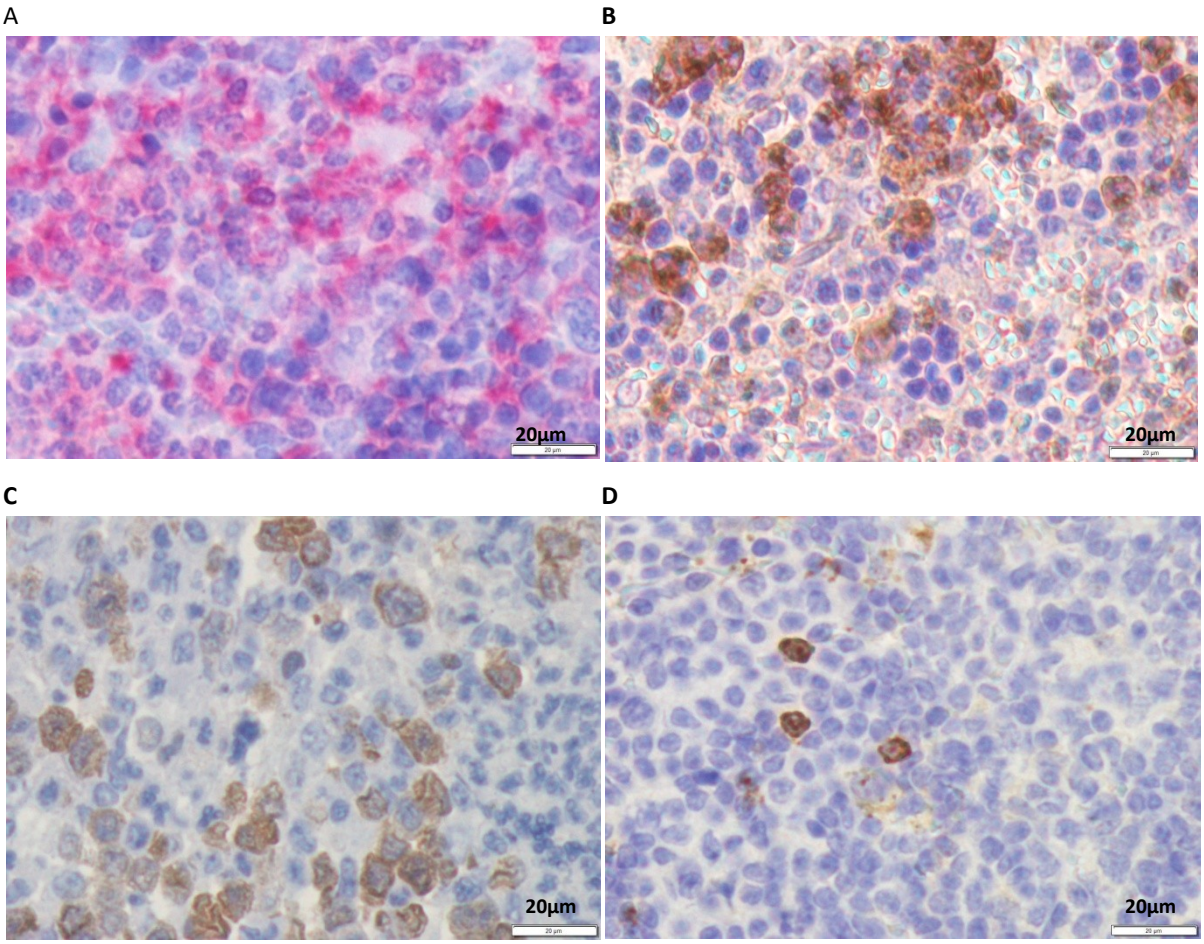



**Abb. 34 IHC der histologischen Präparate von Mäusen (Milz)**
In Bild (A) ist die immunhistochemische Färbung des histologischen Lymphompräparates mit dem Antikörper anti-CD3 abgebildet. Des Weiteren mit dem Antikörper anti-CD8 (B), anti-ALK (C) und anti-CD30 (D). Vergrößerung: 40x. Markierung: 20µm.

Somit entsprachen sowohl die Morphologie, als auch das immunhistochemische Färbeverhalten der Lymphomzellen in unserem Mausmodell eher dem eines kleinzelligen ALK-positiven ALCL des Menschen, als dem klassischen.

## 6.6 Parallelen zur Veterinärmedizin und Etablierung neuer immunhistochemischer Färbungen für die Kleintiermedizin

Um die lymphozytären Rundzelltumore von Hunden und Katzen näher zu untersuchen und eventuell Parallelen zum ALK-positiven kleinzelligen ALCL des Menschen und somit neue Ansätze zur Klassifizierung von Lymphomen zu finden, wurden 10 Fälle von Rundzelltumoren bei Hunden (n= 8) und Katzen (n= 2), welche mit den morphologischen Merkmalen der kleinzelligen ALCLs übereinstimmten, aus dem Institut für Veterinär-

Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, untersucht. Die Tumorzellen der Hunde und Katzen hatten mit 7,6 µm (n=5) beinahe dieselbe Größe wie die der kleinzelligen ALCLs des Menschen (7,96 µm) oder der Maus (7,82 µm). Die Tumorzellen waren ebenfalls lymphoiden Ursprungs, eher rund mit wenig bis mäßig viel Zytoplasma. Der Zellkern lag meist zentral, war rundlich und basophil und wies multiple Kernkörperchen auf (ähnlich den sog. „Spiegelei-Zellen"; Abb. 35 A). Auch die Zellen mit hufeisenförmigem Zellkern, die sog. „Hallmark-Zellen", welche in der Humanmedizin als kennzeichnend für ein ALK-positives ALCL gelten, konnten in einigen (n= 5) der untersuchten Rundzelltumore der Hunde gefunden werden (Abb. 35 B), ebenso wie die sog. „Donut-Zellen" (n=3), deren Erscheinung einer Invagination der Kernmembran zugrunde liegt (Abb. 35 C).

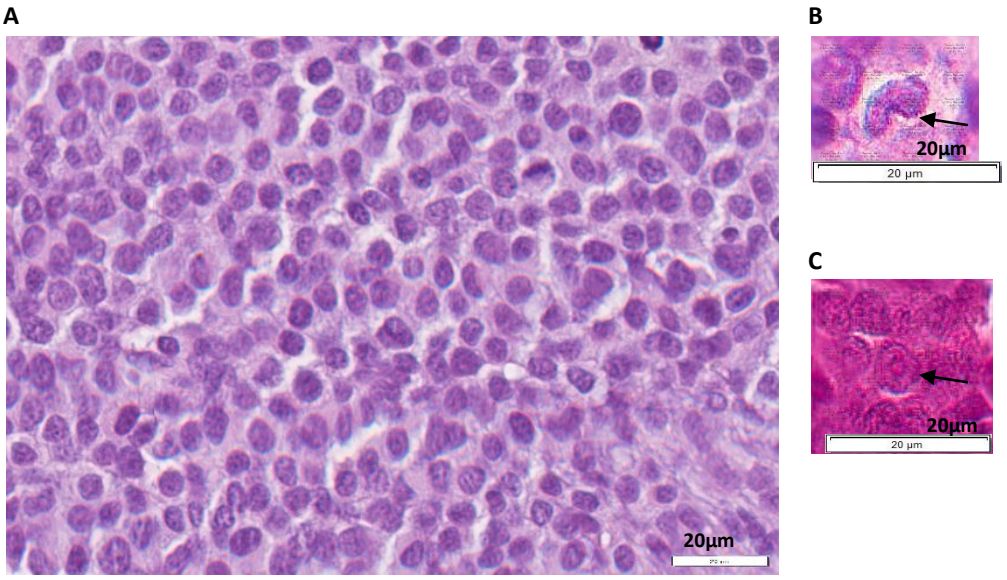



**Abb. 35 Rundzelltumor eines Hundes**
(A) Histologisches Präparat eines Rundzelltumors beim Hund. (B) Sog. „Hallmark-Zelle". (C) Sog. „Donut-Zellen". H.E. Färbung. Vergrößerung: 40x. Markierung: 20µm.

Diese Art von Rundzelltumor wird bei Hunden und Katzen vor allem in Lymphknoten oder extranodal in der Haut oder Schleimhaut gefunden (Jubb, Kennedy, Palmer, 2015). Aufgrund der morphologischen Parallelen zum ALK-positiven kleinzelligen ALCL des Menschen sollten diese Rundzelltumore mithilfe der Immunhistochemie näher bestimmt werden. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse für die paraffineingebetteten Präparate von Hunden und Katzen dargestellt. Fünf (drei Hunde, zwei Katzen) der untersuchten lymphozytären Rundzelltumore stellten sich in der IHC positiv für den T-Zellmarker CD3 dar (Abb. 36 A und B). Vier  (vier Hunde, null Katzen) der Fälle erwiesen sich in der IHC als

B-Zelltumore (CD79a-positiv). Ein Tumor (Hund) war weder CD3- noch CD79a-positiv und entsprach dem Immunophänotyp eines Null-Zell-Tumors.

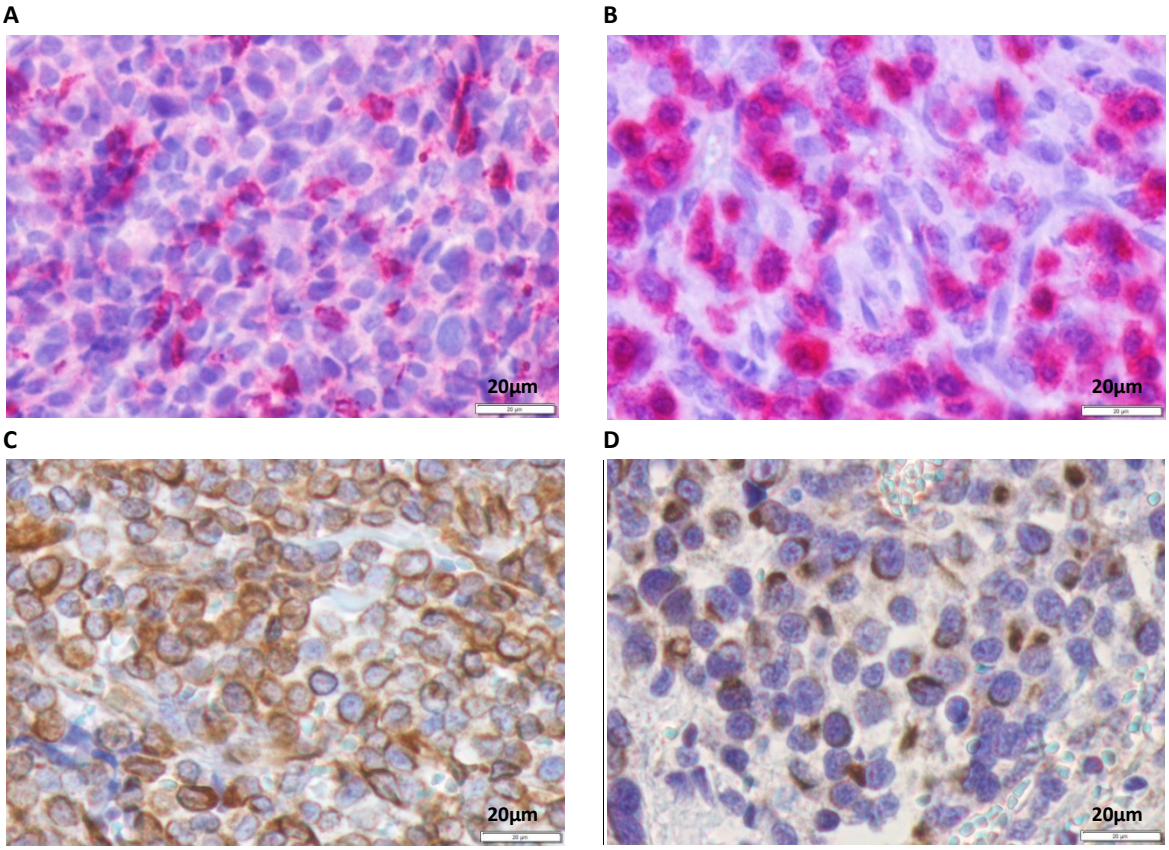



**Abb. 36 IHC der histologischen Präparate von Hund und Katze**
Immunhistochemische Färbung der histologischen Lymphompräparate mit dem Antikörper anti-CD3 beim Hund (A) und der Katze (B). Des Weiteren sind die immunhistochemischen Darstellungen von CD8-positiven T-Zellen beim Hund (C) und der Katze (D) dargestellt.

Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen, eine immunhistochemische Darstellung des Oberflächenmarkers CD8 auf formalinfixiertem, paraffineingebettetem Organmaterial von Mäusen und vereinzelt auch Hunden zu etablieren. Dazu wurde ein polyklonaler Kaninchenantikörper und spezielle Vorbehandlungen angewandt (Tabl. 1). Es wurden vier histologische Präparate von Hunden für die Färbung verwendet (zwei T-Zelltumore und zwei gesunde Lymphknoten), dabei ließ sich CD8 auf drei Präparaten anfärben (zwei Tumore und ein gesunder Lymphknoten). Der Marker für zytotoxische T-Zellen (CD8) wurde in den histologischen Präparaten von Hunden an der Zellmembran dargestellt (Abb. 36 C). In einem felinen Lymphomfall konnte der Oberflächenmarker CD8 perinukleär in Lymphozyten dargestellt werden (Abb. 36 D). Dieses Ergebnis ließ sich an histologischen Präparaten von gesunden felinen Lymphozyten allerdings nicht

reproduzieren. Der Tumormarker ALK, ebenso wie die Oberflächenmarker CD4 und CD30 konnten in keinem der untersuchten Fälle von Hunden oder Katzen immunhistochemisch nachgewiesen werden.

# 7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Entstehung von NPM-ALK-positiven Tumoren aus reifen, monoklonalen T-Lymphozyten in lymphopenischen Empfängertieren mithilfe von in vivo Biolumineszenzbildgebung beobachtet. Um das Verhalten der Tumorzellen mit dem physiologischen Verhalten von normalen Lymphozyten vergleichen zu können, wurden ebenfalls Kontrollgen-transduzierte Zellen in Empfängertiere transplantiert.

## 7.1 Ansiedlung der mit dem Kontrollgen oder Tumorgen transduzierten T-Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit konnten die Populationsdynamiken der transduzierten T-Lymphozyten in den lymphopenischen Empfängertieren beobachtet werden. Dabei fiel auf, dass die Vermehrungsphase der Zellen vor allem im Abdomen stattfand. Desweiteren wurden biolumineszierende Zellen immer wieder intermittierend in peripheren Lymphknoten gefunden. Dabei spielten besonders die inguinalen Lymphknoten eine Rolle. Seltener wurden die Zellen in den axillaren, poplitealen oder cervicalen Lymphknoten gefunden. Die ex vivo Analyse der Bauchorgane ergab weiterhin, dass die transduzierten Zellen nicht in den Peyer´schen Platten wieder zu finden waren, sondern überwiegend in den Mesenteriallymphknoten und der Milz. In nicht-lymphatischen Organen wie dem Gehirn, Knochen, Rückenmark oder der Lunge, fand keine Ansiedlung der Lymphozyten statt. Allerdings könnte dies zu einem früheren Zeitpunkt vorübergehend der Fall gewesen sein, da einige Studien zeigen, dass T-Zellen sich nach intravenöser Transplantation vorübergehend in der Lunge ansiedeln können (Edinger et al., 2003; Odoardi et al., 2012). Zum Überleben benötigen Lymphozyten Stimulation, andernfalls gehen sie in Apoptose. In der Peripherie hängt ihr Überleben von rezeptorvermittelten Signalen und Zytokinen ab (Surh, Sprent, 2008). Wie in Abschnitt 4.1.3 bereits beschrieben, spielen die MHC-Selbstpeptid-Moleküle für die antigenunabhängige Stimulation eine entscheidende Rolle und die T-Zellen konkurrieren intra- und interklonal um jeden Stimulus (Kassiotis et al., 2003; Kieper et al., 2004,

Murphy et al., 2014). Ebenso wurde die zytokinabhängige Ansiedlung (IL-7) von CD4-positiven Zellen in mucosaassoziierten lymphatischen Geweben und die IL-15-abhängige Ansiedlung von CD8-positiven Zellen in peripheren Lymphknoten beschrieben (Yang et al., 2011). Es ist daher anzunehmen, dass sich die Ansiedlung der in dieser Studie verwendeten monoklonalen CD8-positiven T-Zellen in Lymphknoten und Milz entsprechend ihrer stimulatorischen Nischen vollzog. Einen besonderen Aspekt spielt hierbei die lymphopenische Empfängermaus (Rag-1-defizient), da die transplantierten monoklonalen T-Zellen somit keinerlei endogener Konkurrenz ausgesetzt waren. Für die Onkogentiere bedeutete das außerdem, das potentielle präleukämische T-Zellklone neu erschlossene stimulatorische Nischen konkurrenzlos besetzten und somit ungehindert auswachsen konnten (Newrzela et al., 2008). In Abschnitt 6.3 fiel auf, dass die inguinalen Lymphknoten besonders häufig besiedelt wurden. Auch beide Tumortiere entwickelten Lymphome im Bereich der linken inguinalen bzw. poplitealen Lymphknoten und der Milz. Bei einem Tier wurde sogar erkennbar, dass das Lymphom seinen Ursprung im linken inguinalen Lymphknoten zu haben schien und dann vermutlich weiter in den linken Knielymphknoten und Mesenteriallymphknoten metastasierte (Abb. 28). In früheren Untersuchungen konnte bereits bewiesen werden, dass T-Zellen, welche in bestimmten peripheren Geweben zu T-Gedächtniszellen differenzierten, für diese Gewebe „geprägt“ sind und leichter dorthin zurück migrieren können (Mora et al., 2006; Woodland et al., 2009). Dies geschieht über die Expression von spezifischen Chemokinrezeptoren auf den Zelloberflächen, durch welche die Lymphozyten mit den Endothelzellen im jeweiligen Kapillargebiet interagieren und zur Migration ins Gewebe angeregt werden (Mora et al., 2006; Woodland et al., 2009; Jacobi, 2011). Vor allem aber das Angebot an passenden MHC-Selbstpeptid-Molekülen lockt die Zellen vermutlich in bestimmte Regionen. Neueste Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass MHC-Selbstpeptid-Moleküle auf bestimmte Lokalisationen im Organismus begrenzt auftreten könnten und sich T-Zellen mit passendem TCR, dementsprechend in diesen Regionen aufhalten (persönliche Mitteilung Dr. Kirberg, 2015). Ob es sich bei den inguinalen Lymphknoten der Versuchstiere um solche Nischen für die T-Zellen der Spendertiere handeln könnte, lässt sich aufgrund der geringen Fallzahl nicht sagen. Von ursprünglich elf transplantierten Onkogentieren mussten acht aufgrund einer Infektion der oberen Atemwege, welche den gesamten Mausstall der Tieranlage betraf und in keinem Zusammenhang mit dem Experiment

stand, leider frühzeitig euthanasiert werden. Die Versuche sollten in nachfolgenden Arbeiten mit einer größeren Anzahl an Versuchstieren wiederholt werden.

## 7.2 Schwankungen der Strahlungsintensität

Im Abschnitt 6.3 dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass die transduzierten Zellen in den Kontrolltieren Schwankungen in der Signalintensität unterlagen. Generell kann der Verlauf von transplantierten Lymphozyten in Empfängertieren in eine Expansionsphase, eine Minimierungsphase und eine Stabilisierungsphase unterteilt werden (Yang et al., 2011). Ähnliche Populationsdynamiken können auch im Zusammenhang mit viralen, bakteriellen oder parasitären Infektionen beobachtet werden. Nach Antigenkontakt kommt es zur klonalen Expansion der T-Lymphozyten mit der Ausbildung von Effektorzellen (Expansionsphase). Dabei dauert die volle Aktivierung des adaptiven Immunsystems mit Bildung von Effektorzellen etwa 4 – 5 Tage. Nach Beseitigung des Antigens, fehlt den Lymphozyten das Überlebenssignal, sodass die meisten Lymphozyten in Apoptose gehen (Minimierungsphase). Einige der Klone bleiben erhalten und differenzieren zu sogenannten Gedächtniszellen, die auf eine erneute Infektion umso schneller reagieren können. Das adaptive Immunsystem kehrt zum ursprünglichen Gleichgewicht zurück (Stabilisierungsphase; Murphy et al., 2014). Obgleich die Versuchstiere in dieser Studie monoklonale (OT-1-Spenderzellen) T-Lymphozyten transplantiert bekamen, deren TCR spezifisch das OVA-Peptid bindet und die Tiere außerdem unter möglichst sterilen Bedingungen gehalten wurden (s. 5.3.4.1 Tierhaltungsbedingungen), liegt die Vermutung nah, dass die Tiere latenten Infektionen durch gewöhnliche Umgebungskeime oder Stress, beispielsweise durch die Blutentnahmen oder IVIS-Messungen, ausgesetzt waren. Obwohl die transplantierten monoklonalen T-Lymphozyten nicht spezifisch auf fremde Antigene reagieren können, könnten Zytokine aus einem proinflammatorischen Mikromilieu zu einer unspezifischen Stimulation der T-Lymphozyten geführt haben (Clarke et al., 2000; Leitão et al., 2009). Dies könnte zu einer Vermehrungs-, Minimierungs- und Stabilisierungsphase der T-Zellpopulation geführt haben, was die Schwankungen in den BLI-Messungen erklären könnte. Die hochentwickelte CCD-Kamera des IVIS Lumina II ist zudem äußerst sensitiv, sodass die Messungen kleinste Schwankungen innerhalb der Lymphozytenpopulationen

abbilden. Diese Vermutung passt auch mit dem durchgehend unauffälligen klinischen Erscheinungsbild der Versuchstiere überein. Täglich wurden Verhalten, Futter- und Wasseraufnahme, Körperhaltung, Ernährungszustand, Pflegezustand, sowie die Ausscheidungen der Tiere durch einen Tierarzt adspektorisch beurteilt. Generell hängt die gemessene Intensität der biolumineszenten Strahlung aus den Versuchstieren auch mit dem Erfolg der Transduktion der Spenderzellen ab. Umso höher die Transduktionseffizienz ausfiel, desto mehr Spenderzellen haben eine oder mehrere Kopien des Virusgenoms in ihre DNS integriert und bildeten dementsprechend das Enzym Luciferase, welches unter Freisetzung von messbarem Licht das Substrat Luciferin umsetzten konnte (s. Abschnitt 6.3). Um die Transduktionseffizienz noch weiter zu verbessern, könnte man in zukünftigen Studien versuchen, den virushaltigen Überstand weiter aufzukonzentrieren, beispielsweise mit Retro-X$^{TM}$ Concentrator (Firma Takara, Clontech). Aber auch die Körpergröße und Körpermasse spielt in diesem Zusammenhang eine Rolle; je kleiner oder dünner die zu messende Maus ist, desto weniger Licht wird durch umliegende Organe, Muskulatur, Fett und Haut absorbiert und auch die Streustrahlung verringert sich. In unserem Versuch bestanden die einzelnen Gruppen daher stets aus gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Tieren um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erzeugen. Um den Stress zu verringern und den Tieren so wenig wie möglich Leid zu zumuten, könnte man in nachfolgenden Studien eventuell die Anzahl der Blutentnahmen reduzieren, da sich die Entstehung von Lymphomen nicht durch diese Untersuchungen beobachten lässt. Eine Möglichkeit wäre auch die IVIS-Messungen erst ab Woche 7 zu beginnen, da vorher kein Signal zu finden war, obwohl dies sicherlich auch von den Transduktionseffizienzen abhängen wird.

