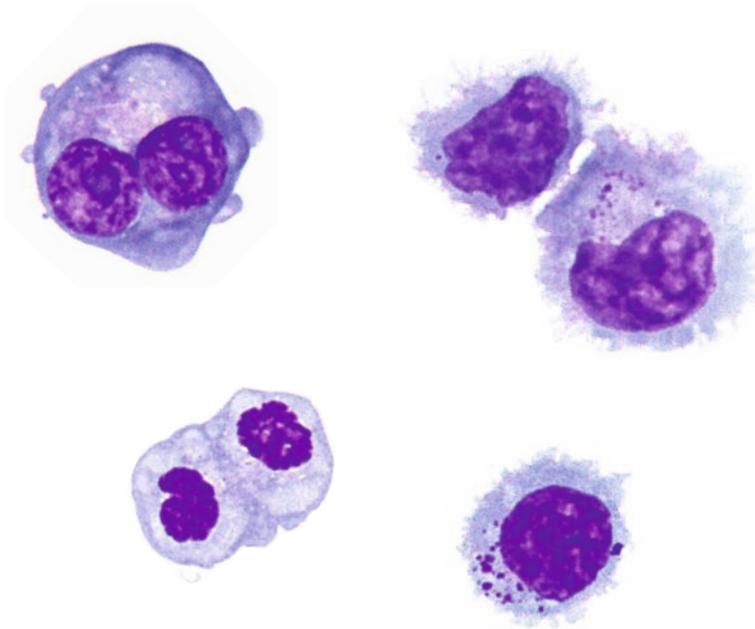


Untersuchungen zur Charakterisierung einer felines Large Granular Lymphocyte (LGL)-Zelllinie

Lena Rydzewski



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



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**Untersuchungen zur Charakterisierung einer felines Large Granular
Lymphocyte (LGL)-Zelllinie**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von

Lena Rydzewski

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen (2015)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. J. Roth

Tag der Disputation: 24.11.2015

Meinen Eltern
und Karsten

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, 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 guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Large Granular Lymphocytes (LGL)	2
2.1.1	Unterteilung der LGL	2
2.1.2	Zytotoxische Aktivität	3
2.1.2.1	Natürliche Killerzellen	4
2.1.2.2	Zytotoxische T-Zellen	4
2.1.2.2.1	Der T-Zell-Rezeptor (TCR).....	5
2.1.2.3	Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen).....	5
2.1.3	Überprüfung der spontanen Zytotoxizität.....	6
2.1.3.1	Zielzellen	6
2.2	Large Granular Lymphocyte (LGL)-Lymphome	7
2.2.1	WHO-Klassifikation.....	7
2.2.2	Large Granular Lymphocyte-Lymphome beim Menschen	10
2.3	Zelllinien	10
2.3.1	Feline Lymphomzelllinien.....	11
2.3.2	Feline Large Granular Lymphocyte-Zelllinien.....	13
2.4	Chromosomale Instabilität.....	14
2.4.1	Aneuploidie	15
2.4.2	Zentrosomen	15
2.4.3	Zellzyklus	16
2.4.4	Mitose.....	16
2.4.5	Zentrosomenreproduktion	17
2.4.5.1	Kontrollpunkte.....	17
2.4.6	Zentrosomenhyperamplifikation	18
2.4.6.1	Zentrosomenhyperamplifikation in hämatopoetischen Tumoren.....	20
2.4.6.2	Untersuchungen zur Zentrosomenhyperamplifikation bei Tieren.....	20
2.4.6.3	Ursachen der Zentrosomenhyperamplifikation	21
2.4.6.4	Die Rolle von p53.....	21
2.4.7	γ -Tubulin	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Zelllinie „S87“.....	28
3.1.1	Herkunft der Zelllinie	28

3.1.1.1	Klinische Befunde	28
3.1.2	Zellisolierung.....	28
3.1.2.1	Isolierung feliner peripherer mononukleärer Zellen.....	28
3.2	Zellkulturtechnik	29
3.2.1	Medien und Zusätze	29
3.2.1.1	Konditioniertes Medium.....	30
3.2.2	Zellkultivierung und Passagierung	30
3.2.3	Trypanblauausschlussfärbung	31
3.2.4	Kryokonservierung.....	32
3.2.5	Auftauen von Zellen.....	32
3.2.6	Wachstumskurve und Populationsverdopplungszeit	33
3.3	Nachweis der spontanen Zytotoxizität	34
3.3.1	Zielzellen	34
3.3.2	Vorbereitung des MTT-Tests	34
3.3.3	Rose-Bengal-Assay (RBA)	35
3.3.4	Auswertung des MTT-Tests und des RBAs	36
3.3.5	Berechnung der Zytotoxizität	36
3.3.6	Rosettenformation	36
3.4	MTT-Test zur Überprüfung der Proliferation	37
3.4.1	Stimulation mit Interleukin 2.....	37
3.4.2	Stimulation mit Concanavalin A	37
3.4.3	Stimulation mit 20 % FCS.....	37
3.5	Analyse der Klonierungsgrenze	39
3.5.1	Limited-Dilution-Klonierung	39
3.5.2	Klonierung im Weichagar	39
3.5.3	Klonierung mit Transwell®-Einsätzen.....	40
3.6	Chromosomenpräparation	41
3.6.1	Giemsa-Färbung	42
3.6.2	DAPI-Färbung	43
3.6.3	G-Banding	43
3.6.4	Erstellung der Karyogramme	44
3.7	Transmissionselektronenmikroskopie.....	44
3.7.1	Darstellung der Zellmorphologie.....	44
3.8	Immunzytologische Untersuchungen	45
3.8.1	Einbettung von Zellpellets in Paraffin.....	45
3.8.2	Herstellung eines Paraffinblocks	45

3.8.3	Herstellung eines Gefrierblocks	46
3.8.4	Anfertigung der Paraffinschnitte	46
3.8.5	Anfertigung der Gefrierschnitte	46
3.8.6	Seren zur Blockierung unspezifischer Antigen-Reaktionen.....	47
3.8.7	Antiseren	47
3.8.7.1	Primärantikörper.....	47
3.8.7.2	Sekundärantikörper.....	51
3.8.7.3	Tertiärantikörper.....	52
3.8.8	Allgemeines Protokoll zu den immunzytologische Untersuchungen.....	53
3.8.9	Immunzytologische Kontrollen	55
3.8.9.1	Positivkontrollen	55
3.8.9.1.1	FeLV.....	55
3.8.9.1.2	CD45R.....	55
3.8.9.1.3	CD3	55
3.8.9.1.4	CD56 (N-CAM)	55
3.8.9.1.5	Bcl-2, Granzym B und NK1	55
3.8.9.1.6	CD4 und CD8.....	55
3.8.9.1.7	Proliferationsmarker.....	56
3.8.9.2	Negativkontrollen.....	56
3.8.9.3	Beurteilung der Immunzytologie.....	56
3.8.10	Lebendinkubation mit Antikörpern gegen CD4 und CD8.....	56
3.8.11	Doppelmarkierung CD3 und CD45R	57
3.9	Untersuchungen zur Zentrosomenausstattung.....	59
3.9.1	Probenvorbereitung	59
3.9.2	Seren.....	59
3.9.3	Antiseren	59
3.9.4	Fluoreszenz-Kernfarbstoff.....	59
3.9.5	Vorbehandlung	60
3.9.6	Durchführung der Immunfluoreszenz	60
3.9.6.1	Negativkontrolle.....	61
3.9.7	Nachweis von γ -Tubulin an FFPE-Material.....	61
3.9.8	Zytologische Auswertung.....	61
3.9.9	Statistische Auswertung	61
3.10	Durchflusszytometrie	62
3.10.1	Primärantikörper.....	62
3.10.2	Sekundärantikörper.....	62

3.10.3	Versuchsdurchführung der Durchflusszytometrie.....	63
3.11	Molekularbiologische Untersuchungen.....	63
3.11.1	RNS-Isolierung.....	63
3.11.2	Messung der isolierten RNS.....	64
3.11.3	Isolierung von DNS mit AquaGenomic™.....	64
3.11.4	Messung der isolierten DNS.....	65
3.11.5	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	66
3.11.5.1	RT-Reaktion.....	66
3.11.6	PCR zum Nachweis eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements.....	67
3.11.6.1	Kontrollen.....	68
3.11.7	PCR zum Nachweis eines Rearrangements der B-Zell-Rezeptorgene.....	69
3.11.7.1	Kontrollen.....	70
3.11.8	PCR zum Nachweis des FeLV-Provirus.....	70
3.11.8.1	Semi-nested PCR.....	70
3.11.8.1.1	Durchführung.....	71
3.11.8.2	Kontrolle.....	72
3.11.9	PCR zum Nachweis einer p53-Mutation.....	72
3.11.10	Agarosegelelektrophorese.....	74
3.11.11	Visualisierung und Dokumentation.....	74
3.11.12	DNS-Aufreinigung.....	75
3.11.12.1	Aufreinigung mit Amicon Ultrafugal Filter.....	75
3.11.12.2	Aufreinigung mit ExoSap.....	75
3.11.13	Aufarbeitung zur Sequenzierung.....	76
3.11.14	Auswertung der Sequenzierungsergebnisse.....	76
4	Ergebnisse.....	77
4.1	Morphologische Charakteristika.....	77
4.1.1	Elektronenmikroskopie.....	78
4.2	Eigenschaften der Zellen in Kultur.....	79
4.3	Wachstumscharakteristika.....	79
4.3.1	Wachstumskurve und Populationsverdopplungszeit.....	79
4.4	Festlegung der Klonierungsgrenze.....	81
4.4.1	Limited-Dilution-Klonierung.....	81
4.4.2	Klonierung im Weichagar.....	82
4.4.3	Klonierung mit Transwell®-Einsätzen.....	82
4.5	Zytotoxische Aktivität.....	83
4.5.1	Rosettenformation.....	83

4.6	Spontane zytotoxische Aktivität.....	83
4.6.1	CTAC-Zellen.....	84
4.6.1.1	MTT-Test	84
4.6.1.2	Rose-Bengal-Assay (RBA)	85
4.6.2	Vero-Zellen	85
4.6.3	Spontane zytotoxische Aktivität des Überstandes.....	86
4.6.3.1	CTAC-Zellen.....	86
4.6.3.2	Vero-Zellen	86
4.7	Stimulation der Zellen mit verschiedenen Mitogenen.....	86
4.7.1	Stimulationsindex.....	87
4.8	Immunphänotypische Charakterisierung.....	88
4.8.1	Zugehörigkeit zur T-Zelllinie	88
4.8.1.1	Weitere Differenzierung der T-Zellen durch Untersuchungen zur Expression des CD4- und CD8-Antigens.....	89
4.8.1.1.1	Gefrierschnittmethode	89
4.8.1.1.2	Lebendinkubation.....	89
4.8.1.1.3	Durchflusszytometrie	89
4.8.1.2	Nachweis eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements.....	91
4.8.2	Untersuchungen zur Expression von B-Zell-Markern.....	91
4.8.2.1	Untersuchung auf das Rearrangement der B-Zell-Rezeptorgene	92
4.8.3	Doppelmarkierung von CD3 und CD45R	92
4.8.4	Untersuchungen zur Expression des CD56-Antigens (N-CAM) und von NK1	93
4.8.5	Untersuchungen zur Expression des antiapoptotischen Bcl-2.....	93
4.8.6	Nachweis von Proliferationsmarkern	93
4.8.6.1	PCNA	93
4.8.6.2	Ki-67.....	93
4.8.7	Untersuchungen zur Expression des Granzym B-Antigens.....	93
4.8.8	Zusammenfassung der immunzytologischen Untersuchungen	93
4.9	Untersuchungen zum FeLV-Status.....	94
4.9.1	Untersuchungen zur Expression von FeLV-Antigenen.....	94
4.9.2	Untersuchungen zum Nachweis von FeLV-Provirus	94
4.10	Zytogenetische Charakterisierung.....	94
4.10.1	Chromosomenanalyse der Passage 10.....	95
4.10.2	Chromosomenanalyse der Passage 80.....	96
4.10.3	Statistische Auswertung	97
4.10.4	Ergebnisse der Karyogramme von Passage 10 und Passage 80	97

4.10.5	Zentrosomenanalyse	99
4.10.6	Statistische Auswertung	100
4.11	Untersuchungen zur p53-Sequenz	101
5	Diskussion	105
5.1	Zelllinien	106
5.2	Einordnung von S87	107
5.3	Interpretation der Wachstumseigenschaften.....	113
5.4	Spontane zytotoxische Aktivität.....	114
5.5	Eigenschaften in Kultur.....	116
5.6	Chromosomale Instabilität.....	118
5.6.1	Chromosomale Stabilität von PBMC	118
5.6.2	Chromosomale Instabilität von S87	119
5.7	Zentrosomenhyperamplifikation	121
5.8	p53-Mutationen	123
6	Zusammenfassung	127
7	Literaturverzeichnis.....	130
8	Anhang	146
8.1	Immunzytologische Untersuchungen	146
8.2	Tabellen und Abbildungen	148
8.3	Lösungen, Puffer und Bezugsquellen.....	157
8.3.1	Bezugsquellen für Chemikalien, Kits, Seren, Antiseren, Antikörper und Geräte (Katalognummer/Bestellnummer).....	157
8.3.2	Bezugsquellen für Geräte und Verbrauchsmaterialien	161
8.3.3	Lösungen und Puffer	164
9	Abkürzungsverzeichnis	168

1 Einleitung

Bereits Ende der 1950er Jahre wurde durch die Formulierung des 3R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine) versucht, Alternativen zu Tierversuchen zu entwickeln (Russell und Burch, 1959). Zelllinien stellen eine Möglichkeit dar unter kontrollierten Bedingungen, zumindest teilweise die in-vivo-Verhältnisse zu simulieren.