## 7.3 Nachweis der Tumorgenese NPM-ALK-positiver Lymphome anhand von Blutuntersuchungen

Im Abschnitt 6.2 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Fusionsonkogen NPM-ALK nicht im Blut der transplantierten Tiere wiedergefunden werden konnte, obwohl die Zellen in der BLI detektierbar waren und auch Lymphome entwickelt haben. Diese Beobachtungen wurden bereits in vorherigen Studien gemacht (Newrzela et al., 2012). Dabei wurden

Vektoren verwendet, welche neben dem Onkogen NPM-ALK das GFP-Gen kodierten. GFP konnte im Blut durchflusszytometrisch nur in geringem Maße gemessen werden, die intrazelluläre Färbung für den Marker NPM-ALK fiel gänzlich negativ aus. Erst nachdem ein Lymphom entstanden war, konnte im entsprechenden Organ GFP sowie NPM-ALK in größerer Menge nachgewiesen werden. Möglicherweise reicht die Anzahl an Lymphozyten in einer Blutprobe (maximal 50µl) für das intrazelluläre Färbeprotokoll nicht aus oder eventuell stellen die vielen Erythrozyten ein technisches Problem dar. Das FACS detektiert kleine Mengen an Zellen nicht sensitiv genug, um die Entstehung eines Lymphoms beobachten zu können und eignet sich als alleinige Methode daher nicht für diese Untersuchung. Aus einer Gewebeprobe hingegen, kann eine größere Anzahl von Lymphozyten untersucht und gefärbt werden, so dass NPM-ALK nachgewiesen werden kann. Die wahrscheinlichste Ursache für das fehlende Signal aus dem Blut ist, dass die transduzierten Zellen sich nach der Transplantation im Gewebe ansiedeln und weniger im Blut zirkulieren. Möglicherweise zeigen die transduzierten Zellen auch eine geringere Migrationsaktivität. Mithilfe der sensitiven Biolumineszenzbildgebung konnte gezeigt werden, dass die transduzierten Zellen die Empfängertiere erfolgreich repopulierten, desweiteren konnte die Entstehung von Lymphomen beobachtet werden, obwohl das Onkogen NPM-ALK vor der Entstehung eines Lymphoms nicht in signifikanter Menge im Blut nachgewiesen werden konnte. Die Spenderzellen, welche mit dem Kontrollgen T-Sapphire transduziert wurden hingegen, konnten sowohl im Blut, als auch in der Biolumineszenzmessung dargestellt werden. Allerdings konnte auch hier ein Zusammenhang mit der Transduktionseffizienz gesehen werden, da bei Tieren denen Spenderzellen transplantiert wurden, welche mit hoher Effizienz transduziert wurden, auch im Blut höhere T-Sapphire Werte gemessen werden konnten (s. Abschnitt 6.2, Abb. 16). Da die Tumorgenese von NPM-ALK-positiven Lymphomen mithilfe von Blutuntersuchungen jedoch nicht verfolgt werden kann, sind in vivo Bildgebungsverfahren, wie sie in der vorliegenden Arbeit dargestellt sind, von großem Nutzen.

## 7.4 Bedeutung des verwendeten Mausmodells

Im Abschnitt 6.5 konnte gezeigt werden, dass die soliden Lymphome aus unserem Mausmodell diverse Ähnlichkeiten, sowohl morphologischer, als auch immunophänotypischer Natur, mit dem humanen kleinzelligen ALK-positiven ALCL aufweisen. Obwohl die Lymphome, welche in unserem Mausmodell mithilfe retroviralen Gentransfers generiert wurden, nicht dem klassischen Bild des ALK-positiven ALCLs entsprachen, sondern dem des kleinzelligen ALK-positiven ALCL, konnten sowohl die kennzeichnenden „Hallmark-Zellen“ als auch die wichtigsten Marker der IHC in unserem Mausmodell wiedergefunden werden. Zellgröße und Morphologie der Tumorzellpopulationen wiesen ebenfalls starke Ähnlichkeiten auf (Abb. 32). Da die Tumorzellen in unserem Modell ausschließlich aus reifen T-Zellen entstanden, stimmten Lokalisation und Erscheinungsbild der Lymphome ebenfalls mit dem humanen Krankheitsbild überein (Swerdlow, 2008). Auch wenn die entstandenen Lymphome große Ähnlichkeiten mit den humanen ALCL-Fällen aufweisen, muss dennoch hinterfragt werden, ob Rag-1-defiziente Mäuse als Empfängertiere ideal geeignet sind. Diesen Tieren fehlt das Rag-1-Gen, welches für die Aktivierung der V(D)J-Rekombination verantwortlich ist, sodass sie weder T- noch B-Zellen ausbilden (Mombaerts et al., 1992). Dadurch fehlt den transplantierten Zellen das Mikromilieu, welches durch die Wechselwirkungen mit anderen Lymphozyten entsteht. Gleichzeitig wird aber eine Beobachtung der transplantierten Zellen ohne die Einflüsse, die durch die Stimulation und Konkurrenz mit anderen Lymphozyten entstehen würden, möglich. Die Transplantation TCR-monoklonaler T-Lymphozyten (OT-1-Spenderzellen) spiegelt einen Patienten mit Expression eines starken Onkogens in T-Zellen, ohne klonale Kompetition wieder. Die präleukämischen Klone können also konkurrenzlos stimulatorische Nischen besetzten und auswachsen (Newrzela et al., 2008). Obwohl die progressive Schwächung des Immunsystems bei älteren Menschen vermutlich ebenfalls mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist, da Gedächtniszellen vermehrt verloren gehen, die Diversität der T-Lymphozyten und somit auch die Kontrolle über präleukämische Klone abnimmt, bleibt das Rag-1-Mausmodell dennoch weit von der Situation eines geriatrischen oder immungeschwächten Patienten entfernt (Caruso et al., 2009; Pawelec et al., 2010). Wie in vorherigen Studien dieser Arbeit bereits diskutiert wurde (Newrzela, 2008), sollte auch erwähnt werden, dass im hier verwendeten Modell, ausschließlich CD8-positive T-

Gedächtniszellen untersucht wurden. Die Konvertierung der naiven T-Zellen zu Gedächtniszellen geschieht durch die Stimulation der Zellen während der Kultivierung ex vivo mit dem OVA-Peptid. Dadurch ist es nicht möglich, das Verhalten naiver T-Lymphozyten zu beobachten. Andererseits ähnelt das verwendete Transduktionsprotokoll den meisten auf gammaretroviralem Gentransfer basierenden Gentherapie-Studien (Lum et al., 2001; Levine et al., 2002; Garlie et al., 1999). NPM-ALK transgenen Mausmodellen (Jäger et al., 2005; Chiarle et al., 2003) hat das vorgestellte Modell jedoch voraus, dass ausschließlich reife T-Zellen transformiert werden. In transgenen Versuchstiermodellen erfolgt die Expression des Fusionsonkogens NPM-ALK bereits in unreifen T- (und teilweise B-) Zellen. Daraus entwickeln sich die unterschiedlichsten Lymphomarten, wie beispielsweise Plasmazelltumore, lymphoblastische B-Zell-Lymphome und lymphoblastische Thymuslymphome vom T-Zelltyp (Chiarle et al., 2003; Jäger et al., 2005; Giuriato et al., 2010). Im Menschen entstehen ALK-positive ALCLs aus reifen T-Lymphozyten, welche den Thymus bereits verlassen haben, sodass die Tumore in peripheren lymphatischen oder auch nicht-lymphatischen Organen erscheinen. Die ALK-positiven Lymphome, welche in den transgenen Mausmodellen generiert werden, durchlaufen also nicht die selbe Tumorgenese wie die Zellen im Menschen und es entstehen häufig andere Tumorarten (Lange et al., 2003; Cotta & Hsi, 2008). Auch wenn die Daten aus unserem Modell nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind, so geben sie doch wichtige Hinweise zur Erforschung der T-Zell-Lymphome und können eine Grundlage für weiterführende Experimente sein. Außerdem eignet sich die BLI auch hervorragend um mögliche Therapieansätze zu untersuchen (Edinger et al., 2003).

## 7.5 Veterinärmedizinische Lymphom-Klassifizierungen und Etablierung der immunhistochemischen Darstellung von CD8-positiven T-Lymphozyten

Im Abschnitt 6.6 konnten viele Parallelen zwischen dem humanen kleinzelligen ALK-positiven ALCL und den von uns untersuchten malignen Rundzelltumoren von Hunden und Katzen im Bezug auf Zellgröße, Morphologie, Verteilung und Immunophänotyp,

aufzeigen. Im Rahmen der modifizierten WHO-Klassifizierung ist das ALCL beim Hund eine anerkannte Erkrankung (Valli, 2002; Jubb, Kennedy, Palmer, 2015). Es sind Fälle von T-Zell-Lymphomen in Hunden und Katzen bekannt, die morphologisch mit den Kriterien für humane ALCLs übereinstimmten, ebenso ihr biologisches Verhalten (Sueiro et al., 2004; Ponce et al., 2010). Meist werden die ALCLs bei Hunden und Katzen anhand ihrer Verteilung in primär kutane oder primär systemische ALCLs unterteilt (Valli, 2007). Die hier erwähnten ALCL-Fälle von Hunden und Katzen gleichen dem klassischen Bild des humanen ALK-positiven ALCL (Valli, 2007; Abb. 37 im Anhang). Bisher wurde keine weitere Einteilung in die kleinzellige Variante des ALCL unternommen. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen dem humanen kleinzelligen ALK-positiven ALCL und den in dieser Studie untersuchten malignen Rundzelltumoren von Hunden und Katzen, könnte es sinnvoll sein, die kleinzellige Variante des ALCLs in der veterinärmedizinischen Lymphom-Klassifizierung mit zu berücksichtigen. Um diese These zu verifizieren, sollten weitere Studien, mit größeren Fallzahlen folgen.

Bereits in früheren Studien wurde versucht CD8-positive T-Lymphozyten immunhistochemisch in paraffineingebetteten lymphatischen Geweben von Kleintieren darzustellen (Althoff, 2012), bisher blieben diese Versuche leider erfolglos. In der vorliegenden Arbeit ist es nun gelungen, eine immunhistochemische Darstellung von CD8-positiven T-Lymphozyten auf formalinfixiertem, paraffineingebettetem, lymphatischen Organmaterial von Mäusen und vereinzelt auch Hunden zu etablieren. Verwendet wurde hierzu ein polyklonaler Kaninchenantikörper, welcher mithilfe spezieller Vorbehandlungen an das Maus- und Hundegewebe binden konnte (s. Abschnitt 5.3.5). Anhand der Lokalisation und Morphologie der angefärbten Zellen, kann man von einer spezifischen Färbung von CD8-positiven T-Zellen ausgehen (persönliche Mitteilung, PD Dr. Hartmann). Dennoch stellt sich auch eine leichte unspezifische Hintergrundfärbung dar, an deren Korrektur weiter gearbeitet werden muss. Für Hunde sollte die Färbung mit einer größeren Fallzahl an lymphatischen Geweben ausgetestet und perfektioniert werden. Für die veterinärmedizinische Diagnostik spielt die Färbung der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in Zukunft eventuell eine immer größere Rolle, desto mehr therapeutische Ansätze entwickelt werden. Auch zu Forschungszwecken kann es von großem Nutzen sein, immunhistochemisch zwischen T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen unterscheiden zu können. Die immunhistochemische Darstellung von ALK und

CD30 gelang an den histologischen Präparaten von Hunden und Katzen nicht. Es ist aber auch noch gänzlich unerforscht, ob die humanen Tumormarker in der Veterinärmedizin überhaupt eine Rolle spielen und ähnliche Translokationen für die Tumorgenese verantwortlich sind. Zu diesem Zweck könnten genetische Untersuchungen der Tumorgewebe von Hunden und Katzen Aufschluss geben. Fraglich ist auch, ob die Tumorzellen tatsächlich CD3- und CD8-positiv sind oder ob nicht das Begleitinfiltrat angefärbt wurde. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass T-Zell-Marker wie CD3, während der Tumorgenese von reifen T-Zell Lymphomen (engl. *Mature T Cell Lymphoma*, MTCL) verloren gehen oder runter reguliert werden (Newrzela et al., 2008; Newrzela et al. 2012). Um zu überprüfen, ob es sich bei den CD3-positiven T-Zellen in den histologischen Präparaten der Mäuse tatsächlich auch um die Tumorzellen handelt, sollten daher in weiterführenden Studien Doppelfärbungen mit NPM-ALK stattfinden.

# 8. Schlussbetrachtung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Repopulationsdynamiken, sowie das biologische Verhalten und die Verteilung von reifen TCR-monoklonalen T-Zellen aus OT-1 Spendermäusen während einer Lymphopenie-induzierten Proliferation zu charakterisieren und in vivo darzustellen. Um dies zu ermöglichen, sollte das bereits etablierte T-Zell Transplantationsmodell der Arbeitsgruppe Newrzela (Newrzela et al., 2012) weiterentwickelt und durch die Methode der biolumineszenten Bildgebung erweitert werden. Die Beobachtung der Repopulierung der Zellen ist sowohl mithilfe von Blutuntersuchungen, als auch der Biolumineszenzmessungen gelungen. Es konnte beobachtet werden, dass die transduzierten Lymphozyten sich überwiegend in der Milz und den Mesenteriallymphknoten ansiedelten und die lymphopenischen Empfängertiere innerhalb weniger Wochen erfolgreich repopulierten.

Des Weiteren sollte eruiert werden, inwiefern das Einbringen des Onkogens NPM-ALK die Homöostase dieser transplantierten T-Zellen verändert bzw. welche Populationsdynamik während der Lymphomgenese reifer T-Zellen zu beobachten ist. Bei zwei Tieren konnte die Entstehung von soliden Lymphomen in vivo beobachtet werden. Die Latenzzeiten unterschieden sich, was eventuell mit den unterschiedlichen Transduktionseffizienzen zusammen hing. Die Lokalisationen der Tumore in beiden Mäusen waren jedoch auffallend ähnlich; es konnten je zwei Tumore in der Milz und dem linken Knielymphknoten nachgewiesen werden. In nachfolgenden Studien sollte der Versuch mit einer größeren Anzahl von Mäusen wiederholt werden um herauszufinden, ob es sich bei dieser Beobachtung um einen Zufall handelt oder ob die transduzierten T-Zellen eventuell eine Affinität zu den genannten Lokalisationen aufweisen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die artifiziell erzeugten ALK-positiven Lymphome aus dem Mausmodell mit den äquivalenten humanen ALK-positiven T-Zell-Lymphomen zu verglichen, um den Nutzen für weitere Forschungsarbeiten zu verifizieren. Dabei konnte eine immunhistochemische Färbung für CD8, den Marker zytotoxischer T-Zellen, auf formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe etabliert werden und festgestellt werden, dass die Lymphome aus dem Mausmodell sowohl morphologisch, als auch immunhistochemisch stärker der kleinzelligen Variante des humanen ALK-positiven ALCL ähneln, als der klassischen Variante. Ebenso konnten Parallelen zwischen der kleinzelligen Variante des humanen ALK-positiven ALCL und bestimmten Rundzelltumoren von Hunden

und Katzen hergestellt werden. Auch diese Beobachtungen sollten mit größeren Fallzahlen weiter untersucht werden und könnten in Zukunft eventuell zu einer Subklassifizierung von ALCLs bei Hunden und Katzen führen.

# 9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| ALCL | *Anaplastic Large Cell Lymphoma* (deut. Anaplastisch großzelliges Lymphom) |
| ALK | Anaplastische Lymphomkinase |
| APC | *Antigen-presenting cell* (deut. Antigenpräsentierende Zelle) |
| BLI | *Bioluminescence Imaging* (deut. biolumineszente Bildgebung) |
| CD | *Cluster of differentiation* (deut. Unterscheidungsgruppen) |
| cDNS | Komplementäre DNS |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | *Ethylendiamintetraacetat* (deut. Ethylendiamintetraessigsäure) |
| Env | *Envelope* (deut. Hüllprotein) |
| FACS | *Fluorescence-activated Cell Sorting* (deut. Durchflusszytometrie) |
| Gag | Gruppenspezifische Antigene |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| H.E. | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| LB | *Lysogeny broth* (Nährmedium) |

| | |
|---|---|
| LTR | *Long Terminal Repeat* |
| MHC | *Major Histocompatibility Complex* (deut. Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| NPM | Nucleophosmin |
| OVA | Ovalbumin |
| PBS | Phosphate buffered saline (deut. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) |
| Pol | Polymerase |
| ROI | *Region of Interest* (deut. Bereich von Interesse) |
| Rpm | *Rounds per minute* (deut. Umdrehungen pro Minute) |
| TCR | *T cell receptor* (deut. T-Zell-Rezeptor) |
| TH-Zelle | T-Helferzelle |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| WT | Wildtyp |

# 10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 T-Zell-Rezeptor-Komplex ..... 10
Abb. 2 Klassisches ALK-positives ALCL ..... 19
Abb. 3 Atypisches, kleinzelliges ALK-positives ALCL ..... 20
Abb. 4 Immunhistochemie zum Nachweis von ALK und CD30 ..... 21
Abb. 5 Histologische Präparate von ALCL-Fällen bei Hunden ..... 25
Abb. 6 Schematische Darstellung eines Retrovirus ..... 26
Abb. 7 Schema eines retroviralen Vektors ..... 29
Abb. 8 Vereinfachte Darstellung der Versuchsplanung (1) ..... 37
Abb. 9 Vereinfachte Darstellung der Versuchsplanung (2) ..... 38
Abb. 10 Verwendete gammaretrovirale Vektoren ..... 39
Abb. 11 Bestimmung der Zellgröße ..... 56
Abb. 12 IVIS Lumina II ..... 57
Abb. 13 IVIS Lumina II ..... 58
Abb. 14 Durchflusszytometrische Analyse der OT-1 Spenderzellen ..... 61
Abb. 15 Analyse der transduzierten OT-1 Spenderzellen ..... 62
Abb. 16 Blutanalyse der Kontrollgruppe 1 ..... 63
Abb. 17 Blutanalyse der Kontrollgruppen 2 und 3 ..... 64
Abb. 18 Blutanalyse der Kontrollgruppen 1-3 ..... 65
Abb. 19 Blutanalysen der Onkogengruppen 1 und 2 ..... 66
Abb. 20 Region of Interest (ROI) in der BLI-Messung ..... 67
Abb. 21 Exemplarische BLI-Messung von Kontrollmaus 3 ..... 68
Abb. 22 BLI Ganzkörpermessung von Maus 3 und Maus 17 ..... 70
Abb. 23 Mittlere BLI-Messwerte der Kontrollgruppen 1, 2 und 3 ..... 71
Abb. 24 BLI-Ganzkörpermessungen der Kontrollmaus 8 ..... 71
Abb. 25 BLI-Ganzkörpermessung der Kontrollmäuse 3 und 13 ..... 72
Abb. 26 BLI der Einzelregionen der Kontrollgruppe 1 ..... 73
Abb. 27 BLI-Einzelmessungen der Kontrollgruppen 2 und 3 ..... 74
Abb. 28 BLI-Ganzkörpermessungen der Onkogengruppen 1 und 2 ..... 76
Abb. 29 Organe der Onkogenmaus 26 ..... 77
Abb. 30 BLI- Einzelmessungen der Mäuse 6 und 26 ..... 78

Abb. 31 Maximale Strahlungsintensitäten ..... 79
Abb. 32 ALK-positives Lymphom in der Maus (H.E.) ..... 80
Abb. 33 Durchschnittliche Tumorzellgröße ..... 81
Abb. 34 IHC der histologischen Präparate von Mäusen (Milz) ..... 83
Abb. 35 Rundzelltumor eines Hundes ..... 84
Abb. 36 IHC der histologischen Präparate von Hund und Katze ..... 85
Abb. 37 IHC der histologischen Präparate von Wildtyp-Mäusen ..... 117

# 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Antikörper ..... 32
Tabelle 2 Plasmide und Vektoren ..... 33
Tabelle 3 Enzyme und Größenstandards ..... 33
Tabelle 4 Peptide und Zytokine ..... 33
Tabelle 5 Zelllinien und primäre Zellen ..... 34
Tabelle 6 Mausmodelle ..... 34
Tabelle 7 Versuchsmäuse ..... 35
Tabelle 8 Calciumphosphat-Präzipitations-Methode ..... 44
Tabelle 9 Immunhistochemische Färbeprotokolle (1) ..... 54
Tabelle 10: Versuchstiergruppen ..... 63
Tabelle 11 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Kontrollgruppe 1 ..... 118
Tabelle 12 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Kontrollgruppe 1 ..... 119
Tabelle 13 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Kontrollgruppe 2 ..... 120
Tabelle 14 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Kontrollgruppe 2 ..... 121
Tabelle 15 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Kontrollgruppe 3 ..... 122
Tabelle 16 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Kontrollgruppe 3 ..... 123
Tabelle 17 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Onkogengruppe 1 ..... 124
Tabelle 18 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Onkogengruppe 1 ..... 125
Tabelle 19 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Onkogengruppe 2 ..... 126
Tabelle 20 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Onkogengruppe 2 ..... 127
Tabelle 21 Chemikalien und Lösungen ..... 128
Tabelle 22 Medien und Puffer ..... 129
Tabelle 23 Geräte ..... 130
Tabelle 24 Verbrauchsmaterialien ..... 131
Tabelle 25 Verwendete Kits ..... 132
Tabelle 26 Tierexperimentelle Materialien ..... 132

# 12. Literaturverzeichnis

Adam, P., Berneburg, M., Bleif, M., Böttcher, S., Gäckle, R., & Weisel, K. (2011). *Maligne Lymphome.* Schriftenreihe „Therapieempfehlungen“ des Südwestdeutschen Tumorzentrums, München: Celgene GmbH.

Althoff, G. A. J. (2012). *Untersuchung zur immunhistologischen Darstellung von CD8+ T-Lymphozyten in paraffineingebettetem, lymphatischem Gewebe der Katze*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

Aupperle, H., Laik, C., Schäffner, J., Staudacher, M., Kehl, A., Loesenbeck, G. (2012). Pathologie der Rundzelltumore – Unterschiede bei Hund und Katze. *Der Praktische Tierarzt*, 93, 782-793.

Battegay, E. (2013). *Siegenthalers Differenzialdiagnose: Innere Krankheiten - vom Symptom zur Diagnose*. Stuttgart: Thieme Verlag.

Baum, C., et al. (2006 b). Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Molecular Therapy*, 13 (6), 1050-1063.

Baumgärtner, W., Gruber, A., D. (2015). *Spezielle Pathologie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke Verlag.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2012). *Biochemie.* Heidelberg: Springer Verlag.

Bergmann, M. (2011). *Lebensqualität und Lebenserwartung am malignen Lymphom erkrankter Hunde unter Chemotherapie – eine Besitzerumfrage*. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München, Deutschland.

Breugelmans, S., Van den Broeck, W., Demeyere, K., Meyer, E., Simoens, P. (2011). Immunoassay of lymphocyte subsets in ovine palatine tonsils. *Acta Histochemica*, 113, 416-422.

Brikell, P. M. (1992). The p60c-src family of protein-tyrosine kinases: structure, regulation, and function. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 3 (4), 401-446.

Broussard, D. R., Mertz, J. A., Lozano, M., Dudley, J. P. (2002). Selection for c -myc Integration Sites in Polyclonal T-Cell Lymphomas. *Journal of Virology,* 76 (5), 2087–2099.

Caruso, C. et al. (2009). Mechanisms of immunosenescence. *Immunity and Ageing*, 6 (1), 10.

Cereseto, A., Giacca, M. (2004). Integration site selection by retroviruses. *AIDS Review*, 6, 13-21.

Chiarle, R., Gong, J. Z., Guasparri, I., Pesci, A., Cai, J., Liu, J., Simmons, W.J., Dhall, G., Howes, J., Piva, R., Inghirami, G. (2003). NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumor. *Blood,* 101 (5), 1919–1927.

Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8 (1), 11–23.

Chiu, B. C.-H., Dave, B. J., Blair, A., Gapstur, S. M., Zahm, S. H., Weisenburger, D. D. (2006). Agricultural pesticide use and risk of t(14; 18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Blood,* 108 (4), 1363–1370.

Comazzi, S., Gelain, M. E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagndsosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal*, 188 (2), 149–155.

Connolly, J., B. (2001). Lentiviruses in gene therapy clinical research. *Gene Therapy*, 9 (24), 1730-1734.

Corcoran, L. M., Adams, J. M., Dunn, A. R., Gory, S. (1984). Murine T Lymphomas in Which the Cellular myc Oncogene Has Been Activated by Retroviral Insertion. *Cell*, 37, 113–122.

Cotta, C. V, Hsi, E. D. (2008). Pathobiology of mature T-cell lymphomas. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, 8 (5), 168–179.

Day, M. J. (2005). *Atlas der klinischen Immunologie bei Hund und Katze*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft.