Im Gegensatz zum Menschen, von dem es bereits zahlreiche etablierte Lymphomzelllinien gibt (Drexler und Macleod, 2010), ist die Zahl der feline Lymphomzelllinien eher überschaubar. Zudem handelt es sich bei den der Forschung zur Verfügung stehenden Lymphomzelllinien zumeist um FeLV-positive Zelllinien.

Large Granular Lymphocytes stellen eine heterogene Zellpopulation dar und umfassen die natürlichen Killerzellen sowie zytotoxischen T-Zellen. Ihr gemeinsames Charakteristikum, welches ihnen auch ihren Namen gab, sind die großen intrazytoplasmatischen Granula. Bei der Katze sind bisher lediglich zwei LGL-Zelllinien beschrieben, wobei es sich bei beiden um Linien natürlicher Killerzellen handelt (Cheney et al., 1990; Goitsuka et al., 1993).

Ziel dieser Arbeit war es, eine FeLV-negative Large Granular Lymphocyte-Zelllinie zu charakterisieren, die aus einem Patienten mit Large Granular Lymphocyte-Lymphom in der Leber isoliert worden war. Ein besondere Gewichtung lag dabei auf der chromosomalen Instabilität dieser Zellen.

2 Literaturübersicht

2.1 Large Granular Lymphocytes (LGL)

Unter der Bezeichnung „*Large Granular Lymphocytes*“ (große granulierte Lymphozyten, LGL) wird eine heterogene Zellpopulation zusammengefasst, die zum einen aus natürlichen Killerzellen, zum anderen aus zytotoxischen T-Zellen besteht. Auch im deutschsprachigen Raum hat sich der englische Begriff gegenüber dem Deutschen durchgesetzt. Ihr morphologisches Charakteristikum sind große intrazytoplasmatische Granula, in denen Perforin und Granzyme gespeichert sind und mit deren Hilfe es den LGL möglich ist, ihre Zielzellen, vor allem Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen, zu lysieren (Franks et al., 1986; Rola-Pleszczynski et al., 1985; Stankova und Rola-Pleszczynski, 1986; Timonen et al., 1981; Tompkins et al., 1983; Tompkins und Tompkins, 1985).

Bei der Katze beträgt der Anteil der Large Granular Lymphocytes an den Leukozyten im peripheren Blut ähnlich wie beim Menschen ca. 0-13 %, wobei die Zahlen von Einzeltier zu Einzeltier zum Teil starken Schwankungen unterliegen (Timonen et al., 1981; Timonen und Saksela, 1980; Wellman et al., 1992). Das Verteilungsmuster der beiden LGL-Typen hinsichtlich der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC=Peripheral Blood Mononuclear Cell) ist ebenfalls individuellen Schwankungen unterlegen und wird für die CD56⁺ und CD3⁻ natürlichen Killerzellen bei der Katze, je nach Autor, mit 1-9 % angegeben (Howard et al., 2010; Vermeulen et al., 2012).

2.1.1 Unterteilung der LGL

In früheren Veröffentlichungen wurden die Large Granular Lymphocytes zunächst mit den natürlichen Killerzellen gleichgesetzt (Timonen et al., 1981). Später wurden die granulierten Zellen dann in die heute noch gebräuchlichen Gruppen unterteilt. Die Unterteilung in die verschiedenen Untergruppen wird in erster Linie anhand der immunphänotypischen Oberflächenmarker, Cluster of differentiation (CD), vorgenommen. Hierbei spielt vor allem der Nachweis des CD3-Antigens, da dieses von T-Zellen exprimiert wird, eine entscheidende Rolle. Zusätzlich kann mit der Nachweismöglichkeit des T-Zell-Rezeptor-Rearrangements eine weitere Untersuchungsmethode herangezogen werden (Chan et al., 1986; Lanier et al., 1986a; Lanier et al., 1986b; Trinchieri und Perussia, 1984). Chan et al. beschrieben 1986 zwei verschiedene Zelltypen der Large Granular Lymphocytes, wobei Typ A den T-Zellen zugeordnet wurde und sich durch die Expression der CD3- und CD8-Antigene auszeichnete,

wohin gegen Typ B, die natürlichen Killerzellen, sich durch die Abwesenheit der beiden genannten Antigene und eine spontane zytotoxische Aktivität definierten (Chan et al., 1986).

2.1.2 Zytotoxische Aktivität

Im direkten Vergleich der beiden LGL-Zelltypen lassen sich Parallelen hinsichtlich ihrer Mechanismen der Zielzellyse erkennen. Der Begriff des „Exocytose Model“ beschreibt den Kalzium-abhängigen sekretorischen Vorgang, bei dem der Inhalt der Granula nach Kontakt mit den Zielzellen durch Exozytose freigesetzt wird (Henkart und Henkart, 1982; Henkart, 1985; Ostergaard et al., 1987). Der Inhalt der Granula besteht größtenteils aus lysosomalen Enzymen (Grossi et al., 1982). Eines dieser Enzyme ist Perforin (Lichtenheld et al., 1988; Lowrey et al., 1988). Perforin ist in der Lage, eine Pore in der Zielzelle zu formen und somit Granzym B den Eintritt in die Zielzelle zu ermöglichen (Dourmashkin et al., 1980; MedDennert und Podack, 1983; Nakajima et al., 1995; Stinchcombe et al., 2001). Untersuchungen der cDNS von Maus, Ratte und der des Menschen konnten zeigen, dass die Expression des Gens für Perforin und somit dieses Enzym ausschließlich in Zellen vorkommt, die der Klasse der Large Granular Lymphocytes angehören (Yagita et al., 1992). Granzym B ist eine Serinprotease, welche ebenfalls ausschließlich in den Granula der zytotoxischen T-Zellen und den natürlichen Killerzellen gefunden wird und letztendlich die Apoptose in der Zielzelle auslöst (Hameed et al., 1991; Waterhouse et al., 2006). Caspase 3 und Caspase 8 stellen als wichtige Cysteinproteasen der Apoptose direkte Substrate für Granzym B dar, was bedeutet, dass die Apoptose nicht nur über den Fas-Liganden, sondern auch direkt über die durch Exozytose frei gewordene Serinprotease ausgelöst werden kann (Atkinson et al., 1998; Medema et al., 1997). Die Ausschüttung von Granzym B kann ebenfalls zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien der Zielzellen führen, wodurch es zur Apoptose über einen ebenfalls Caspase-abhängigen, intrinsischen Weg kommt (Heibein et al., 1999; MacDonald et al., 1999).

Large Granular Lymphocytes sind nicht nur über die bereits beschriebene Kalzium-abhängige Exozytose in der Lage, die Zielzellen zu lysieren, sondern auch noch zu einem anderen Angriffsmuster befähigt (Ostergaard et al., 1987). Dieses führt, über den membrangebundenen Fas-Liganden, welcher zur Familie der Tumornekrosefaktoren gezählt wird und weder Kalzium- noch Perforin-abhängig ist, zur Apoptose (Helgason et al., 1992; Ostergaard et al., 1987; Rouvier et al., 1993).

2.1.2.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zum angeborenen Immunsystem und nehmen eine wichtige Stellung im körpereigenen Abwehrsystem ein, da sie im Gegensatz zu T-Lymphozyten in der Lage sind, Antigene ohne eine vorherige Antigenpräsentation zu erkennen und Zielzellen spontan zu lysieren (Lanier et al., 1986d; Munson und Phillips, 2000; Ritz et al., 1988; Robertson und Ritz, 1990). Dadurch, dass diese Zellen nicht der MHC-Restriktion (siehe 2.1.2.2) unterliegen, wurden sie der „natürlichen Immunität“ zugeordnet und bekamen dadurch den Namen „natürliche“ Killerzellen (Lanier et al., 1986d). Ihre Zielzellen stellen in erster Linie Zellen dar, die keine oder veränderte MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren („Missing-self-Hypothese“) (Kärre, 1985). Alle anderen Zellen werden durch einen sogenannten Killerzell-inhibierenden Rezeptor (KIR), der mit den MHC-Klasse-I-Molekülen interagiert, vor der Lyse geschützt (Kärre, 1985; Ljunggren und Karre, 1990; Yokoyama, 1995).

Die großen azurophilen Granula in ihrem Zytoplasma verleihen ihnen das granuliertes Aussehen und begründen ihre Zugehörigkeit zur Gruppe der Large Granular Lymphocytes (Tompkins et al., 1983). Durch Interleukin 2 können sie aktiviert und ihre Proliferation gesteigert werden (Tompkins et al., 1989). Natürliche Killerzellen spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Tumorzellen und Virus-infizierten Zellen. Es ist sowohl in der Tiermedizin als auch in der Humanmedizin bekannt, dass diese Zellen zur Lyse von Papilloma- oder Herpesvirus-infizierten Zellen befähigt sind (Biron et al., 1989; Orange, 2002; Tompkins et al., 1983). Beim Menschen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass bei Infektionen, bei denen es zu einer drastisch reduzierten Anzahl von natürlichen Killerzellen kommt, häufiger vorkommende und schwerere Verläufe von viralen Infektionen zu verzeichnen sind (Wood et al., 2011). Bei Katzen findet sich eine ähnliche Reduktion von natürlichen Killerzellen zum Beispiel nach einer Infektion mit dem feline Immundefizienzvirus (FIV) (Hanlon et al., 1993; Howard et al., 2010).

2.1.2.2 Zytotoxische T-Zellen

Die Zuordnung zu den Large Granular Lymphocytes haben die zytotoxischen T-Zellen in erster Linie ihrem morphologischen Charakteristikum, den großen, azurophilen Granula zu verdanken. Der bedeutendste Unterschied zu den natürlichen Killerzellen liegt in der MHC-I-Restriktion. 1996 erhielten Zinkernagel und Doherty den Medizin-Nobelpreis für ihre Entdeckung, dass CD8-positive zytotoxische T-Zellen Virus-infizierte Zellen lediglich nach einer vorherigen Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle erkennen können (Zinkernagel,

1997). Dies bedeutet, dass die zytotoxischen T-Zellen nicht zur spontanen zytotoxischen Aktivität befähigt sind, sondern auf die Antigenpräsentation angewiesen sind, um ihr Antigen zu erkennen (sogenannte MHC-Restriktion).

2.1.2.2.1 Der T-Zell-Rezeptor (TCR)

Während der Entwicklung der T-Zellen kommt es zu einem Rearrangement der vier Antigenrezeptor-Gene, α (TRA), β (TRB), γ (TRG) und δ (TRD), wodurch zwei, voneinander unterscheidende T-Zell-Rezeptortypen, $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen entstehen (Brenner et al., 1986; Pardoll et al., 1987). Durch die Reihenfolge der Rekombination, bei der es immer erst zur Rekombination des TRDs und des TRGs und in einem Teil der Fälle dann noch des TRAs und TRBs kommt, enthalten auch die $\alpha\beta$ -T-Zellen ein rekombinantes TRG (Pardoll et al., 1987; Raulet et al., 1985; Theodorou et al., 1994). Infolgedessen bietet sich die Untersuchung des TRGs zum Nachweis eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements an (Moore et al., 2005; Weiss, 2008).