Day, M. J., Henderson, S. M., Belshaw, Z., Bacon, N. J. (2004). An immunohistochemical investigation of 18 cases of feline nasal lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*, 130, 152–161.

De Leval, L., Gaulard, P. (2011). Tricky and terrible T-cell tumors: these are thrilling times for testing: molecular pathology of peripheral T-cell lymphomas. *American Society of Hematology,* 336–343.

Duplantier, M. M., Lamant, L., Sabourdy, F., de Reynies, A., Delsol, G., Espinos, E. (2006). Serpin A1 is overexpressed in ALK+ anaplastic large cell lymphoma and its expression correlates with extranodal dissemination. *Leukemia*, 20 (10), 1848–1854.

Edinger, M., Cao, Y., Verneris, M. R., Bachmann, M. H., Contag, C. H., Negrin, R. S. (2003). Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood,* 101 (2), 640–648.

Fisher, D. J., Naydan, D., Werner, L. L., *Moore, P. F*. (1995). Immunophenotyping of lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples. *Veterinary Clinical Pathology*, 24 (4), 118-123.

Foss, H.-D., Marafioti, T., Stein, H. (2000). Die vielen Gesichter des anaplastischen großzelligen Lymphoms. *Der Pathologe*, 21, 124–136.

Fournel-Fleury, C., Magnol, J. P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, P. A., Felman, P. (1997). Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Comparative Pathology,* 117 (1), 35-59.

Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, a, Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J.L., Goy-Thollot, I., Ledieu D., Ghernati, I., Magnol, J. P. (2002). Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Veterinary Pathology*, 39 (1), 92–109.

Galkin, A., Melnick, J. S., Kim, S, Hood, T. L., Li, N., Xia, G., Steensma, R., Chopiuk, G., Jiang, J., Wan, Y., Ding, P., Liu, Y., Sun, F., Schultz, P. G., Gray, N. S. Warmuth, M. (2006). Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (1), 270-275.

Garlie, N. K., et al. (1999). T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer. *Journal of Immunotherapy*, 22 (4), 336-345.

Gascoyne, B. R. D., Aoun, P., Wu, D., Chhanabhai, M., Skinnider, B. F., Greiner, T. C., Morris, S. W., Connors, J. M., Vose, J. M., Viswanatha, D. S., Coldman, A. Weisenburger, D. D. (1999). Prognostic Significance of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Protein Expression in Adults With Anaplastic Large Cell Lymphoma, *Blood,* 93 (11), 3913–3921.

Giuriato, S., Foisseau, M., Dejean, E., Felsher, D. W., Al Saati, T., Demur, C., Ashraf Ragab, A., Kruczynski, A., Schiff, C., Delsol, G., Meggetto, F. (2010). Conditional TPM3-ALK and NPM-ALK transgenic mice develop reversible ALK-positive early B-cell lymphoma/leukemia. *Blood*, 115 (20), 4061–4070.

Guija de Arespacochaga, a, Schwendenwein, I., Weissenböck, H. (2007). Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *Journal of Comparative Pathology*, 136, 186–192.

Hacein-Bey-Abina, S., et al. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (9), 3132-3142.

Hahn, K. A., Richardson, A. C., Hahn, E. A. et al. (1994). Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. *Veterinary Pathology*, 31, 528–540.

Hayes, H. M., Tarone, R. E., Cantor, K. P. (1995). On the association between canine malignant lymphoma and opportunity for exposure to 2,4–dichlorphenoxyacetic acid. *Environmental Reserach*, 70, 119–125.

Hiddemann, W., Bartram, C. R. (2010). *Die Onkologie Teil 1 und Teil 2*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

Hiddemann, W., Dreyling, M., Stein, H. (2004). *Lymphome*. Stuttgart: Thieme Verlag.

Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances oft he absorbent glands ans spleen. *Medico-Chirurgical Transactions*, 17, 68-114.

Huppa, J. B., Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*, 3 (12), 973–983.

Huttner, N., A., et al. (2003). Analysis of site-specific transgene integration following cotransduction with recombinant adeno-associated virus and a rep encodingplasmid. *Journal of General Internal Medicine*, 5 (2), 120-129.

Iii, H. C. M., Anver, M. R., Fredrickson, T. N., Haines, D. C., Harris, A. W., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Kogan, S. C., MacLennan, I. C. M., Pattengale, P. K., Ward, J. M. (2002). Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood,* 100 (1), 246–258.

Ivics, Z., et al. (2007). Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells. Molecular Therapy, 15 (6), 1137-1144.

Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., Mori, S., Ratzkin, B., Yamamoto, T. (1997). Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*, 97 (14), 439-449.

Jacobi, B., Partovi, S. (2011). *Molekulare Zellbiologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag.

Jarrett, W. F., Crawford, E. M., Martin, W. B., Davie, F. (1964). Leukemia in a Cat: A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature*, 202, 567-569.

Jäger, R., Hahne, J., Jacob, A., Egert, A., Schenkel, J., Wernert, N., Schorle, H., Wellmann, A. (2005). Mice Transgenic for NPM-ALK Develop Non-Hodgkin Lymphomas. *Anticancer Research*, 25, 3191–3196.

Jubb, Kennedy, Palmer (2015). *Pathology of Domestic Animals: Volume 3.* St. Louis: Elsevier Verlag.

Kassiotis, G., R. Zamoyska, B. Stockinger (2003). Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(8), 1007-1016.

Kieper, W. C., J.T. Burghardt, C.D. Surh (2004). A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *Jounal of Immunology*, 172(1), 40-4.

Kinney, M.C., Higgins, R. A., Medina, E. A. (2011). Anaplastic Large Cell Lymphoma: 25 Years of Discovery. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine,* 130, 19–43.

Kiupel, M., Teske, E., Bostock, D. (1999). Prognostic Factors for Treated Canine Malignant Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 36, 292–300.

Klapproth, K., Wirth, T. (2010). Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *British Journal of Haematology*, 149 (4), 484–497.

Koonin, E. V., Krupovic, M. (2014). Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nature Reviews Genetics*, published online, 1-9.

Kumar, M., et al. (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Human Gene Therapy*, 12 (15), 1893-905.

Lange, K., Uckert, W., Blankenstein, T., Nadrowitz, R., Bittner, C., Renauld, J.-C., van Snick, J., Feller, A. C., Merz, H. (2003). Overexpression of NPM-ALK induces different types of malignant lymphomas in IL-9 transgenic mice. *Oncogene*, 22 (4), 517–527.

Leitão, C., Freitas, A. a., Garcia, S. (2009). The role of TCR specificity and clonal competition during reconstruction of the peripheral T cell pool. *Journal of Immunology*, 182 (9), 5232–5239.

Levine, B. L., et al. (2002). Adoptive transfer of costimulated CD4+ T cells induces expansion of peripheral T cells and decreased CCR5 expression in HIV infection. *Nature Medicine*, 8 (1), 47-53.

Liess, B., Moennig, V., Haas, L. (2010). *Virusinfektionen von Haus- und Nutztieren.* Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft.

Louwerens, M., London, C. a., Pedersen, N. C., Lyons, L. a. (2005). Feline Lymphoma in the Post–Feline Leukemia Virus Era. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19 (3), 329-335.

Lum, L. G., et al. (2001). Immune modulation in cancer patients after adoptive transfer of anti-CD3/anti-CD28-costimulated T cells-phase I clinical trial. *Journal of Immunotherapy*, 24 (5), 408-419.

Lutz, H., Kohn, B., Forterre, F. (2014). *Krankheiten der Katze*. Stuttgart: Enke Verlag.

Macchiarini, F., Manz, M. G., Palucka, A. K., Shultz, L. D. (2005). Humanized mice : are we there yet?. *Journal of Experimental Medicine*, 202 (10), 1307–1311.

Marconato, L., Gelain, M. E., Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma : a review. *Hematological Oncology*, 31, 1-9.

Marshall, E. (1999). Gene Therapy Death Prompts Review of Adenovirus Vector. *Science*, 286 (5448), 2244-2245.

McGavin, M. D., Zachary, J. F. (2009). *Pathologie der Haussäugetiere – Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag.

Miller, A. D., et al. (1993). Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods in Enzymology*, 217, 581-599.

Min, B., Paul, W. E. (2005). Endogenous proliferation: burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings. *Seminars in Immunology*, 17(3), 201-207.

Mischke, R. (2003). *Praktische Hämatologie bei Hund und Katze*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft.

Modiano, J. F., Breen, M., Burnett, R. C., Parker, H. G., Inusah, S., Thomas, R., Avery, P. R., Lindblad-Toh, K., Ostrander, E. A., Cutter, G. C., Avery, A. C. (2005). Distinct B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence among Dog Breeds Indicates Heritable Risk. *Cancer Research*, 65 (13), 5654–5662.

Mora, J. R., von Andrian, U. H. (2006). T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends in Immunology*, 27 (5), 235–243.

Moreno, S.N. (2006). *Die Behandlung des caninen malignen Lymphoms : Vergleich der Effektivität zweier Chemotherapie-Protokolle*. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland.

Morris, S. W., Naeve, C., Mathew, P., James, P. L., Kirstein, M. N., Cui, X., Witte, D. P. (1997). ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2; 5) in non-Hodgkins lymphoma , encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*, 14, 2175-2188.

Mossé, Y. P., Wood, A., Maris, J. M. (2009). Inhibition of ALK Signaling for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 15 (18), 5609-5614.

Murphy, K., M., Travers, P., Walport, M. (2008). *Janeway´s Immunobiology*. New York: Taylor & Francis Group.

Naldini, L., et al. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272 (5259), 263-267.

Newrzela, S., Al-Ghaili, N., Heinrich, T., Petkova, M., Hartmann, S., Rengstl, B., Kumar, A., Jäck, H. M., Gerdes, S., Roeder, I., Hansmann, L.-M., von Laer, D. (2012). T-cell receptor diversity prevents T-cell lymphoma development. *Leukemia*, 26 (12), 1-9.

Newrzela, S., Cornils, K., Li, Z., Baum, C., Brugman, M. H., Hartmann, M., Meyer, J., Hartmann, S., Hansmann, M.-L., Fehse, B., von Laer, D. (2008). Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood*, 112 (6), 2278–2286.

Newrzela, S. (2008). *Resistenz polyklonaler, reifer T-Zellen gegenüber der Transformation durch retrovirale Transduktion.* Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt, Deutschland.

Odoardi, F., Sie, C., Streyl, K., Ulaganathan, V., K., Schläger, C., Lodygin, D., Heckelsmiller, K., Nietfeld, W., Ellwart, J., Klinkert, W., E., F., Lottaz, C., Nosov, M., Brinkmann, V., Spang, R., Lehrach, H., Vingron, M., Wekerle, H., Flügel-Koch, C., Flügel, A. (2012). T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature*, 488, 675-679.

Parodi, A. L. (2001). Classification of Malignant Lymphoma in Domestic Animals : History and Conceptual Evolution. *European Journal of Veterinary Pathology*, 7 (2), 43–50.

Pawelec, G., Derhovanessian, E., Larbi, A. (2010). Immunosenescence and cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology,* 75 (2), 165-172.

Peter, H.-H., Pichler, W. J., Müller-Ladner, U. (2012). *Klinische Immunologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag.

Pohlman, L. M., Higginbotham, M. L., Welles, E. G., Johnson, C. M. (2009). Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Veterinary Pathology*, 46 (2), 259–268.

Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M. L., Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Veterinary Pathology*, 47 (3), 414–433.

Rink, L., Kruse, A., Haase, H. (2012). *Immunologie für Einsteiger*. Berlin: Springer Verlag.

Roessner, A., Pfeifer, U., Müller-Hermelink, H. K. (2008). *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag.

Rous, P. (1983). Transmission of a Malignant New Growth by Means of a Cell-Free Filtrate. *The Journal of American Medical Association,* 250 (11), 1445-1446.

Sambrook, J., et al. (1968). The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *PNAS*, 60(4), 1288-1295.

Schneider, R. (1983). Comparison of Age- and Sex-Specific Incidence Rate Patterns of the Leukemia Complex in the Cat and the Dog. *Journal of the National Cancer Institute*, 70 (5), 971–977.