2.1.2.3 Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen)

Als eine Teilgruppe der natürlichen Killerzellen wurden von Schmidt et al. (1986) die Large Granular Lymphocytes aus dem Blut gesunder Menschen bezeichnet, die einen T-Zell-Phänotyp aufweisen, natürliche Killerzell-Antigene (NKH1) exprimieren und zur spontanen zytotoxischen Aktivität befähigt sind. Der Begriff der NKT-Zellen, Natürliche Killer T-Zellen, spiegelt die Ambivalenz dieses Zelltyps wieder, der einerseits die Merkmale der natürlichen Killerzellen (Expression von NK1.1-Markern, CD161 bei humanen Zellen), andererseits die der zytotoxischen T-Zellen aufweist (CD3⁺, TCR-Rearrangement) (Makino et al., 1995). Eine Definition der NKT-Zellen gestaltete sich dahin gehend schwierig, als dass es zwischen dem Expressionsmuster des Menschen und dem der Maus einige Unterschiede gibt. So exprimieren die meisten Mausstämme beispielsweise nicht den NK1.1-Marker (Godfrey et al., 2004). Daher war auch die Namensgebung für diesen Zelltyp zunächst uneinheitlich. Begriffe wie natürliche T-Zellen (Bix und Locksley, 1995; Joyce et al., 1996) konnten sich dann jedoch nicht gegenüber dem heute gebräuchlichen Begriff der natürlichen Killer T-Zellen durchsetzen (Makino et al., 1995). Laut der derzeitige Definition zählen solche Zellen zu den Natürlichen Killer T-Zellen, die NK-Zellmarker exprimieren (beispielsweise NK1.1; bei Mäusen nur eingeschränkt), einer CD1d-Restriktion unterliegen und einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor exprimieren (Bendelac et al., 2007). Als ein wichtiger Ligand der NKT-Zellen erfolgt die Aktivierung durch α -Galactosylceramide (α -GalCer) (Kawano et al., 1997). Neuere Studien brachten zu Tage, dass es auch einen CD1d-unabhängigen Weg der Zellyse durch

einen NKG2D Rezeptor gibt, der auf CD4⁺ Zellen exprimiert wird (Kuylenstierna et al., 2011). Bei den Haustieren ist dieser Zelltyp noch wenig erforscht. Bei Schwein und Pferd konnten NKT/CD1d-Zellen nachgewiesen werden (Looringh van Beeck et al., 2009). Bei der Katze konnte ein funktionelles CD1D-Gen sequenziert werden, daher konnte auf ein funktionierendes NKT/CD1d-System rückgeschlossen werden (Looringh van Beeck et al., 2009). Bei den untersuchten Wiederkäuern ist das CD1D-Gen zwar vorhanden, jedoch ohne Funktion, was den Schluss nahelegte, dass Wiederkäuer keine NKT-Zellen haben, da bei CD1d^{-/-} Mäusen ebenfalls keine NKT-Zellen nachgewiesen werden konnten (Chen et al., 1997; Looringh van Beeck et al., 2009; Van Rhijn et al., 2006). Vermeulen et al. (2012) nutzte für die Zuordnung der feline Zellen zu den NKT-Zellen lediglich die Expression von CD56 bei gleichzeitiger Expression von CD3. Entsprechend dieser Einteilung für die Katze machte der Anteil der NKT-Zellen an den CD56-positiven, peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) 20 % aus.

2.1.3 Überprüfung der spontanen Zytotoxizität

Wie bereits zu Anfang beschrieben, sind natürliche Killerzellen zur spontanen zytotoxischen Aktivität ohne vorherige Antigenpräsentation befähigt (Lanier et al., 1986d; Ritz et al., 1988). Zur Überprüfung der spontanen Zytotoxizität können verschiedene kolorimetrische Methoden wie der Rose-Bengal-Assay (RBA) oder der Methylthiazol-Tetrazolium (MTT)-Test zum Einsatz kommen. Meist wird dafür der Rose-Bengal-Assay verwendet, aber auch der MTT-Test kann hierfür genutzt werden (Ribeiro-Dias et al., 2000). Beide stellen eine Alternative zu dem früher genutzten ⁵¹Chromium-Release-Assay (CRA) dar, welche heute aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit und der Vermeidung von radioaktivem Abfall dem CRA vorgezogen wird (Gondolf et al., 1996).

2.1.3.1 Zielzellen

Das wichtigste Kriterium für die Auswahl der Zielzelllinie ist das adhärenthes Wachstum der gewählten Zelllinie. Krakowka beschrieb bereits 1983 die Nutzung einer kaninen Schilddrüsenadenokarzinomzelllinie (CTAC) für den Nachweis der spontanen zytotoxischen Aktivität kaniner NK-Zellen (Krakowka, 1983). Da sich die Zelllinie in diversen Versuchen zur Zytotoxizität bereits bewährt hat, wurde sie auch in dieser Dissertation verwendet (Greeley et al., 1996; Preis, 2008; Schmitz, 2000; Schömig, 2008). Unklar war bis zu diesem Zeitpunkt, in wieweit die CTAC-Zellen auch auf feline Zellen ansprechen. Zur Kontrolle wurde als zweite Zelllinie, die der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber als nicht sensibel beschrieben ist, eine Vero-Zelllinie eingesetzt (Funk et al., 2003).

2.2 Large Granular Lymphocyte (LGL)-Lymphome

Zu den Large Granular Lymphocyte Lymphomas, kurz den (LGL)-Lymphomen, werden hämatopoetische Neoplasien gezählt, deren Zellen die für die Large Granular Lymphocytes (siehe unter 2.1) charakteristischen, großen, azurophilen, intrazytoplasmatischen Granula enthalten. In einer Studie von Krick et al. (2008) betrug der Anteil der LGL-Lymphome an der Gesamtzahl der zwischen 1996-2004 bei Katzen diagnostizierten Lymphome lediglich 7 %. Sie werden in der WHO-Klassifikation den „T-cell and NK-Cell Lymphoid Neoplasms zugeordnet“ (Valli et al., 2002).

2.2.1 WHO-Klassifikation

Heutzutage gilt die WHO-Klassifikation von 2002 als der internationale Standard zur Klassifikation von hämatopoetischen Proliferationen der Haustiere (Valli et al., 2002). Die Einteilung erfolgt zunächst in vier Hauptgruppen: die B-Zell-Neoplasien, die T-Zell- und NK-Zell-Neoplasien, sonstige Tumoren und die gutartigen lymphoiden Proliferationen. Darüber hinaus werden weitere Untergruppen differenziert.

WHO-Klassifizierung der hämatopoetischen Tumoren der Haustiere (Auszug: Tumoren des lymphoiden Systems)

1. B-Cell Lymphoid Neoplasms

- 1.1. Precursor B-cell neoplasms
 - 1.1.1. B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma
- 1.2. Mature B-cell lymphocytic
 - 1.2.1. B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma
 - 1.2.2. B-cell lymphocytic lymphoma intermediate type (LLI)
 - 1.2.3. Lymphoplasmacytic lymphoma (LPL)
 - 1.2.4. Follicular lymphomas
 - 1.2.4.1. Mantle cell lymphoma (MCL)
 - 1.2.4.2. Follicular center cell lymphoma I
 - 1.2.4.3. Follicular center cell lymphoma II
 - 1.2.4.4. Follicular center cell lymphoma III
 - 1.2.4.5. Nodal marginal zone lymphoma
 - 1.2.4.6. Splenic marginal zone lymphoma
 - 1.2.5. Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
 - 1.2.6. Hairy cell leukemia
 - 1.2.7. Plasmacytic tumors
 - 1.2.7.1. Indolent plasmacytoma
 - 1.2.7.2. Anaplastic plasmacytoma
 - 1.2.7.3. Plasma cell myeloma
 - 1.2.8. Large B-cell lymphomas
 - 1.2.8.1. T-cell-rich B-cell lymphoma

- 1.2.8.2. Large cell immunoblastic lymphoma
- 1.2.8.3. Diffuse large B-cell (noncleaved, cleaved) lymphoma
- 1.2.8.4. Thymic B-cell lymphoma (mediastinal B)
- 1.2.8.5. Intravascular large B-cell lymphoma
- 1.2.9. Burkitt-type lymphoma
 - 1.2.9.1. High-grade B-cell lymphoma, Burkitt-like
- 2. T-cell and NK-Cell Lymphoid Neoplasms**
 - 2.1. Precursor T-cell neoplasms
 - 2.1.1. T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma
 - 2.2. Mature T-cell and NK neoplasms
 - 2.2.1. Large granular lymphoproliferative disorders (LGL)**
 - 2.2.1.1. T-cell chronic lymphocytic leukemia
 - 2.2.1.2. T-cell LGL lymphoma/leukemia
 - 2.2.1.3. NK-cell chronic lymphocytic leukemia
 - 2.2.2. Cutaneous T-cell neoplasms
 - 2.2.2.1. Cutaneous epitheliotropic lymphoma (CEL)
 - 2.2.2.1.1. CEL, mycosis fungoides type
 - 2.2.2.1.2. CEL, pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp) type
 - 2.2.2.2. Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma
 - 2.2.3. Extranodular/peripheral T-cell lymphoma (PTCL)
 - 2.2.3.1. PTCL, mixed lymphoid tumor
 - 2.2.3.2. PTCL, mixed inflammatory type
 - 2.2.4. Adult T-cell like lymphoma/leukemia
 - 2.2.5. Angioimmunoblastic lymphoma (AILD)
 - 2.2.6. Angiotropic lymphoma
 - 2.2.6.1. Angiocentric lymphoma
 - 2.2.6.2. Angioinvasive lymphoma
 - 2.2.7. Intestinal T-cell lymphoma
 - 2.2.8. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)
- 3. Miscellaneous Tumors**
 - 3.1. Mast cell tumor
 - 3.2. Hodgkin-like lymphoma
 - 3.3. Thymoma
 - 3.4. Thymic carcinoma (malignant thymoma)
 - 3.5. Myelolipoma
 - 3.6. Malignant fibrous histiocytoma
- 4. Benign Lymphoid Proliferations**
 - 4.1. Follicular lymphoid hyperplasia
 - 4.2. Atypical follicular lymphoid hyperplasia

1972 wurde erstmals eine Neoplasie bei einer Katze beschrieben, deren Zellen große Granula aufwiesen, welche zu diesem Zeitpunkt als „Globule Leukocytes“ bezeichnet wurden (Finn und Schwartz, 1972). Diese „Globule Leukocytes“ wurden später von anderen Autoren den intraepithelialen Large Granular Lymphocytes zugeordnet (Kariya et al., 1997). Erst 14 Jahre später wurde die erste als „Large Granular Lymphoma“ bezeichnete Neoplasie bei einer FeLV-negativen Katze näher beschrieben und charakterisiert (Franks et al., 1986). Zwei Jahre darauf wurde ein LGL-Lymphom einer FeLV-positiven Katze untersucht, aus dem eine der beiden bis heute beschriebenen LGL-Zelllinien isoliert und etabliert wurde (Goitsuka et al., 1993; Goitsuka et al., 1988). Diese Zelllinie wurde aufgrund der fehlenden Expression von CD4 und CD8 den natürlichen Killerzellen zugeordnet.

Die Verteilung der beiden Ursprungszelltypen der LGL-Lymphome ist bei der Katze schwierig festzumachen, da insbesondere in älteren Veröffentlichungen keine Untersuchungen zur genaueren Differenzierung der Large Granular Lymphocytes gemacht worden sind oder die Ergebnisse nicht sicher einem Zelltyp zugeordnet werden konnten (Darbes et al., 1998; Franks et al., 1986; Kariya et al., 1997; Krick et al., 2008; Wellman et al., 1992). In einer Studie von 1998 konnte von sechs untersuchten LGL-Lymphomen zwei den T-Zell-Neoplasien zugeordnet werden, die restlichen vier entsprechend den natürlichen Killerzellen (Endo et al., 1998). In einer neueren Studie von 2006, bei der 21 Katzen mit LGL-Lymphom untersucht wurden, zeigte sich hingegen eine deutliche Dominanz (90 %) des zytotoxischen T-Zellphenotyps (Roccabianca et al., 2006).

Die LGL-Lymphome treten vor allem im mittleren Abdomen, genauer gesagt in den regionalen Lymphknoten, im Darm, im Pankreas, der Leber, der Niere und der Milz, seltener in anderen Lokalisationen wie der Lunge, der Speicheldrüse oder im Perikard auf (Cheney et al., 1990; Darbes et al., 1998; Endo et al., 1998; Franks et al., 1986; Wellman et al., 1992). In einem Fall konnte ein LGL-Lymphom im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden (Tsuboi et al., 2010).

LGL-Lymphome gelten bei der Katze als aggressiv und haben auch aufgrund ihres schlechten Ansprechens auf Chemotherapie eine schlechte Prognose (Franks et al., 1986; Goitsuka et al., 1988; Krick et al., 2008; Valli et al., 2002; Wellman et al., 1992). Die klinischen Anzeichen sind zumeist unspezifisch und äußern sich in Anorexie, Lethargie und Vomitus, häufig lässt sich eine palpable Masse im Abdomen nachvollziehen (Endo et al., 1998; Franks et al., 1986; Goitsuka et al., 1988; Kariya et al., 1997; Roccabianca et al., 2006; Wellman et al., 1992). Zumeist sind ältere Tiere betroffen; das mediane Alter liegt bei 8 bis 13 Jahren, jedoch

können auch Jungtiere betroffen sein (Cheney et al., 1990; Endo et al., 1998; Franks et al., 1986; Krick et al., 2008; Roccabianca et al., 2006; Wellman et al., 1992). Bei Diesen liegt zumeist eine Assoziation mit dem Felinen Leukämie-Virus (FeLV) zu Grunde (Endo et al., 1998; Hardy et al., 1980). Eine Geschlechtsdisposition konnte beim Menschen nicht nachgewiesen werden (Loughran und Starkebaum, 1987). Bei der Katze hingegen beschreiben Autoren von älteren Veröffentlichungen zwar, dass keine Geschlechtsdisposition aufgrund der niedrigen Fallzahlen feststellbar wäre, jedoch lässt sich heute sagen, dass 66 % der beschriebenen LGL-Lymphome bei weiblichen oder weiblich-kastrierten Katzen auftraten und nur 34 % bei männlichen bzw. männlich-kastrierten Tieren (Cheney et al., 1990; Darbes et al., 1998; Endo et al., 1998; Franks et al., 1986; Goitsuka et al., 1988; Järplid und Feldman, 1993; Roccabianca et al., 2006; Tsuboi et al., 2010; Wellman et al., 1992).

2.2.2 Large Granular Lymphocyte-Lymphome beim Menschen

Beim Menschen wird zwischen der T-Zell-Large Granular Lymphocytic-Leukämie (T-LGL), der chronischen, lymphoproliferativen Störung der natürlichen Killerzellen und der aggressiven NK-Zellen-Leukämie unterschieden (ANKL) (Swerdlow et al., 2008). Die T-LGL ist langsam progressiv und zeichnet sich mit einer mittleren Überlebenszeit von 13 Jahren und einem guten Ansprechen auf Chemotherapeutika aus (Dhodapkar et al., 1994). Sie ist relativ selten und macht ungefähr 2-3 % der Leukämien aus (Swerdlow et al., 2008). Die chronische lymphoproliferative Störung der natürlichen Killerzellen ist eine ebenfalls selten auftretende Erkrankung und häufig über eine lange Zeit klinisch unauffällig (Swerdlow et al., 2008). Die aggressive NK-Zellen Leukämie ist zumeist mit einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus vergesellschaftet (Ryder et al., 2007; Song et al., 2002). Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Leukämieformen kommt es hierbei zu schwerwiegenden Erkrankungen mit vorsichtiger Prognose und einer mittleren Überlebensdauer von um die 50 Tagen (Ryder et al., 2007; Song et al., 2002; Suzuki et al., 2004).

2.3 Zelllinien

Zelllinien sind als von ihrem Ursprungsorganismus unabhängige, durchgehend wachsende Zellen definiert (Drexler und MacLeod, 2003). Dabei lassen sich Zellkulturen, die sich nur über einen begrenzten Zeitraum kultivieren lassen, von Zellkulturen, die ohne zeitliche Einschränkung dauerhaft (permanent) am Leben gehalten werden können, unterscheiden. Als

permanente Zellkultur werden dabei Zellen eingestuft, die über ein Jahr konstant in Kultur gehalten werden konnten (Drexler und MacLeod, 2003).

Zelllinien sind ein wichtiger Bestandteil der Forschung, insbesondere der Tumorforschung, da durch sie gut zu untersuchende und experimentell beeinflussbare Zellpopulationen vorliegen. Ergebnisse aus der Zellkulturforschung können Hinweise auf die in-vivo-Verhältnisse geben. Insbesondere die Untersuchungen grundlegender Pathogenitätsmechanismen werden durch die Etablierung von Zelllinien ermöglicht. Zudem stellen Zelllinien einen fast unerschöpflichen Materialvorrat dar und auf der ganzen Welt können Forschungsgruppen mit demselben Ausgangsmaterial arbeiten, wodurch eine hervorragende Vergleichbarkeit ermöglicht wird. Zahlreiche Zelllinien sind in sogenannten Zellkulturbänken wie der ATTC (American Type Culture Collection), der ECACC (European Collection of Cell Cultures) oder der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) käuflich zu erwerben. Somit hat sich die Zellkulturtechnik mit der Zeit immer weiter entwickelt und stellt vor allem heutzutage eine wichtige Alternative zu Tierversuchen dar.

Die erste Etablierung einer humanen, permanenten, adhärennten Zelllinie aus Tumorgewebe gelang bereits in den 50er Jahren aus einem Zervixkarzinom einer Frau und wurde in Anlehnung an die Patientin Henrietta Lacks als HeLa-Zellen bezeichnet (Gey et al., 1952). Sie wird bis heute von Forschern genutzt und ist mittlerweile eine der am besten untersuchten Zelllinien überhaupt. Die ersten humanen hämatopoetischen Zellen wurden 1963 in Nigeria von Patienten mit Burkitt-Lymphomen isoliert, wobei die wohl noch heute bekannteste die Raji-Zelllinie ist (Pulvertaft, 1964). Seitdem gab es zahlreiche Forschungsgruppen, die die unterschiedlichsten hämatopoetischen Zelllinien etablierten (Drexler und Macleod, 2010).

2.3.1 Feline Lymphomzelllinien

Auch von Haustieren gibt es verschiedene Lymphomzelllinien, die aufgrund ihrer Charakteristika für die unterschiedlichsten Forschungsgebiete Anwendung finden. Von der Katze wurde insbesondere während der Zeit, als sich die ersten Forschergruppen mit FeLV-Infektionen und dem daraus resultierenden Auftreten von Lymphomen beschäftigten, zumeist FeLV-positive Zelllinien etabliert. Auch bei der Erforschung von neuen Therapieansätzen konnten feline Lymphomzelllinien von Nutzen sein (Mochizuki et al., 2012). Eine der ersten und bereits gut untersuchten Zelllinien ist die Zelllinie FL74, welche vor allem in Studien, die sich mit FeLV-Infektionen befassen, Verwendung findet. Sie wurde aus einem in der Niere lokalisierten Lymphom einer Katze isoliert, welche experimentell mit FeLV infiziert wurde (Theilen et al., 1969). Aufgrund ihres immunzytologischen Phänotyps konnte sie den T-

Zellen zugeordnet werden (Cockerell et al., 1976). Da die Tumorerkrankungen in der heutigen Zeit sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin immer mehr an Bedeutung gewonnen haben, liegt mit ein Hauptaugenmerk auf der Erforschung von Mechanismen, die zur Entstehung von Tumoren beisteuern. Da durch Zelllinien ein hervorragend zur Tumorforschung geeignetes Objekt vorliegt, wurden im Laufe der Zeit vielfältige Untersuchungen an Tumorzelllinien durchgeführt. So zeichnet sich FL74 beispielsweise durch einen instabilen Chromosomensatz und eine moderate Zentrosomenhyperamplifikation, die mit mehreren stillen p53-Mutationen vergesellschaftet ist, aus (Miki et al., 2004). Anders verhält es sich bei der FeLV-negativen Zelllinie 3201, bei der eine Missensemutation sowie zwei stille Mutationen in der p53-Sequenz nachgewiesen werden konnte (Miki et al., 2004; Mochizuki et al., 2012; Okuda et al., 1994; Snyder et al., 1978). Zudem wies diese Zelllinie numerische Chromosomenaberrationen sowie eine Zentrosomenhyperamplifikation bei 20 % der Zellen auf (Miki et al., 2004). Eine weitere, FeLV-positive Lymphomzelllinie (BKD), wurde aus einem im Mediastinum lokalisierten Tumor isoliert und über ein Jahr kultiviert (Engelman et al., 1986). Diese Zellen exprimierten weder B- noch T-Zelloberflächenmarker und hatten einen diploiden Chromosomensatz ($2n=38$) (Engelman et al., 1986). Ein Jahr später wurde die T-Zelllinie T17 aus einem im Thymus lokalisierten Lymphom einer jungen Katze isoliert, bei der FeLV-Provirus nachgewiesen werden konnte (Fulton et al., 1987). Interessant ist diese Zelllinie für die vorliegende Arbeit dahingehend, dass bei ihr keine p53-Aberrationen gefunden werden konnten (Okuda et al., 1994). Anders verhält es sich bei der Zelllinie FT-1. Sie wurde aus dem Thymuslymphom einer spontan mit FeLV infizierten Katze isoliert, weist chromosomale Aberrationen, eine stille Mutation auf Höhe des 591 Nukleotids des p53-Gens, jedoch keine Zentrosomenhyperamplifikationen auf (Miki et al., 2004; Miura et al., 1987; Mochizuki et al., 2012). Ebenfalls FeLV-positiv ist eine 2004 etablierte T-Zelllinie (KO-1), bei der eine Aneuploidie ($2n+3=41$), eine stille Mutation des p53-Gens auf Höhe des 231sten Nukleotids, jedoch keine Zentrosomenhyperamplifikation nachgewiesen werden konnte (Fujino et al., 2004; Miki et al., 2004). Die R96-Zelllinie wurde im gleichen Jahr etabliert und wurde aus dem Thoraxerguss einer Katze mit multizentrischem Lymphom isoliert (Miki et al., 2004). Sie weist eine numerische Chromosomenaberration, eine Zentrosomenhyperamplifikation sowie eine stumme Punktmutation im p53-Gen auf Höhe des 591sten Nukleotids auf (Miki et al., 2004). Mochizuki et al. (2011) etablierten erst vor ein paar Jahren eine FeLV-negative Zelllinie aus dem Thoraxerguss einer 9 Jahre alten, männlich-kastrierten Abessinierkatze. Aufgrund ihres immunhistologischen Phänotyps ($CD20^+/CD79\alpha^+/CD3^-$) und eines nicht nachweisbaren T-Zell-Rezeptor-Rearrangements,

wurde die Zelllinie den B-Zellen zugeordnet (Mochizuki et al., 2011). Auch bei ihr konnten zwei stille Mutationen des p53-Gens nachgewiesen werden (Mochizuki et al., 2012).

2.3.2 Feline Large Granular Lymphocyte-Zelllinien

Bis heute gibt es lediglich zwei beschriebene und näher charakterisierte feline Large Granular Lymphocyte-Lymphomzelllinien.

Cheney et al. isolierten 1990 aus einer Tumormasse im Abdomen einer 13-jährigen, männlich-kastrierten Katze eine Zelllinie (MCC), welche die für die LGLs typischen Charakteristika, die großen zytoplasmatischen Granula, aufwies (Cheney et al., 1990). In weiteren Versuchen wurden die Zellen als natürliche Killerzellen eingestuft, da kein T-Zell-Rezeptor-Rearrangement oder andere T-Zell-spezifischen Antigene immunzytologisch nachgewiesen werden konnten (Cheney et al., 1990). Die FeLV-negative Zelllinie war insgesamt für 27 Monate konstant in Kultur, die Populationsverdopplungszeit wurde mit 39 Stunden angegeben und es wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung vorgenommen (Cheney et al., 1990). Bei dieser Zelllinie konnte eine stille Mutation des p53-Gens auf Höhe des 231sten Nukleotids und eine Missensemutation auf Höhe des 639sten Nukleotids registriert werden.

Die zweite LGL-Zelllinie (FGL) wurde von Goitsuka et al. 1988 aus dem Aszites einer vier Jahre alten, weiblich-kastrierten, FeLV-positiven Katze mit einem intestinalen Lymphom isoliert. Die neoplastischen Zellen wiesen weder B- noch T-Zell-Oberflächen-Antigene auf und wurden deshalb von den Autoren den natürlichen Killerzellen zugeordnet (Goitsuka et al., 1993; Goitsuka et al., 1988). Diese Zelllinie wurde für mehr als fünf Jahre in Kultur gehalten (Goitsuka et al., 1993). Die spontane zytotoxische Aktivität der Zellen gegenüber einer humanen Erythroblastenleukämie-Zelllinie (K562) konnte mit Hilfe des ⁵¹Chromium-Release-Assay (CRA) bewiesen werden (Goitsuka et al., 1993). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung wurde ebenfalls durchgeführt, die Populationsverdopplungszeit wurde mit 36 Stunden angegeben (Goitsuka et al., 1993). Zudem konnte die Expression des Interleukin 2-Rezeptors festgestellt werden.