Schödel, F., Hahn, B., Hübner, R., Hochstein-Mintzel, V. (1986): Transmission of bovine leukemia virus (BLV) to immunocompromised monkeys: evidence for persistent infection. *Microbiologica,* 9 (2), 163–172.

Shih, C. C., Stoye, J. P., Coffin, J. M. (1988). Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell,* 53, 531-537.

Sprent, J., Surh, C.D. (2002). T cell memory. *Annual Review of Immunology* 20, 551–579.

Starr, T. K., Jameson, S. C., Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual Review of Immunology*. 21, 139–176.

Stein, H., Mason, D. Y., Gerdes, J., O´Connor, N. O., Wainscoat, J., Gatter, K., Falini, B., Delsol G., Lemke, H., Schwarting, R., Lennert, K. (1985). The Expression of 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,* 66 (4), 848–858.

Sueiro, F. a R., Alessi, A. C., Vassallo, J. (2004). Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. *Journal of Comparative Pathology*, 131 (2-3), 207–213.

Suntz, M. (2007). *Bedeutung latenter Infektionen mit dem felinen Leukämievirus (FeLV).* Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

Surh, C.D., Sprent, J. (2005). Regulation of mature T cell homeostasis. *Seminars in Immunpathology*. 17, 183–191.

Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. W. (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC Press).

Terry, A., Fulton, R., Stewart, M., Onions, D. E., Neil, J. C. (1992). Pathogenesis of Feline Leukemia Virus T17 : Contrasting Fates of Helper, v-myc, and v-tcr Proviruses in Secondary Tumors. *Journal of Virology*, 66 (6), 3538–3549.

Teske, E. (1994). Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Veterinary Quarterly*, 16, 209–219.

Teske, E., Wisman, P., Moore, P. F., van Heerde, P. (1994). Histological classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas. Unexpected high frequency of T-cell lymphomas with B-cell morphology. *Experimental Hematology*, 22 (12), 1179–1187.

Thomas, R., Seiser, E. L., Motsinger-Reif, A., Borst, L., Valli, V. E., Kelley, K., Suter, S. E., Argyle, D., Burgess, K., Bell, J., Lindblad-Thoh, K., Modiano, J. F., Breen, M. (2011). Refining tumor-associated aneuploidy through "genomic recoding" of recurrent DNA copy number aberrations in 150 canine non-Hodgkin lymphomas. *Leukemia & Lymphoma*, 52 (7), 1321–1335.

Troy, A. E., H. Shen (2003). Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *Journal of Immunology*, 170(2), 672-676.

Tsatsanis, C., Fulton, R., Nishigaki, K., Tsujimoto, H., Levy, L., Terry, A., Spandidos, D., Onions, D., Neil, J. C. (1994). Genetic Determinants of Feline Leukemia Virus-Induced Lymphoid Tumors : Patterns of Proviral Insertion and Gene Rearrangement. *Journal of Virology,* 68 (12), 8296–8303.

Valli, V. E., Jacobs, R. M., Norris, a., Couto, C. G., Morrison, W. B., McCaw, D., Cotter, M., Ogilvie, G., Moore, A. (2000). The Histologic Classification of 602 Cases of Feline Lymphoproliferative Disease using the National Cancer Institute Working Formulation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12 (4), 295–306.

Valli, V. E., Jacobs, R. M., Parodi, A. L. (2002): *Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals (WHO International Classification of Tumors of Domestic Animals)*. Maryland: American Registry of Pathology (ARP PRESS).

Valli, V. E., Kass, P. H., San Myint, M., Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary Pathology*, 50 (5), 738–748.

Valli, V. E., San Myint, M., Barthel, a, Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E. J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H., Vernau, W. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology*, 48 (1), 198–211.

Van Vechten, M., Helfland, S. C., Jeglum, K. A. (1990). Treatment of relapsed canine lymphoma with doxorubicin and dacarbazine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4, 187–191.

Vernau, W., Moore, P. F. (1999). An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69 (2-4), 145–164.

Vezzali, E., Parodi, a L., Marcato, P. S., Bettini, G. (2009). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8 (1), 38–49.

Wang, F., Tian, Z., Wie, H. (in press). Genomic expression profiling of NK cells in health and disease. *European Journal of Immunology.*

Warner, K., Crispatzu, G., Al-Ghaili, N., Weit, N., Florou, V., You, M. J., Newrzela, S., Herling, M. (2013). Models for mature T-cell lymphomas--a critical appraisal of experimental systems and their contribution to current T-cell tumorigenic concepts. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88 (3), 680–695.

Weiss, A. Th. A. (2007). *Untersuchungen zur Charakterisierung des felinen T-Zell-Rezeptors* γ. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

Weiss, A. Th. A., Klopfleisch, R., Gruber, A. D. (2011). T-cell receptor γ chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*, 144 (2-3), 123–134.

Wilkerson, M. J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garrett, L., Barber, L., Avery, A. (2005). Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106 (3-4), 179–196.

Willmann, M. Müllauer, L., Guija de Arespacochaga, A., Reifinger, M., Mosberger, I., Thalhammer, J. G. (2009). Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128 (4), 359-365.

Woodland, D. L., Kohlmeier, J. E. (2009). Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, 9 (3), 153–161.

Yang, L., Yu, Y., Kalwani, M., Tseng, T.-W. J., Baltimore, D. (2011). Homeostatic cytokines orchestrate the segregation of CD4 and CD8 memory T-cell reservoirs in mice. *Blood*, 118 (11), 3039–3050.

Zamo, A., Chiarle, R., Piva, R., Howes, J., Fan, Y., Chilosi, M., Levy, D. E., Inghirami, G. (2002). Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene,* 21, 1038–1047.

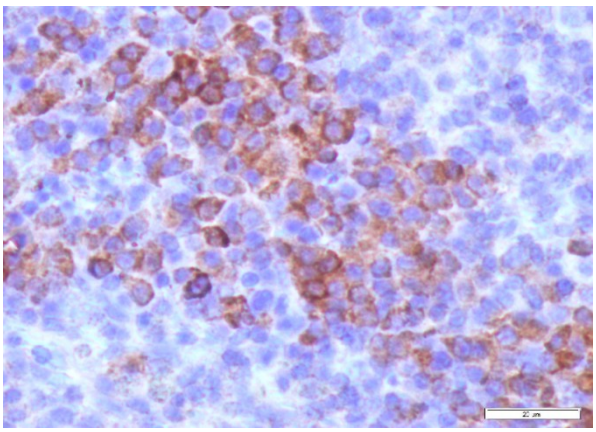
Zettl, F., Wulf, G., Trümper, L., Herling, M. (2014). *Periphere T-Zell-Lymphome. Beschreibung, Diagnose, Therapie*. Kompetenznetz Maligne Lymphome e.V. (KML). Köln.

Zhou, J., Shen, X., Huang, J., Hodes, R. J., Rosenberg, S. A., Robbins, P. F. (2005). Telomere Length of Transferred Lymphocytes Correlates with In Vivo Persistence and Tumor Regression in Melanoma Patients Receiving Cell Transfer Therapy. *The Journal of Immunology*, 175 (10), 7046–7052.

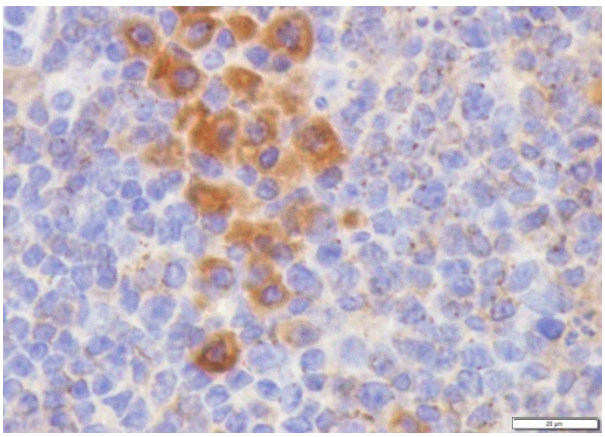
# 13. Anhang

## 13.1 Histologische und immunhistochemische Abbildungen

A



B



C

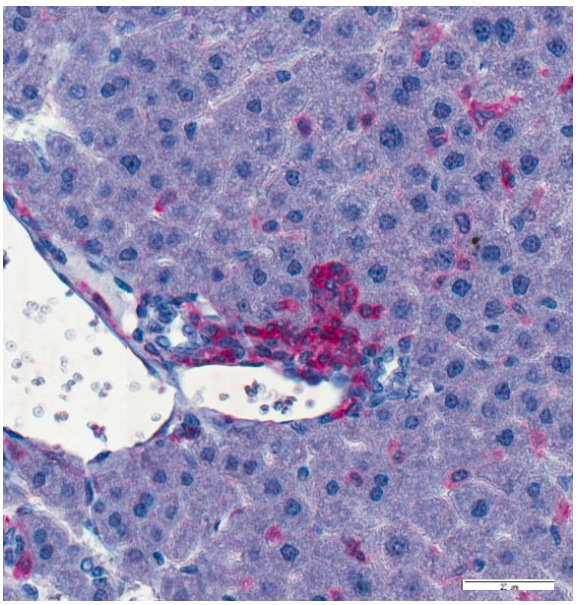


**Abb. 37 IHC der histologischen Präparate von Wildtyp-Mäusen**
In Bild (A) ist die immunhistochemische Färbung des histologischen Lymphknotenpräparates einer gesunden Wildtyp-Maus mit dem Antikörper anti-CD79a, sowie mit dem Antikörper anti-CD4 (B) abgebildet. Als Negativ-Kontrolle dienten andere Organe, wie zum Beispiel die Leber. In Bild (C) ist eine CD3-Färbung dargestellt; gefäßwandständige T-Zellen sind rot gefärbt, umgeben von ungefärbte Leberzellen. Vergrößerung: 40x. Markierung: 20µm

## 13.2 Ergebnisse der BLI-Messungen

**Tabelle 11 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Kontrollgruppe 1**

| Woche (W) | Avg. Radiance (Avg. R) | Standard-abweichung (= SD) | Anzahl Tiere (=n) |
|---|---|---|---|
| **7** | 1880 | 884 | 4 |
| **8** | 2060 | 2222 | 4 |
| **9** | 2870 | 3826 | 4 |
| **10** | 3110 | 2677 | 4 |
| **11** | 2650 | 2287 | 4 |
| **12** | 2320 | 2265 | 4 |
| **13** | 1770 | 512 | 4 |
| **14** | 2580 | 456 | 4 |
| **15** | 2790 | 1176 | 4 |
| **16** | 1630 | 1857 | 3 |
| **17** | 2430 | 1848 | 3 |
| **18** | 3280 | 1705 | 3 |