2.4 Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität kann in Form von Chromosomenbrüchen, Amplifikation oder Deletion von einzelnen Segmenten oder durch den Zugewinn oder Verlust von ganzen Chromosomen auftreten. Dass eine genetische Instabilität in Form einer chromosomalen Aberration einen entscheidenden Schritt zur Tumorgenese beitragen kann, ist hinlänglich bekannt und untersucht (Aichel, 1911; Levan, 1956; Nowell, 1976; Schinz, 1928). Schon in den Anfängen der Tumorforschung fiel auf, dass bei tumorös entarteten Zellen eine Abweichung von normalen Mitosen und Metaphaseplatten zu finden war (Hansemann, 1890). Boveri (1914) interpretierte diese Entdeckung als Ursache für die Entstehung von Tumoren. In fast allen soliden Tumoren konnte in verschiedensten Studien beim Menschen eine genetische Instabilität nachgewiesen werden, wobei die Instabilität sowohl numerische als auch strukturelle Chromosomenaberrationen umfasste (Lengauer et al., 1997, 1998).

Lengauer et al. (1998) unterteilten die Ursachen, die zur genetischen Instabilität einer Zelle führen, in vier Typen: Den ersten Typ fassten die Autoren unter dem Begriff der „subtilen Sequenzänderungen“ zusammen und beschreiben damit Vorgänge der Genmutation, wie die Deletion oder Insertion. Der zweite Typ stellt die Genommutation dar, welche durch eine Veränderung der Chromosomenzahl (Aneuploidie) manifest wird und häufig bei Tumoren beobachtet werden kann (Duesberg et al., 1999). Die dritte Gruppe umfasst Chromosomenmutationen, zu denen die unter den Begriff der Translokation fallenden Veränderungen gehören und sich durch Anlagern eines Chromosomensegmentes oder eines ganzen Chromosoms an ein anderes charakterisieren. Die letzte Gruppe bezeichnen die Autoren als „Gen-Amplifikation“, die die Amplifikation von Onkogenen wie zum Beispiel N-myc umfasst, welche in 30 % der Neuroblastome vorkommt (Seeger et al., 1985). Die Verfasser unterstreichen in ihrem Artikel, dass eine Mutation in einer Einzelzelle alleine noch nicht zum Entstehen eines Tumors führt, sondern weitere Komponenten, wie die klonale Expansion, eine wichtige Rolle spielen. Als eine Ursache für die Entstehung von Tumoren können Mutationen von Genen, die Mitose-Checkpunkte regulieren, angesehen werden (Cahill et al., 1998).

Duesberg et al. (1998) konstruierten einen „Ploidy Factor“, indem sie die veränderte Chromosomenanzahl durch die physiologische Chromosomenanzahl teilten. Dabei konnte bei den in-vitro-Versuchen mit Chinese Hamster Embryo (CHE)-Zellen festgestellt werden, dass sich der Karyotyp umso instabiler zeigte, je höher dieser Quotient „Ploidy Factor“ war.

2.4.1 Aneuploidie

Aneuploidie ist eine numerische Chromosomenaberration und beschreibt das vermehrte Auftreten oder das Fehlen von einem oder mehreren Chromosomen. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts erkannten Forscher den Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Tumorgenese (Hansemann, 1890). Aneuploidie und chromosomale Instabilität sind bei Tumoren häufig auftretende Phänomene und können selbst in frühen, dysplastischen, jedoch noch nicht neoplastischen Stadien beobachtet werden (Chanvitan et al., 1997; Hofstadter et al., 1986; Steinbeck, 1997). Dieses Wissen lässt auf einen Zusammenhang zwischen verändertem DNS-Gehalt und der Entwicklung von Tumoren schließen (Pihan und Doxsey, 1999). Pihan und Doxsey (1999) stellten die These der drei Mechanismen zur Entstehung der Aneuploidie auf. Dabei unterscheiden die Autoren die sporadische Missegregation (fehlerhafte Teilung) von Tumorprogenitorzellen, Polyploidie (Zunahme der Chromosomenzahl) durch verschiedenste Mechanismen (Zellfusion, multiple S-Phase-Zyklen ohne abschließende Mitose oder fehlerhafte Spindelapparate) und einen dauerhaften Defekt bei der Chromosomensegregation in einer Tumorprogenitorzelle voneinander, wobei die Autoren selber letztere Variante präferieren.

2.4.2 Zentrosomen

Während der Mitose kommt es zur Segregation der Schwesterchromatiden durch den Spindelapparat, sodass jede Tochterzelle einen vollständigen Chromosomensatz zur Verfügung hat. Zentrosomen spielen bei Eukaryoten als primäre Mikrotubuli-organisierende Zentren (MOTCs) eine wichtige Rolle in der Organisation des dazu benötigten Spindelapparates. Sie ermöglichen die korrekte Trennung der Schwesterchromatiden, wobei sie nicht essentiell für den Aufbau eines Spindelapparates, jedoch wichtig für die Chromosomensegregation sind (Euteneuer und McIntosh, 1981; Heald et al., 1996; Khodjakov et al., 2000; Oakley, 1992).

Ein Zentrosom besteht aus zwei lichtmikroskopisch gerade noch erkennbaren Zentriolen, welche in ein perizentrioläres Material (PCM) eingebettet sind. Dieses wird auch als Zentromatrix bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle in der Mikrotubuli-Nukleation, der Neubildung von Mikrotubuli (Kellogg et al., 1989; Schnackenberg und Palazzo, 1999). Die beiden Zentriolen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur sowie auch in ihren biochemischen Eigenschaften (Lange und Gull, 1995; Paintrand et al., 1992). Sie bestehen beide aus neun jeweils aus einem Triplett bestehenden Mikrotubuli, deren Grundbausteine die aus α - und β -Tubulin zusammengesetzten Heterodimere sind, jedoch weist die 1,5

Generationen ältere Mutterzentriole distale und subdistale Fortsätze auf, welche der im vorherigen Zellzyklus gebildeten Tochterzentriolen fehlen.

Die Mikrotubuli haben ein wachsendes, sogenanntes Plus- und ein dem Zentrosom zugewandtes und im perizentriolären Material befindliches Minus-Ende, in dem der γ -Tubulin enthaltene Ringkomplex (γ TuRC) lokalisiert ist (Moritz et al., 1995; Zheng et al., 1995). Das perizentrioläre Material beinhaltet noch weitere Proteine, wie zum Beispiel das Pericentrin, welches eine strukturelle Komponente des perizentriolären Materials darstellt. Anti-Pericentrin-Antikörper vermindern die Ausbildung des Spindelapparates, beeinflussen jedoch nicht die Mikrotubuli-Nukleation (Doxsey et al., 1994).

2.4.3 Zellzyklus

Bereits 1951 wurden der Grundstein für die Erforschung des Zellzyklus gelegt und die charakteristischen Zellzyklusphasen beschrieben (Howard und Pelc, 1951). Der Zellzyklus lässt sich in die G₁-, S-, G₂- und M-Phase einteilen. Dabei werden die ersten drei auch unter dem Begriff „Interphase“ zusammen gefasst. Zusätzlich gibt es noch eine G₀-Phase, die sogenannte Ruhephase. In diese treten die ausdifferenzierten Zellen nach der G₁-Phase ein, in der sie sich nicht mehr weiter differenzieren. In der G₁-Phase (G von engl. gap=Lücke) erfolgt in erster Linie die Vorbereitung auf eine Zellteilung und die RNS-Synthese. Zu diesem Zeitpunkt besteht das Chromosom lediglich aus einem Chromatid, dem sogenannten Ein-Chromatid-Chromosom. In der darauf folgenden S-Phase (S=Synthese) kommt es zur Verdopplung der DNS, sodass aus jedem Ein-Chromatid-Chromosom ein Zwei-Chromatid-Chromosom entsteht. Im Anschluss an die G₂-Phase erfolgt die M-Phase.

2.4.4 Mitose

Der Begriff „Mitose“ wurde bereits von Walter Flemming (1882) geprägt. Flemming (1882) war es auch, der die erste genauere Beschreibung der Mitose und der einzelnen Phasen als wichtige Bestandteile des Zellzyklus lieferte. Die Mitose (M-Phase) lässt sich in eine Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase einteilen. In der Prophase kondensieren die Chromosomen. Sie bestehen jetzt aus zwei deutlich voneinander getrennten Chromatiden, die durch das Zentromer in der Mitte zusammen gehalten werden. Die in der Interphase ebenfalls verdoppelten Zentrosomen trennen sich und wandern zu entgegengesetzten Polen und bauen dadurch eine Polspindel auf. Da die Mikrotubuli zu diesem Zeitpunkt noch sternförmig um die Zentrosomen herum angelagert sind, spricht man von der sogenannten „Aster“. In der Metaphase werden die Chromosomen in der Äquatorialebene ausgerichtet und bilden die Metaphaseplatte. Anschließend kommt es in der

Anaphase zur Auftrennung der beiden Chromatiden, welche dann jeweils zu einem Spindelpol hingezogen werden. Als Abschluss erfolgen in der Telophase eine Dekondensation der Chromosomen und eine Bildung der Kernhülle.

2.4.5 Zentrosomenreproduktion

Bei tierischen Zellen ist die DNS-Replikation eng mit der Zentrosomenreplikation vergesellschaftet und durchläuft die gleichen Phasen (Mazia, 1987). Die Reproduktion der Zentrosomen kann grundsätzlich in vier Phasen eingeteilt werden. Dabei sollte im Normalfall ein Zentrosom pro Zelle vorhanden sein, welches sich pro Zellzyklus einmal repliziert.

Während der späten G_1 -Phase kommt es zur Trennung des Mutter-Tochter-Zentriolenpaars, was als „Centrosome disorientation“ bezeichnet wird (Kuriyama und Borisy, 1981). Der nächste Schritt, die Duplikation der Zentrosomen („centrosome duplication“), erfolgt am Anfang der S-Phase bzw. während der S-Phase. Es entstehen kurze Tochterzentriolen oder Prozentriolen, die sich während der S-Phase und der G_2 -Phase verlängern (Kuriyama und Borisy, 1981). Während der G_2 -Phase erfolgt die endgültige Trennung („Centrosome disjunction“) der Zentrosomen. Somit kommt es zur Ausbildung von zwei Mutter-Tochter-Zentriolen, die gemeinsam jeweils ein Tochterzentrosom bilden (Aubin et al., 1980; Kochanski und Borisy, 1990). Der abschließende Schritt wird als Separation („separation“) bezeichnet, bei der sich Mutter- und Tochterzentrosom voneinander weg bewegen.

2.4.5.1 Kontrollpunkte

Der Vorgang der Duplikation der Zentrosomen wird durch verschiedenste Mechanismen kontrolliert und gesteuert. Ähnlich wie die DNA-Replikation ist die Zentrosomenduplikation abhängig von der Cyclin-abhängigen Kinase 2. Durch Ausschalten dieser Cyclin-abhängigen Kinase (CdK2-E) kommt es zur Blockierung der Zentrosomenreproduktion, welche durch Zugabe von CdK2-E wieder aufgehoben werden kann (Hinchcliffe et al., 1999; Lacey et al., 1999). Die CdK2-E-Aktivität ist somit unerlässlich für die Zentrosomenreproduktion, da durch den Cyclin E/CdK2-Komplex Nukleophosmin/B23 (NPM/B23) phosphoryliert wird, wodurch dieses vom Zentrosom dissoziiert und der Zentrosomenduplikationszyklus beginnen kann (Hinchcliffe et al., 1999; Lacey et al., 1999; Okuda et al., 2000). Deshalb kommt es durch den Einsatz eines Anti-NPM/B23 Antikörpers zur Unterdrückung der Zentrosomenduplikation (Okuda et al., 2000).

Der fehlerfreie Ablauf des Zellzyklus ist noch von anderen Faktoren abhängig. Weitere wichtige Kinasen gehören zum Beispiel zur Aurora-Familie oder zur NIMA-Familie (Nigg, 2001).

Die Aurora A-Kinase (STK 15, BTAK oder aurora2) ist zwar nicht unbedingt für den Beginn der Zentrosomensegregation erforderlich, jedoch für deren Aufrechterhaltung (Ke et al., 2003). Durch das Ausschalten der Aurora A-Kinase kommt es zu einem reduzierten Gehalt an γ -Tubulin und damit zu einer Unterdrückung der Zentrosomenseparation und damit wiederum zur Verhinderung der Formation einer bipolaren Spindel (Glover et al., 1995; Hannak et al., 2001). Eine Überexpression führt zu einer abnormalen Zentrosomenanzahl und kann damit eine Ursache für Aneuploidie darstellen (Zhou et al., 1998). In einer Studie konnte in über 50 % der Fälle eine Überexpression von Aurora A bei primären Kolonkarzinomen gefunden werden. Daher wurde das codierende AURKA-Gen als Onkogen eingestuft (Bischoff et al., 1998).

Die NIMA (never in mitosis gene A)-Kinase Familie besteht aus insgesamt sieben NIMA-related Kinasen (Neks) (Kandli et al., 2000). Dabei spielt vor allem Nek2 eine wichtige Rolle. Das Zentrosomensplitting korreliert mit der Aktivität von Nek2, welche als den Zellzyklus regulierende Kinase für die Phosphorylierung von C-Nap1 (centrosomal Nek2-associated protein 1) sorgt. C-Nap1 ist an den proximalen Enden der Mutter- und Tochterzentriolen lokalisiert und ein Bestandteil der Verbindung der beiden Zentriolen (Fry et al., 1998; Mayor et al., 2000). Hingegen gibt es keinen Checkpoint, der die Anzahl der Spindelpole kontrolliert (Sluder et al., 1997).

2.4.6 Zentrosomenhyperamplifikation

Kurz bevor die Zelle in den Zellzyklus eintritt, wird ein weiteres Zentrosom gebildet, was bedeutet, dass pro Zellzyklus physiologisch lediglich zwei Zentrosomen vorhanden sein sollten. Diese sind für den Aufbau der zwei Pole des Spindelapparates verantwortlich (Hinchcliffe und Sluder, 2001). Ein physiologisch aufgebauter Spindelapparat besteht aus zwei Polen (McIntosh und Koonce, 1989). Kommt es zu diesem Zeitpunkt zur Ausbildung weiterer Zentrosomen, kann dies zu einem multipolaren Spindelapparat führen, welcher als ein entscheidender Schritt zur Tumorgenese angesehen werden kann (Heneen, 1975; Orr-Weaver und Weinberg, 1998; Rieder, 1990). Von einer Zentrosomenhyperamplifikation kann also in dem Moment gesprochen werden, wenn mehr als zwei Zentrosomen pro Zelle gefunden werden.

Bereits 1914 erkannte Boveri die Zentrosomenaberrationen als eine der Schlüsselrollen zur Tumorgenese (Boveri, 1902, 1914; Brinkley und Goepfert, 1998).

In verschiedenen Studien konnte sowohl beim Menschen als auch bei Tieren ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl oder strukturellen Veränderungen der Zentrosomen und der Entstehung von Neoplasien nachgewiesen werden (Lingle et al., 2002; Lingle et al., 1998; Miki et al., 2004; Nigg, 2002; Pihan et al., 1998; Setoguchi et al., 2001a; von Erichsen et al., 2012). Dieser „defekte Zentrosomen Phänotyp“ trat jedoch nur bei Tumormaterial bzw. Tumorzelllinien auf und konnte in gesundem Gewebe nicht nachgewiesen werden (Ghadimi et al., 2000; Pihan et al., 1998). So weisen fast 80 % aller invasiv wachsenden Mammatumoren des Menschen eine Zentrosomenhyperamplifikation auf (Lingle et al., 1998). Durch Zentrosomenhyperamplifikation kann es zur genetischen Instabilität einer Zelle kommen, welche mit einer numerischen Chromosomenaberration einhergehen kann (Carroll et al., 1999; Fukasawa et al., 1996; Lingle et al., 2002; Lingle et al., 1998; Livingstone et al., 1992; Miki et al., 2004; Pihan et al., 1998; von Erichsen et al., 2012). Weitergehend konnte festgestellt werden, dass der Grad der Zentrosomendefekte und das Ausmaß der chromosomalen Instabilität der Tumorzellen signifikant korrelieren (Pihan et al., 1998).

Ein Zusammenhang zwischen einer Zentrosomenhyperamplifikation und der Ausbildung eines abweichenden Spindelapparates ist *in vitro* gerade bei Zellen in höheren Passagen jedoch mit Vorsicht zu beurteilen. So gibt es beispielsweise Neuroblastomzellen der Maus (N115) und p53^{-/-} Mausembryo-Zellen, die zwar multiple Mikrotubuli-organisierende Zentren haben, aber dennoch einen bipolaren Spindelapparat ausbilden (Fukasawa et al., 1996; Ring et al., 1982). Hinchcliffe und Sluder (2001) stellten unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse die Hypothese auf, dass es durch eine vermehrte Anzahl von Zentrosomen nicht zwangsläufig zur Ausbildung eines multipolaren Spindelapparates kommen muss.

Desweiteren stellten Chiba et al. (2000) fest, dass die Zentrosomenhyperamplifikationen in späteren Zellpassagen (ab Passage 50) im Vergleich zu den frühen Passagen deutlich abnahmen. Eine mögliche Ursache hierfür ist der Selektionsdruck, durch den es zu einer vermehrten Proliferation der Zellen mit physiologischer Zentrosomenausstattung kommen könnte (Chiba et al., 2000). In anderen Untersuchungen mit verschiedenen Zelllinien konnten diese Beobachtungen jedoch nur zum Teil bestätigt werden, da Zentrosomenhyperamplifikationen auch in höheren Zellpassagen gefunden wurden (Fukasawa et al., 1996; Miki et al., 2004; von Erichsen et al., 2012).

2.4.6.1 Zentrosomenhyperamplifikation in hämatopoetischen Tumoren

Wie bereits beschrieben, konnten Zentrosomenhyperamplifikationen in verschiedensten Tumorarten gesehen werden. Auch bei hämatopoetischen Tumoren sind drei oder mehr Zentrosomen pro Zelle ein häufig zu beobachtendes Phänomen. So konnte in einer Studie beim Menschen sowohl bei non-Hodgkin-Lymphomen, follikulären Lymphomen, Mantelzelllymphomen sowie verschiedenen B-Zell-Lymphomen festgestellt werden, dass durchschnittlich ca. 30 % der Zellen Zentrosomenhyperamplifikationen aufwiesen (Kramer et al., 2003). Ein ähnliches Ergebnis ergaben Untersuchungen zur akuten myeloischen Leukämie (Neben et al., 2003).

2.4.6.2 Untersuchungen zur Zentrosomenhyperamplifikation bei Tieren

Auch bei Tieren gab es in den letzten Jahren zunehmend Forschungen, die ihren Fokus auf die Zentrosomenhyperamplifikationen im Zusammenhang mit der Tumorgenese legten. So wurden im Rahmen einer Studie die Tumoren von 51 Hunden auf Zentrosomenaberrationen untersucht, hierbei konnte in 31 % der untersuchten Tumoren eine Zentrosomenamplifikation mit drei oder mehr Zentrosomen festgestellt werden (Kaneko et al., 2005). Alle diese Tumoren zeigten zudem Veränderungen von p53 oder eine Überexpression von MDM2 (mouse double minute 2), einem Protoonkogen, welches als p53-negativ-Regulator fungiert. Ähnliche Ergebnisse brachte eine weitere Studie mit neun Hunden, in der bei allen Tumoren eine Zentrosomenhyperamplifikation festgestellt wurde (Setoguchi et al., 2001a). Zudem wurden in diesem Rahmen zwei Osteosarkomzelllinien untersucht, die ebenfalls eine Zentrosomenhyperamplifikation aufwiesen. Auch hier konnte parallel entweder eine Mutation von p53 oder einer Überexpression von MDM2 nachgewiesen werden. Die Autoren der beiden Studien sehen somit den Nachweis der Zentrosomenhyperamplifikation per Immunfluoreszenz als wirksames diagnostisches Mittel zur Tumordetektion an und eine Zentrosomenhyperamplifikation als Hinweis auf eine Veränderung von p53 (Kaneko et al., 2005; Setoguchi et al., 2001a). Bei einer Arbeit, die sich mit feline Fibrosarkomzelllinien befasste, konnte in 5,7 % bis 15,2 % der Zellen eine Zentrosomenhyperamplifikation von bis zu acht Zentrosomen nachgewiesen werden (von Erichsen et al., 2012). In einer weiteren Studie wurde die Zentrosomenausstattung von fünf feline Lymphomzelllinien untersucht. Hier konnte in einer Zelllinie ein vermehrtes Auftreten von Zentrosomen (≥ 3 Zentrosomen pro Zelle) bei 30 % der Zellen festgestellt werden (Miki et al., 2004). In beiden Studien, sowohl mit Fibrosarkomzellen als auch mit Lymphomzellen, konnte parallel zur Zentrosomenhyperamplifikation auch eine Aneuploidie diagnostiziert werden (Miki et al., 2004; von Erichsen et al., 2012).

2.4.6.3 Ursachen der Zentrosomenhyperamplifikation

Als Ursachen für die Zentrosomenhyperamplifikation werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So konnte in einer Studie von humanen Mammatumoren eine Hyperaktivität der Kinasen im Tumorgewebe beobachtet werden, wodurch es zu einer Hyperphosphorylierung von Zentrosomenproteinen kommt (Lingle et al., 1998). Eine andere Erklärung ist, dass die Zellen keine Zytokinese durchführen und somit im nächsten Zellzyklus einen doppelten Satz an Zentrosomen entwickeln (Nigg, 2002; Tarapore und Fukasawa, 2002). Die Separation der Zentrosomen wird durch verschiedene Motorproteine wie HsEg5 oder Xklp2 gesteuert (Boleti et al., 1996; Whitehead et al., 1996). Wird eine Separation verhindert, kann es zur Ausbildung eines monopolaren Spindelapparates kommen, welcher eine polyploide Zelle zur Folge haben kann (Pihan et al., 1998). Bei einer Deregulation des Zentrosomenreplikationszyklus kann es zur Bildung von mehr Zentrosomen kommen als normalerweise pro Zellzyklus vorgesehen sind. Die Reduplikation wird normalerweise durch p53 kontrolliert (Tarapore und Fukasawa, 2002).

2.4.6.4 Die Rolle von p53

Die Aberration von p53, einem Tumor-Suppressor-Gen, ist eine der häufigsten Genmutationen im Rahmen der Tumorgenese bei Menschen und Hunden (über 50 % bei humanen Tumoren) und Inhalt zahlreicher Untersuchungen zum Verständnis der Tumorgenese (Hisasue et al., 2000; Hollstein et al., 1991; Hussain und Harris, 1999; Levine et al., 1991; Miki et al., 2004; Setoguchi et al., 2001b). Es werden ständig neue p53-Mutationen entdeckt. So wurden 1998 noch 10000 verschiedene p53-Mutationen dokumentiert, 2006 waren es bereits 20000 (Lamolle et al., 2006; Strauss, 1998a). P53 führt als „Hüter des Genoms“ über die unterschiedlichsten Wege zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose nach DNS-Schäden (Lane, 1992). Bei Katzen tritt eine Mutation deutlich seltener auf als beim Menschen, jedoch wird sie auch hier von verschiedenen Autoren als wichtiger Baustein in der Multi-Step-Tumorgenese angesehen und konnte in verschiedenen Tumoren wie Fibrosarkomen, Plattenepithelkarzinomen, einem Lymphom und Mammatumoren nachgewiesen werden (Mayr et al., 2000; Mayr et al., 1993; Mayr et al., 1995a; Miki et al., 2004; Okuda et al., 1994). Die Funktionen sowie die Regulation von p53 sind komplex und insbesondere durch die Bedeutung in der Tumorgenese Gegenstand zahlreicher Studien. Eine Eigenschaft von p53 ist die Einleitung der Apoptose nach DNS-Schädigung. Dabei ist p53 in der Lage, sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Weg die Apoptose einzuleiten. Über die Aufregulation von TRAIL-Rezeptoren (tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand), Todesrezeptor 4 (DR4, TRAIL-Rezeptor 1) und Todesrezeptor 5

(DR5, Killer, TRAIL-Rezeptor 2) sowie den FAS-Rezeptor und den FAS/APO-1-Liganden induziert p53 die Apoptose über den extrinsischen Weg (Liu et al., 2004b; Owen-Schaub et al., 1995; Wu et al., 1997). Auch zur Einleitung der Apoptose über den intrinsischen Weg werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So induziert p53 beispielsweise verschiedene proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax, NOXA oder PUMA (p53-Upregulated Modulator of Apoptosis), wobei letztere BH3-only-Mitglieder der Bcl-2-Familie darstellen und für eine Aufregulation von p53AIP1 (p53-regulated Apoptose-Inducing Protein1) sorgen, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist und durch Interaktion mit Bcl-2 zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien sorgt (Miyashita et al., 1994; Nakano und Vousden, 2001; Oda et al., 2000a; Oda et al., 2000b). Apoptose ist nicht der einzige Weg, den Körper vor Zellschäden zu schützen. In einer Studie von 2004 experimentierten die Autoren mit mutierten p53-R172P Mäusen, welche durch einen Gendefekt zwar nicht mehr in der Lage waren, Apoptose zu induzieren, dennoch konnten bei diesen Tieren keine spontan entstandenen Tumoren registriert werden, was den Schluss zulässt, dass außer der Induktion von Apoptose noch ein weiterer Mechanismus zum Schutz vor DNS-Schäden vorhanden sein muss (Liu et al., 2004a). Dieser weitere Mechanismus ist die Fähigkeit von p53, den Zellzyklus bei Bedarf zu stoppen. Dies geschieht beispielsweise in der G1-Phase, welche durch p53-getriggerte Aktivierung und Induktion des Cyclin-abhängigen Kinase-Hemmers p21^{WAF1/CIP1} gestoppt werden kann (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993).