**Tabelle 12 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Kontrollgruppe 1**

| W | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | cervical | | | axial li | | | axial re | | | Abdomen | | | inguinal li | | | inguinal re | | | popliteal li | | | popliteal re | | |
| **7** | 584 | 411 | 4 | 1420 | 446 | 4 | 1420 | 326 | 4 | 4950 | 2160 | 4 | 3210 | 1780 | 4 | 4030 | 2130 | 4 | 573 | 201 | 4 | 503 | 276 | 4 |
| **8** | 412 | 257 | 4 | 1300 | 753 | 4 | 1110 | 869 | 4 | 4410 | 4010 | 4 | 1680 | 1180 | 4 | 2430 | 990 | 4 | 769 | 496 | 4 | 366 | 244 | 4 |
| **9** | 597 | 469 | 4 | 1840 | 1580 | 4 | 959 | 1180 | 4 | 6520 | 8710 | 4 | 1880 | 1690 | 4 | 4090 | 3700 | 4 | 690 | 451 | 4 | 638 | 439 | 4 |
| **10** | 758 | 172 | 4 | 2090 | 770 | 4 | 1900 | 603 | 4 | 5680 | 3830 | 4 | 2580 | 1180 | 4 | 4520 | 1450 | 4 | 932 | 521 | 4 | 598 | 207 | 4 |
| **11** | 715 | 182 | 4 | 1490 | 225 | 4 | 1190 | 450 | 4 | 5050 | 3490 | 4 | 2980 | 1350 | 4 | 2690 | 2350 | 4 | 866 | 392 | 4 | 598 | 213 | 4 |
| **12** | 642 | 276 | 4 | 1460 | 626 | 4 | 1320 | 620 | 4 | 4790 | 4640 | 4 | 2130 | 983 | 4 | 2640 | 1890 | 4 | 856 | 381 | 4 | 680 | 288 | 4 |
| **13** | 1150 | 370 | 4 | 1450 | 579 | 4 | 1210 | 186 | 4 | 3760 | 1310 | 4 | 3100 | 1160 | 4 | 2920 | 1490 | 4 | 1440 | 514 | 4 | 784 | 156 | 4 |
| **14** | 2290 | 873 | 4 | 2480 | 1030 | 4 | 1880 | 794 | 4 | 5460 | 1580 | 4 | 6870 | 1970 | 4 | 5260 | 4940 | 4 | 1560 | 524 | 4 | 1090 | 307 | 4 |
| **15** | 3050 | 2760 | 4 | 3460 | 2940 | 4 | 2390 | 2040 | 4 | 6570 | 3400 | 4 | 5860 | 6290 | 4 | 7140 | 9310 | 4 | 2610 | 2580 | 4 | 2180 | 2460 | 4 |
| **16** | 1010 | 1100 | 3 | 892 | 873 | 3 | 737 | 519 | 3 | 3990 | 4590 | 3 | 1650 | 1230 | 3 | 1000 | 650 | 3 | 569 | 506 | 3 | 633 | 530 | 3 |
| **17** | 1640 | 1100 | 3 | 1500 | 550 | 3 | 1460 | 442 | 3 | 6210 | 4250 | 3 | 3890 | 2190 | 3 | 2010 | 940 | 3 | 929 | 345 | 3 | 1190 | 348 | 3 |
| **18** | 2350 | 1500 | 3 | 1860 | 1020 | 3 | 1990 | 1120 | 3 | 8800 | 5330 | 3 | 3590 | 3010 | 3 | 2820 | 2560 | 3 | 1470 | 916 | 3 | 1100 | 48 | 3 |

**Tabelle 13 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Kontrollgruppe 2**

| W | Avg. R | SD | n |
|---|---|---|---|
| **9** | 514 | 50 | 2 |
| **10** | 648 | 38 | 2 |
| **11** | 749 | 71 | 2 |
| **12** | 569 | 11 | 2 |
| **13** | 421 | 92 | 2 |
| **14** | 871 | 404 | 2 |
| **16** | 1080 | 410 | 2 |
| **17** | 501 | 90 | 2 |

**Tabelle 14 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Kontrollgruppe 2**

| W | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | cervical | | | axial li | | | axial re | | | Abdomen | | | inguinal li | | | inguinal re | | | popliteal li | | | popliteal re | | |
| **9** | 38 | 29 | 2 | 295 | 105 | 2 | 206 | 14 | 2 | 1300 | 320 | 2 | 1300 | 1320 | 2 | 431 | 260 | 2 | 332 | 184 | 2 | 349 | 180 | 2 |
| **10** | 90 | 6 | 2 | 387 | 176 | 2 | 274 | 134 | 2 | 1550 | 108 | 2 | 1110 | 60 | 2 | 242 | 127 | 2 | 267 | 60 | 2 | 146 | 53 | 2 |
| **11** | 57 | 51 | 2 | 199 | 125 | 2 | 136 | 69 | 2 | 1870 | 126 | 2 | 1330 | 645 | 2 | 548 | 99 | 2 | 351 | 214 | 2 | 234 | 129 | 2 |
| **12** | 77 | 20 | 2 | 248 | 58 | 2 | 341 | 74 | 2 | 1320 | 37 | 2 | 1640 | 942 | 2 | 525 | 268 | 2 | 663 | 203 | 2 | 354 | 96 | 2 |
| **13** | 167 | 22 | 2 | 303 | 39 | 2 | 283 | 57 | 2 | 791 | 280 | 2 | 692 | 444 | 2 | 641 | 360 | 2 | 470 | 111 | 2 | 442 | 111 | 2 |
| **14** | 152 | 39 | 2 | 472 | 153 | 2 | 267 | 65 | 2 | 2110 | 1030 | 2 | 1710 | 262 | 2 | 389 | 130 | 2 | 662 | 360 | 2 | 317 | 163 | 2 |
| **15** | 247 | 11 | 2 | 685 | 81 | 2 | 415 | 65 | 2 | 2440 | 892 | 2 | 3340 | 892 | 2 | 417 | 236 | 2 | 448 | 129 | 2 | 298 | 63 | 2 |
| **16** | 74 | 48 | 2 | 322 | 3 | 2 | 373 | 15 | 2 | 1140 | 306 | 2 | 925 | 289 | 2 | 207 | 214 | 2 | 436 | 58 | 2 | 216 | 101 | 2 |

**Tabelle 15 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Kontrollgruppe 3**

| W | Avg. R | SD | n |
|---|---|---|---|
| **7** | 373 | 133 | 5 |
| **8** | 525 | 257 | 5 |
| **9** | 1090 | 621 | 5 |
| **10** | 1530 | 901 | 5 |
| **11** | 1670 | 1781 | 5 |
| **12** | 1060 | 623 | 5 |
| **13** | 1750 | 2007 | 5 |
| **14** | 1680 | 1487 | 5 |
| **15** | 1440 | 760 | 5 |
| **16** | 1230 | 591 | 5 |
| **17** | 2480 | 1737 | 5 |

**Tabelle 16 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Kontrollgruppe 3**

| W | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | cervical | | | axial li | | | axial re | | | Abdomen | | | inguinal li | | | inguinal re | | | popliteal li | | | popliteal re | | |
| **7** | 92,8 | 136 | 5 | 258 | 147 | 5 | 231 | 95,3 | 5 | 829 | 229 | 5 | 415 | 170 | 5 | 313 | 186 | 5 | 323 | 76 | 5 | 248 | 135 | 5 |
| **8** | 295 | 104 | 5 | 533 | 220 | 5 | 404 | 129 | 5 | 1020 | 362 | 5 | 639 | 268 | 5 | 402 | 212 | 5 | 543 | 326 | 5 | 348 | 153 | 5 |
| **9** | 446 | 96,8 | 5 | 722 | 175 | 5 | 551 | 57,6 | 5 | 2360 | 1510 | 5 | 1200 | 819 | 5 | 784 | 96,4 | 5 | 602 | 136 | 5 | 535 | 188 | 5 |
| **10** | 550 | 339 | 5 | 856 | 503 | 5 | 655 | 281 | 5 | 3440 | 2630 | 5 | 1910 | 620 | 5 | 716 | 432 | 5 | 817 | 299 | 5 | 394 | 199 | 5 |
| **11** | 374 | 263 | 5 | 702 | 377 | 5 | 781 | 395 | 5 | 4510 | 5240 | 5 | 3000 | 4120 | 5 | 1540 | 1480 | 5 | 515 | 213 | 5 | 789 | 520 | 5 |
| **12** | 234 | 107 | 5 | 617 | 182 | 5 | 459 | 119 | 5 | 2890 | 1930 | 5 | 706 | 553 | 5 | 660 | 195 | 5 | 336 | 92 | 5 | 442 | 195 | 5 |
| **13** | 720 | 628 | 5 | 863 | 584 | 5 | 998 | 475 | 5 | 4390 | 5390 | 5 | 1480 | 2070 | 5 | 1500 | 1460 | 5 | 717 | 401 | 5 | 873 | 246 | 5 |
| **14** | 846 | 324 | 5 | 793 | 306 | 5 | 1050 | 385 | 5 | 4220 | 4310 | 5 | 2010 | 1290 | 5 | 1050 | 354 | 5 | 906 | 552 | 5 | 746 | 297 | 5 |
| **15** | 827 | 308 | 5 | 938 | 149 | 5 | 1020 | 277 | 5 | 3250 | 2030 | 5 | 2090 | 698 | 5 | 953 | 212 | 5 | 1130 | 289 | 5 | 1020 | 342 | 5 |
| **16** | 689 | 313 | 5 | 741 | 176 | 5 | 861 | 313 | 5 | 2800 | 1470 | 5 | 1420 | 1100 | 5 | 1370 | 1190 | 5 | 801 | 289 | 5 | 905 | 533 | 5 |
| **17** | 756 | 289 | 5 | 1340 | 971 | 5 | 1070 | 283 | 5 | 4040 | 3080 | 5 | 1490 | 737 | 5 | 1310 | 453 | 5 | 1120 | 722 | 5 | 1010 | 526 | 5 |

**Tabelle 17 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Onkogengruppe 1**

| W | Avg. R | SD | n |
|---|---|---|---|
| **7** | 507 | 99 | 2 |
| **8** | 659 | 316 | 2 |
| **9** | 888 | 681 | 2 |
| **10** | 1110 | 799 | 2 |
| **11** | 558 | 101 | 2 |
| **12** | 738 | 206 | 2 |
| **13** | 738 | 36 | 2 |
| **14** | 553 | 118 | 2 |
| **15** | 1010 | 45 | 2 |
| **16** | 765 | 168 | 2 |
| **17** | 303 | 69 | 2 |
| **18** | 682 | 322 | 2 |
| **19** | 486 | 132 | 2 |
| **20** | 1410 | 740 | 2 |
| **21** | 2040 | 1785 | 2 |
| **22** | 6650 | 6925 | 2 |

**Tabelle 18 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Onkogengruppe 1**

| W | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n | Avg. R | SD | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | cervical | | | axial li | | | axial re | | | Abdomen | | | inguinal li | | | inguinal re | | | popliteal li | | | popliteal re | | |
| **7** | 4160 | 2892 | 2 | 7060 | 1669 | 2 | 7490 | 3309 | 2 | 105000 | 79005 | 2 | 14400 | 12331 | 2 | 6280 | 1305 | 2 | 11700 | 5786 | 2 | 21000 | 1174 | 2 |
| **8** | 4950 | 1530 | 2 | 11900 | 4523 | 2 | 5970 | 1288 | 2 | 147000 | 2192 | 2 | 7010 | 5289 | 2 | 2900 | 930 | 2 | 13300 | 2574 | 2 | 9100 | 1050 | 2 |
| **9** | 2700 | 559 | 2 | 9950 | 2750 | 2 | 5770 | 2490 | 2 | 242000 | 134562 | 2 | 7180 | 992 | 2 | 3190 | 1744 | 2 | 11500 | 2645 | 2 | 8940 | 6027 | 2 |
| **10** | 10700 | 7854 | 2 | 11800 | 4404 | 2 | 15000 | 6887 | 2 | 243000 | 97651 | 2 | 8280 | 181 | 2 | 5750 | 127 | 2 | 18200 | 7184 | 2 | 22600 | 15790 | 2 |
| **11** | 6780 | 4622 | 2 | 13200 | 5904 | 2 | 8880 | 5469 | 2 | 207000 | 82166 | 2 | 6290 | 1067 | 2 | 4310 | 3275 | 2 | 27800 | 15125 | 2 | 19700 | 9532 | 2 |
| **12** | 21400 | 26591 | 2 | 17500 | 12708 | 2 | 7950 | 4241 | 2 | 132000 | 39386 | 2 | 6740 | 1696 | 2 | 9420 | 5102 | 2 | 28300 | 14107 | 2 | 17100 | 5720 | 2 |
| **13** | 18000 | 18073 | 2 | 13200 | 5274 | 2 | 16100 | 12461 | 2 | 182000 | 47588 | 2 | 7100 | 3224 | 2 | 6090 | 1933 | 2 | 18200 | 5112 | 2 | 18600 | 1153 | 2 |
| **14** | 10800 | 10943 | 2 | 13800 | 8946 | 2 | 19300 | 16604 | 2 | 128000 | 80264 | 2 | 8480 | 3676 | 2 | 4090 | 1534 | 2 | 17600 | 3613 | 2 | 10500 | 1744 | 2 |
| **15** | 14800 | 14406 | 2 | 21100 | 17505 | 2 | 106000 | 137986 | 2 | 216000 | 60599 | 2 | 8170 | 2802 | 2 | 2850 | 334 | 2 | 15600 | 269 | 2 | 25200 | 15853 | 2 |
| **16** | 11300 | 6139 | 2 | 24800 | 21574 | 2 | 20400 | 18981 | 2 | 171000 | 2546 | 2 | 4500 | 1752 | 2 | 5540 | 1558 | 2 | 13900 | 49 | 2 | 21700 | 4518 | 2 |
| **17** | 2790 | 2114 | 2 | 6050 | 943 | 2 | 7160 | 8458 | 2 | 84800 | 24339 | 2 | 620 | 828 | 2 | 2500 | 1306 | 2 | 6510 | 362 | 2 | 10800 | 3135 | 2 |
| **18** | 7700 | 3932 | 2 | 10000 | 1237 | 2 | 11800 | 7559 | 2 | 193000 | 44053 | 2 | 3750 | 1447 | 2 | 5230 | 226 | 2 | 16000 | 1860 | 2 | 29200 | 21150 | 2 |
| **19** | 8290 | 6348 | 2 | 16400 | 3132 | 2 | 11200 | 6431 | 2 | 123000 | 16829 | 2 | 3110 | 1314 | 2 | 4830 | 3422 | 2 | 16200 | 3854 | 2 | 12600 | 1195 | 2 |
| **20** | 19000 | 13390 | 2 | 27000 | 15535 | 2 | 18000 | 8952 | 2 | 373000 | 156059 | 2 | 10300 | 403 | 2 | 5660 | 1355 | 2 | 30100 | 9129 | 2 | 35100 | 12693 | 2 |
| **21** | 19100 | 9122 | 2 | 26100 | 17911 | 2 | 17600 | 6322 | 2 | 657000 | 548856 | 2 | 8790 | 3807 | 2 | 6230 | 2814 | 2 | 30500 | 11229 | 2 | 35600 | 19502 | 2 |
| **22** | 23200 | 15351 | 2 | 56700 | 52326 | 2 | 46600 | 47687 | 2 | 2340000 | 2389385 | 2 | 17400 | 2305 | 2 | 7540 | 5320 | 2 | 38000 | 35094 | 2 | 50600 | 42009 | 2 |