In der S-Phase kommt es zur Verdopplung der DNS. Folglich ist dieser Abschnitt des Zellzyklus besonders anfällig für Fehler. Die Kontrolleinrichtungen in der S-Phase können in drei Checkpoints unterteilt werden (Bartek et al., 2004). Nach Bartek et al. (2004) ist der erste Typ der „Replikationscheckpoint“. Hier wird registriert, ob die Replikationsgabel, bei der durch die Helikase der Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen aufgetrennt wird, aussetzt. Der zweite Typ ist der S-M-Checkpoint. Hier wird kontrolliert, ob sich die Zellen bereits geteilt haben, bevor das Genom vollständig repliziert wurde. Am dritten Checkpoint, dem S-Phase-Checkpoint, werden Doppelstrangbrüche registriert. In dieser letzten Phase kommt es durch eine Isoform von p53, Δ p53, zur Aktivierung von p21, welches durch eine Abregulation der Cyclin-abhängigen Kinase letztendlich zum Stoppen des Zellzyklus führen kann (Rohaly et al., 2005). Am G₂/M-Checkpoint sind verschiedene Mechanismen lokalisiert, die zu einem durch p53 induzierten Zellzyklusarrest führen (Helton und Chen, 2007). So sorgt p21 beispielsweise dafür, dass die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2 (Cdk-1) durch Phosphorylierung unterbunden wird (Smits et al., 2000).

Während der Interphase, nicht aber während der Mitose, steht p53 in enger Beziehung zu den Zentrosomen. Zudem wird p53 eine wichtige Aufgabe im Monitoring des Zentrosomenreproduktionszyklus und damit ein Schutz vor Zentrosomenhyperamplifikation zugesprochen (Brown et al., 1994; Fukasawa et al., 1996).

Durch Mutation oder Verlust von p53 kann es zur Ausbildung von multinukleären Zellen mit einem polyploiden Chromosomensatz kommen (Fukasawa, 2007; Weber et al., 1998). In mehreren Versuchen mit einer p53^{-/-} Mauszelllinie konnte festgestellt werden, dass p53 eine wichtige Rolle in der Regulation des Zentrosomenreproduktionszyklus spielt. So wurde bei dieser Zelllinie häufig eine Zentrosomenhyperamplifikation beobachtet (Fukasawa et al., 1996; Fukasawa et al., 1997). Bei einer weiteren Studie mit Mäusen mit p53-Mutation, bei der die Entwicklung von Papillomen untersucht wurde, konnte bei 75 % der Zellen eine Zentrosomenhyperamplifikation von drei oder mehr Zentrosomen pro Zelle festgestellt werden (Wang et al., 1998).

In einer Studie in Anlehnung an die Versuche von Balczon et al. (1995) bei CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) wurde die DNS-Synthese von embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs) in der G₁/S-Phase durch DNS-Syntheseblocker, Aphidicolin und Hydroxyharnstoff, unterbunden. Es wurden p53^{-/-} und p53^{+/+} MEFs miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die p53^{-/-} MEFs zwar keine weitere DNA-Synthese zeigten, die Zentrosomenduplikation jedoch fortwährend beobachtet werden konnte. Hingegen war bei den p53^{+/+} MEFs weder eine DNA-Synthese noch eine Zentrosomenduplikation erkennbar (Tarapore et al., 2001). Diese Erkenntnisse gemeinsam mit den Studien an der p53 mutierten CHO-Zelllinie lassen den Schluss zu, dass p53 dafür verantwortlich ist, eine Re-Duplikation der Zentrosomen zu verhindern (Hu et al., 1999; Lee et al., 1997; Moro et al., 1995; Tarapore und Fukasawa, 2002).

Die p53-Sequenz der Katze weist in großen Teilen Aminosäuresequenzhomologien zum Menschen (82,1 %), der Ratte (75,5 %) und der Maus (74,9 %) auf (Okuda et al., 1993). Die entsprechende Sequenz ist insgesamt 2143 Basenpaare lang, wobei 126 Basenpaare am 5'-Ende und 859 Basenpaare am 3'-Ende nicht kodieren (Okuda et al., 1994). Somit beträgt die abgelesene Sequenz mit Stoppcodon 1161 Basenpaare. Die Sequenzen, die für die sogenannten „mutational hot spots“ bei humanen Tumoren kodieren sind identisch mit denen der Katze, wenn man die Sequenzen entsprechend auf das Katzengenom überträgt (Okuda et al., 1993). Bei der Katze gibt es bis heute nur vereinzelt Studien, die eine Rolle von p53-Mutationen bei der Tumorgenese belegen. Okuda et al. (1994) überprüften etwaige p53-

Aberrationen an zehn hämatopoetischen Tumoren und drei Lymphomzelllinien (T17 (Fulton et al., 1987), MCC (Cheney et al., 1990) und 3201 (Snyder et al., 1978)). Dabei konnte eine Punktmutation bei einem Lymphom auf Höhe des 722sten Nukleotids detektiert werden, was zu einer Aminosäureänderung von Leucin zu Prolin führte. Eine Missensemutation (Thymin wurde durch Cystein ersetzt) und zwei stille Mutationen konnten bei Untersuchungen der 3201-Lymphomzelllinie nachgewiesen werden (Mochizuki et al., 2012; Okuda et al., 1994). Die Missensemutation in der Sequenz von 3201 konnte auch in späteren Studien bestätigt werden, wobei allerdings die Zuordnung der entsprechend durch die Punktmutation kodierte Aminosäure durch die Autoren fehlerhaft war, da das Kodon CGC, wie Okuda et al. (1994) richtig beschrieben haben, für die Aminosäure Arginin und nicht wie von Miki et al. (2004) behauptet, für Alanin kodiert. Bei Untersuchungen zu p53-Mutationen von fünf Lymphomzelllinien konnten bei verschiedenen Zelllinien die Mutationen an den gleichen Stellen identifiziert werden. So war bei 3201, MCC, FL74 und MS4 eine stille Mutation auf Höhe des 231sten Nukleotids zu registrieren (Miki et al., 2004; Mochizuki et al., 2012). Auf Höhe des 591sten Nukleotids konnte eine stille Mutation bei sechs (3201, R96, FT-1, FL74, FT-G und MS4) von neun untersuchten feline Lymphomzelllinien gefunden werden (Miki et al., 2004; Mochizuki et al., 2012).

Tabelle 1: Bisher beschriebene p53-Mutationen bei feline Lymphomzelllinien

Zelllinie	Okuda et al. (1994)	Miki et al. (2004)	Mochizuki et al. (2012)
3201	Nt 829 ⇒ T → C ⇒ Cys → Arg	Keine genauen Nukleotid-Angaben, verweist auf Okuda et al. (1994) T → C ⇒ Cys → Arg	Nt 231 ⇒ A → G ⇒ Glu → Glu Nt 591 ⇒ C → T ⇒ Tyr → Tyr Nt 829 ⇒ T → C ⇒ Cys → Arg
T17	Keine Mutation	Nicht untersucht	Nicht untersucht
MCC	Keine Mutation	Nicht untersucht	Nt 231 ⇒ A → G ⇒ Glu → Glu Nt 639 ⇒ C → T ⇒ Arg → Cys
R96	Nicht untersucht	Nt 591 ⇒ C → T ⇒ Tyr → Tyr	Nicht untersucht
KO-1	Nicht untersucht	Nt 231 ⇒ A → G ⇒ Glu → Glu	Nicht untersucht
FT-1	Nicht untersucht	Nt 591 ⇒ C → T ⇒ Tyr → Tyr	Nt 591 ⇒ C → T ⇒ Tyr → Tyr
FL74	Nicht untersucht	Nt 231 ⇒ A → G ⇒ Glu → Glu Nt 591 ⇒ C → T ⇒ Tyr → Tyr Nt 1176 ⇒ G → A ⇒ Lys → Lys	Nicht untersucht
FT-G	Nicht untersucht	Nicht untersucht	Nt 591 ⇒ C → T ⇒ Tyr → Tyr
MS4	Nicht untersucht	Nicht untersucht	Nt 231 ⇒ A → G ⇒ Glu → Glu Nt 591 ⇒ C → T ⇒ Tyr → Tyr

Eine Arbeitsgruppe aus Wien hat innerhalb von mehreren Jahren verschiedene Studien veröffentlicht, wo sie zum einen die p53-Sequenz des Menschen mit derjenigen der Katze verglichen und zudem verschiedene p53-Mutationen bei unterschiedlichen Tumorarten nachweisen konnten. Die meisten Mutationen konnten bei Fibrosarkomen gefunden werden, wobei diese auch zahlenmäßig den größten Anteil am untersuchten Tumorgut ausmachten (Mayr et al., 2000; Mayr et al., 1998; Mayr et al., 1995b). Nur bei einem der untersuchten Lymphome konnte eine p53-Mutation nachgewiesen werden (Mayr et al., 1993).

Das Fehlen oder die Mutation von p53 spielt somit eine Rolle bei der Entstehung von Zentrosomenhyperamplifikationen und kann zur genetischen Instabilität führen, jedoch ist es nicht der einzige Pathomechanismus in diesem Zusammenhang, da auch in Tumoren ohne p53-Mutationen Zentrosomenhyperamplifikationen stattfinden (Lingle et al., 1998; Livingstone et al., 1992; Pihan et al., 2001).

2.4.7 γ -Tubulin

Bereits 1990 wurde durch Versuche mit *Aspergillus nidulans* die Bedeutung von γ -Tubulin für die Ausbildung des Spindelapparates erkannt (Oakley et al., 1990). Die Autoren entdeckten, dass das *mipA*-Gen von *Aspergillus nidulans* für γ -Tubulin kodiert und dass eine Mutation dieses Gens zu einem kompletten Verlust des Spindelapparates führte. Dadurch kommt es zu einer reduzierten Anzahl an Mikrotubuli. Daher wird vermutet, dass γ -Tubulin eine wesentliche Rolle im Aufbau von neuen Mikrotubuli, der sogenannten Nukleation, spielt (Moritz et al., 1998; Oakley, 2000). Hingegen ist das Vorhandensein von γ -Tubulin nicht an die Anwesenheit von Mikrotubuli gebunden. Ein Nachweis ist im Gegensatz zum Nachweis von α -Tubulin auch in depolymerisierten Mikrotubuli möglich (Stearns et al., 1991).

Zheng et al. gelang 1995 die Isolation eines γ -Tubulin enthaltenen Ringkomplexes (γ TuRC) aus *Xenopus*-Eiern, durch den eine Mikrotubuli-Nukleation ermöglicht werden konnte (Zheng et al., 1995). Die Autoren stellten die Behauptung auf, dass ein γ -Tubulin enthaltender Ringkomplex (γ TuRC) aus 1-2 α/β Tubulindimeren und 10-13 γ -Tubulindimeren besteht.

γ -Tubulin macht nur einen geringen Teil des Gesamttubulins aus und ist ausschließlich in Zentrosomen lokalisiert (Stearns et al., 1991). γ -Tubulin wird nicht als Isotyp von α - und β -Tubulin angesehen, sondern als ein weiteres Mitglied der Tubulin-Superfamilie klassifiziert (Oakley und Oakley, 1989; Stearns et al., 1991).

Mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie konnten Stearns et al. (1991) nachweisen, dass γ -Tubulin ein Teil des perizentriolären Materials ist und zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus

vorliegt. Dies zeigt deutlich den Vorteil der gegen γ -Tubulin gerichteten Antikörper für die spezifische Anfärbung der Zentrosomen gegenüber anderen Antikörpern, wie beispielsweise gegen Kinesin gerichteten Antikörpern, welche an Zentrosomen zwar in der Interphase und der Mitose binden, allerdings ebenfalls Teile des Spindelapparates markieren (Neighbors et al., 1988). Zentrosomen-Antigene, die von *Drosophila*-Embryonen isoliert wurden, variieren in ihrer Verteilung und Intensität und sind deshalb ebenfalls nicht als gleichwertige Alternative anzusehen (Kellogg et al., 1989).