**Tabelle 19 Mittelwerte der BLI-Ganzkörpermessungen der Onkogengruppe 2**

| W | Avg. R | n |
|---|---|---|
| **7** | 652 | 1 |
| **8** | 698 | 1 |
| **9** | 710 | 1 |
| **10** | 2640 | 1 |
| **11** | 38600 | 1 |
| **12** | 55800 | 1 |
| **13** | 196000 | 1 |

**Tabelle 20 Mittelwerte der BLI-Einzelregionsmessungen der Onkogengruppe 2**

| W | Avg. R | Avg. R | Avg. R | Avg. R | Avg. R | Avg. R | Avg. R | Avg. R |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | cervical | axial li | axial re | Abdomen | inguinal li | inguinal re | popliteal li | popliteal re |
| **7** | 727 | 425 | 318 | 2180 | 489 | 190 | 211 | 433 |
| **8** | 354 | 355 | 371 | 2470 | 432 | 313 | 445 | 161 |
| **9** | 1020 | 890 | 1070 | 1250 | 1300 | 3050 | 701 | 1170 |
| **10** | 812 | 618 | 757 | 2520 | 1280 | 750 | 709 | 17500 |
| **11** | 2230 | 922 | 993 | 59500 | 6760 | 12300 | 10500 | 206000 |
| **12** | 840 | 556 | 1070 | 130000 | 14500 | 7910 | 7740 | 162000 |
| **12** | 597 | 1250 | 1970 | 445000 | 25400 | 64300 | 21500 | 200000 |

## 13.3 Chemikalien und Lösungen

**Tabelle 21 Chemikalien und Lösungen**

| Substanz | Hersteller |
|---|---|
| Ampicillin (sodium salt) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Aqua Tex | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Betamercaptoethanol | Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Sigma, St. Louis, Missouri, USA |
| Calciumchlorid ($CaCl_2$) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Chloroquin | 25 mM in ddH2O, steril gefiltert und bei 4°C gelagert |
| DAB (3,3'-Diaminobenzidin) | Dako, Hamburg, Deutschland |
| Eosin Y | Ansatz aus 2% Eosin mit Aqua dest. |
| | Sigma, St. Louis, Missouri, USA |
| Ethidiumbromid | BioRad, Hercules, California, USA |
| Eukitt | Medite, Burgdorf, Deutschland |
| Fötales Kälberserum (FBS) | PAA The Cell Culture Company |
| Glutamat | Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Hämatoxylin nach Gill No. 2 | Sigma, St. Louis, Missouri, USA |
| Hämatoxylin nach Mayer | AppliChem, Darmstadt, Deutschland |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| LB-Agar (Lennox) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| LE Agarose | BioRad, Hercules, California, USA |
| Methanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin AB | Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Peroxidase (ready to use) | Dako, Hamburg, Deutschland |
| Phosphate-Buffered-Saline (PBS) | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Poly-L-Lysin | Sigma, St. Louis, Missouri, USA |
| RPMI 1640 | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Trypanblau 0,04 % | Sigma, St. Louis, Missouri, USA |
| Trypsin-EDTA 0,05% | Gibco, Life Technologies, Darmstadt, |

| | |
|---|---|
| | Deutschland |

## 13.4 Medien und Puffer

**Tabelle 22 Medien und Puffer**

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|---|
| Bovines Serum Albumin (BSA) 2 % | 2 % BSA in Aqua dest., steril filtriert, gelagert bei 4°C |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| DMEM complete | 10% Fötales Kälberserum (FBS), 1% Penicillin |
| DNA loading buffer (6x) | New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA |
| Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| EnVision Flex Substrate Buffer K8000 | Dako, Hamburg, Deutschland |
| HEPES (2x) | 281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 5 mM Na2HPO4 in dH2O, pH = 7.0, gelagert bei -20°C |
| Lysepuffer (10x) | BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| MACS-Puffer | 0,5 % BSA in PBS<br>2 mM EDTA |
| Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640) | Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| RPMI 1640 mouse medium special | 10% Fötales Kälberserum (FBS), 2% L-Glutamin, 1% Penicillin, 1% Non-essential amino acids, 1% Sodium pyruvate, 0,1% β-Mercaptoethanol |
| Schweineserum | Vector, Burlingame, California, USA |
| TAE (50x) | AppliChem, Darmstadt, Deutschland |
| TBS (tris buffered salin; 20x) | Dako, Hamburg, Deutschland |

## 13.5 Geräte

**Tabelle 23 Geräte**

| Gerät | Bezeichnung/Hersteller |
|---|---|
| Autoklav | Systec, Wettenberg, Deutschland |
| Biolumineszens-Bildgebung | IVIS Lumina II, Caliper Life Science, Deutschland |
| $CO_2$-Brutschrank | HERAcell 150i/Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Gelelektrophoresekammer | BioRad, Hercules, California, USA |
| Inhalationsnarkose-System | XGI-8, Caliper Life Science, Deutschland |
| MACSQuant | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| Mikroskop | Olympus IX70/Olympus, Tokyo, Japan |
| Mikrowelle | Sharp, Osaka, Japan |
| Nano-Drop ND 1000 Spectrometer | PeqLab, Erlangen, Deutschland |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Pipettierhilfe | Pipetboy acu, Integra Biosciences, Fernwald Deutschland |
| Schüttelinkubator | Edmund Bühler LabTec, Hechingen, Deutschland |
| Sterilbank | HERAsafe KS/Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Spannungsquelle, Power Pac 300 | BioRad, Hercules, California, USA |
| Tiefkühlschrank (- 80° C) | Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| UV-Transilluminator Gel Doc 2000 Dokumentationssystem | BioRad, Hercules, California, USA |
| Ultrazentrifuge, Avanti J-20, Rotor JA-12 | Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland |
| Vortex | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel, Deutschland |
| Zentrifuge | Heraeus Fresco 21/Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Zentrifuge (Minifuge) | Minifuge RF/Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Zentrifuge (Megafuge) | Megafuge 1.0 OR/Heraeus, Thermo Fisher |

| | |
|---|---|
| | Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |

## 13.6 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 24 Verbrauchsmaterialien**

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|---|---|
| 6-*well*-Zellkulturplatten | Greiner-bio-one, Frickenhausen, Deutschland |
| *6-well*-Nicht-Gewebekulturplatten | BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| 24-*well*-Zellkulturplatten | Greiner-bio-one, Frickenhausen, Deutschland |
| C-Chip Neubauer *improved* Einmal Zähllkammer | DigitalBio, New York, USA |
| Desinfektionsmittel (DesoMed Rapid AF) | DesoMed, Freiburg, Deutschland |
| Einmalspritzen (5 ml und 10 ml) | Braun, Melsungen, Deutschland |
| Einweghandschuhe | Braun, Melsungen, Deutschland |
| FACS-Röhrchen | Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland |
| Falcon Röhrchen (15 ml und 50 ml) | Greiner-bio-one, Frickenhausen, Deutschland |
| Gewebekulturplatten (10 cm) | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Glasobjektträger für H.E.-Färbungen | Süsse,Gudensberg, Deutschland |
| Glasobjektträger für IHC | Thermo, Braunschweig, Deutschland |
| Handstückzähler | Infactory, Deutschland |
| Pipettenspitzen (10, 100, 200 und 1000 µl) | peqLab, Erlangen, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Spritzenvorsatzfilter (*cell strainer*) | BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| Sterilfilter (0,22 µm und 0,45 µm) | Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA |
| Sterilpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) | Costar, Corning, New York, USA |
| T25-Zellkulturflaschen | BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| T75-Zellkulturflaschen | BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| T175-Zellkulturflaschen | BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA |

## 13.7 Verwendete Kits

**Tabelle 25 Verwendete Kits**

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| ABC-Kit Vectastain (PK4000) | Vector, Burlingame, California, USA |
| Calcium Phosphat Transfektion Kit | Sigma, St. Louis, Missouri, USA |
| Endofree Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Fix & Perm Cell Permeabilization Kit | Invitrogen, Carlsbad, California, USA |
| HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit | Invitrogen, Carlsbad, California, USA |
| Quick Plasmid Miniprep Kit | Invitrogen, Carlsbad, California, USA |

## 13.8 Tierexperimentelle Materialien

**Tabelle 26 Tierexperimentelle Materialien**

| Bezeichung | Hersteller |
|---|---|
| Bepanthen Augen- und Nasensalbe | Bayer, Leverkusen, Deutschland |
| D-Luciferin | Perkin Elmer, Massachusetts, USA |
| Einweg-Skalpell No. 11 | Feather, Japan |
| Insulinspritzen | BD, Heidelberg, Deutschland |
| Isofluran | Abbott, Wiesbaden, Deutschland |
| Microvette, EDTA-beschichtet | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Präparationsschere (Metzenbaum) | Eickemeyer, Tuttingen, Deutschland |
| Rotlichtlampe | Heiland, Hamburg, Deutschland |

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. M.-L. Hansmann möchte ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung der vorliegenden Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. C. Herden danke ich für die Betreuung dieser extern angefertigten Arbeit und für die Bereitschaft, auch fachübergreifende Ansätze und Ideen zu unterstützen und zu fördern.

Herrn Dr. Newrzela und Frau Dr. Schmid danke ich ganz besonders für die tatkräftige Unterstützung, wissenschaftliche Beratung und die Hilfestellung während der gesamten Zeit, ohne welche die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau PD Dr. Sylvia Hartmann danke ich herzlich für die Beurteilung der histologischen Organpräparate und die tatkräftige Unterstützung während der Etablierungsarbeiten der immunhistochemischen Färbungen.

Frau Soworka gilt ganz besonderer Dank für die Bereitschaft, gemeinsam neue Protokolle für die IHC zu erarbeiten und die anschließende Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen der Organpräparate.

Mein besonderer Dank gilt auch der gesamten „T-Cell Lymphoma Group“ des Senckenbergischen Instituts für Pathologie unter der Leitung von Herrn Dr. Sebastian Newrzela und den Mitarbeitern Frau Dr. Frederike Schmid, Herr Dr. Benjamin Rengstl, Frau Kathrin Warner, Herr Christian Weiser, Frau Smaro Soworka und Herr Robin Wistinghausen für die Einführung in die Benutzung der technischen Geräte, viele hilfreiche Tipps zum wissenschaftlichen Arbeiten, zahlreiche inspirierende Diskussionen und ein fantastisches Arbeitsklima.

Desweiteren danke ich meiner Familie und meinen Freunden von Herzen für die seelische und moralische Unterstützung in allen Lebensphasen. Meinem Mann danke ich für den Rückhalt und die Geduld, die er mit mir hat.