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinie „S87“

3.1.1 Herkunft der Zelllinie

3.1.1.1 Klinische Befunde

Die Large Granular Lymphocyte-Zelllinie wurde aus dem Bauchhöhlenerguss einer 12 Jahre alten, weiblich-kastrierten Europäisch Kurzhaarkatze isoliert. Die Katze wurde in der Klinik für Kleintiere - Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, aufgrund von Apathie, Schwäche, Polydipsie und Inappetenz vorstellig. Dabei präsentierte sich die Katze von hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden. In der klinischen Untersuchung fielen zusätzlich eine hochgradige Adipositas und eine verminderte Fellqualität auf. In der Blutuntersuchung konnte eine geringgradige Anämie sowie eine geringgradige Leukozytose, eine Elektrolytverschiebung und eine Hypoproteinämie festgestellt werden. In der Ultraschalluntersuchung wurde freie Flüssigkeit im Abdomen und eine hochgradig veränderte Leber gefunden. Es wurde eine Feinnadelaspiration der Leber und im Anschluss eine zytologische Untersuchung durchgeführt. In der zytologischen Untersuchung wurde ein Large Granular Lymphocyte-Lymphom (LGL-Lymphom) in der Leber diagnostiziert.

Da die Prognose als sehr vorsichtig eingeschätzt wurde, entschied sich die Besitzerin für die Euthanasie beim Haustierarzt. Das Tier wurde auf Besitzerwunsch hin nicht sezirt.

3.1.2 Zellisolierung

Aus den Resten des zur zytologischen Diagnostik und zur Verbesserung der Symptomatik des Tieres steril entnommenen Aszites wurden im Rahmen eines weiteren Forschungsprojektes mittels einer Percoll-Dichtegradienten-Isolierung die Tumorzellen angereichert und anschließend kultiviert. Die Zellen wurden als „S87“ bezeichnet.

3.1.2.1 Isolierung feliner peripherer mononukleärer Zellen

Um Katzenlymphozyten für Vergleichswerte und als Kontrollen zu erhalten, wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) aus den nach der Diagnostik verbleibenden Resten heparinisierten Blutes, welches im Rahmen der Routinediagnostik in der Klinik für Kleintiere - Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen abgenommen worden war, isoliert. Der Buffy Coat und das Zellpellet standen,

nachdem das Serum für diagnostische Zwecke verwendet wurde, ungefähr sechs Stunden nach Blutentnahme zur Verfügung.

In ein konisches Zentrifugenröhrchen wurden 3 ml Ficoll-Paque[®] PLUS (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) einpipettiert. Das Ficoll-Paque[®] PLUS wurde vorsichtig mit 4 ml des in PBS (pH 7,4, siehe 8.3.3 im Anhang) gelösten Buffy Coats überschichtet. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich diese Schichten keinesfalls vermischten. Es erfolgte eine Zentrifugation (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen) für 35 min mit 400 x g bei 18-20 °C. Nach der Zentrifugation konnten vier Schichten unterteilt werden. In der oberen Schicht sammelte sich das Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch. Darunter lag die sogenannte Interphase, bestehend aus den mononukleären Zellen. Diese wurde von einer Schicht, die die Reste des zugegebenen Ficoll-Paque[®] PLUS enthielt, begrenzt, auf diese folgte die letzte Schicht. Sie war als ein Zellpellet zu erkennen, bestehend aus Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen.

Der Interphasering wurde vorsichtig mit Hilfe einer 1000 µl Pipette abgenommen und in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass möglichst wenig von der darüber oder darunter liegenden Schicht mit aufgezogen wurde. Die isolierten mononukleären Zellen wurden anschließend in 6 ml PBS (pH 7,4; siehe 8.3.3 im Anhang) aufgenommen, 10 min mit 800 x g bei 18-20 °C zentrifugiert (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen), in PBS resuspendiert und die Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wiederholt. Das Zellpellet wurde anschließend in PBS für die weitere Verwendung resuspendiert.

Nach den Waschvorgängen standen die mononukleären Zellen für weitere Versuche zur Verfügung oder konnten kultiviert werden.

3.2 Zellkulturtechnik

3.2.1 Medien und Zusätze

Bei dem verwendeten Medium handelte es sich um kommerziell erhältliches, speziell auf Lymphozyten abgestimmtes, 1966 entwickeltes RPMI 1640 (Akronym, hergeleitet von Roswell Park Memorial Institute) Medium. Dieses wurde zunächst von der Firma PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) bezogen, später dann von Life Technologies GmbH (Darmstadt). Zusätzlich wurde dem Medium noch 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA

Laboratories GmbH Pasching, Österreich) und 10 % fetales Kälberserum (FCS, Foetal Bovine Serum, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich, später Gibco®Life Technologies GmbH, Darmstadt) zugegeben, welches für eine halbe Stunde bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert (zur Komplementinaktivierung) worden war. Im Folgenden umfasst der Begriff Medium, falls nicht anders angegeben, das oben beschriebene RPMI 1640-Medium. Vor einem Mediumwechsel wurde das Medium stets bei 37 °C ca. 10 Minuten im Wasserbad aufgewärmt.

3.2.1.1 Konditioniertes Medium

Als konditioniertes Medium wird Medium bezeichnet, welches schon mit Zellen inkubiert worden ist. Dieses enthält neben den ursprünglichen Medienkomponenten zusätzlich auch Metaboliten und Signal-Proteine der Zellen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren. Diese können andere Zellen in ihrem Wachstumsverhalten positiv beeinflussen. Deshalb wurde frisch aufgetauten Zellen zunächst immer 50 % konditioniertes Medium zugesetzt.

Für die Erstellung des konditionierten Mediums musste die Zellsuspension zunächst in konische Zentrifugationsröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 7 min bei 200 x g zentrifugiert werden (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen), um die Zellen zu separieren. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, ohne dabei die Zellen in dem Zellpellet aufzuwirbeln. Um sicher zu gehen, dass sich in dem Überstand keine Zellen mehr befanden, wurde der Überstand anschließend mit Hilfe einer Spritze durch einen 0,45 µm-Spritzenfilter filtriert (Carl Roth, Karlsruhe). Das konditionierte Medium wurde aliquotiert bei -20 °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

3.2.2 Zellkultivierung und Passagierung

Um den Zellen ein optimales Wachstum zu ermöglichen, ist es zwingend erforderlich, ihnen in regelmäßigen Abständen frisches Medium zur Verfügung zu stellen, welches der Versorgung mit lebenswichtigen Nährstoffen dient. Die S87-Zellen zeigten einen hohen Grundumsatz. Als Anhaltspunkt dafür wurde der Farbstoffumschlag des pH-Wert-Indikators Phenolrot von rot zu gelb herangezogen. Dieser Farbumschlag zeigt an, dass sich der pH-Wert des Mediums aufgrund der Stoffwechselprodukte der Zellen in den sauren Bereich verschiebt. Daher wurde einmal in der Woche ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen wurden zusätzlich einmal wöchentlich passagiert, um die Zellteilung weiter anzuregen. Vor dem Mediumwechsel wurden die Zellen stets mikroskopisch auf ihre Zellmorphologie untersucht und die Zelldichte unter dem inversen Mikroskop (Olympus IX70, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) beurteilt.

Um den Zellen neues Medium hinzuzufügen, wurden sie entweder in Zentrifugationsröhrchen überführt und anschließend zentrifugiert (7 min, 200 x g, 15 °C) (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen), oder die Zellkulturflaschen ungefähr zwei Stunden vor dem Medienwechsel in eine aufrechte Position gebracht, so dass die Zellen auf den Boden absanken und der Überstand abgesaugt werden konnte. Falls die Zellen zentrifugiert wurden, musste das Pellet anschließend in Medium resuspendiert und die Zellsuspension in die Zellkulturflasche zurück überführt werden. Anschließend wurden bei einer 25 cm² Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) ca. 10 ml Medium, bei einer 75 cm² Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) ca. 40 ml Medium hinzugefügt. Zum Passagieren wurden die Zellen ebenfalls zunächst zentrifugiert (7 min, 200 x g, 15 °C), in 5 ml Medium resuspendiert und die Hälfte der Zellsuspension in eine neue Flasche mit entsprechendem Medium überführt. Die restliche Zellsuspension wurde in der alten Flasche als Rückstellprobe bis zur nächsten Passage aufbewahrt, eingefroren oder stand weiteren Versuchen zur Verfügung.

3.2.3 Trypanblauausschlussfärbung

Um die Vitalität von Zellen zu bestimmen gibt es verschiedene Methoden wie zum Beispiel den MTT-Test oder die Trypanblauausschlussfärbung. Letztere stellt eine einfache, schnelle und kostengünstige Variante dar, die Anzahl der lebenden Zellen lichtmikroskopisch zu bestimmen. Dazu wurde zunächst eine sterile 0,5 %ige Trypanblau-Stammlösung hergestellt, indem 0,5 g Trypanblau (Carl Roth, Karlsruhe) und 0,9 g NaCl auf 100 ml Aqua dest. aufgefüllt und anschließend mit einem sterilen 0,45 µm-Spitzenfilter filtriert (Carl Roth, Karlsruhe) wurden. Die Haltbarkeit der Stammlösung ist auf mehrere Monate begrenzt. Da bei größeren Mengen eine erhöhte Gefahr der Kontamination bestand, wurde die Stammlösung in kleinere Mengen aliquotiert.

Die Zellsuspension und die 0,5 %ige Trypanblaulösung wurden in einem Verhältnis von 1:2 in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vermischt und jeweils 10 µl in die Neubauer-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe) pipettiert. Bei der anschließenden Auswertung stellen die blau angefärbten Zellen den Anteil der toten Zellen dar, wo hingegen der Farbstoff aufgrund seiner Größe (M=960,8 g/mol) von lebenden Zellen nicht aufgenommen werden kann und diese sich somit ungefärbt darstellen. Da Trypanblau zytotoxisch wirkt (Schmitz, 2011), musste die Auswertung stets zügig nach Ansatz der Färbung durchgeführt werden, da sich das Ergebnis bei längerer Inkubationsdauer zu Gunsten der toten Zellen hin verändert.

3.2.4 Kryokonservierung

Durch die Kultivierung und das regelmäßige Passagieren der Zellen kann es zu Veränderungen der Zellen im Verlaufe der Zeit kommen, da die Zellen stets einem gewissen Selektionsdruck ausgesetzt sind. Um ein Vergleich der verschiedenen Zellpassagen zu ermöglichen und die Zellen auch für Versuche zu einem späteren Zeitpunkt zu Verfügung zu haben, wurde ein Teil der Zellen in regelmäßigen Abständen eingefroren. In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen können ihre Lebensfähigkeit fast unbegrenzt erhalten und beim erneuten Auftauen ihre Stoffwechselaktivität wieder aufnehmen.

Um die Entstehung von Eiskristallen zu verhindern, wurde dem Medium ein Gefrierschutzmittel, Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck KGaA, Darmstadt), zugegeben und zusätzlich fetales Kälberserum (Foetal Bovine Serum, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich, später Life Technologies GmbH, Darmstadt), welches ebenfalls eine gewisse Schutzfunktion hat. Dieses als Einfriermedium bezeichnete Medium setzte sich aus 65 % Medium, 25 % fetalem Kälberserum und 10 % DMSO (Merck KGaA, Darmstadt) zusammen. Zunächst wurde die Zahl der vitalen Zellen durch eine Trypanblauausschlussfärbung ermittelt. Anschließend wurden die Zellen auf eine Konzentration von 18×10^6 Zellen/ml eingestellt. In jedes Kryoröhrchen (1,8 ml Cryo TubeTM, Roskilde, Dänemark) wurden 500 μ l Zellsuspension und anschließend 1300 μ l Einfriermedium pipettiert (Endkonzentration: 5×10^6 Zellen/ml). Damit das DMSO (Merck KGaA, Darmstadt) ausreichend Zeit hatte, um in die Zellen zu diffundieren und dort das Wasser zu verdrängen (Gefrierschutzfunktion), mussten die Zellen langsam (1 °C pro Minute) heruntergekühlt werden. Um dieses zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen in eine spezielle, mit Isopropanol gefüllte Kryobox (Nalgene® Cryo Freezing Container, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) verbracht, die ein langsames Herabkühlen gewährleistet. Zunächst wurden die Zellen für eine Stunde in einem Gefrierschrank bei -20 °C gelagert und anschließend über Nacht auf -80 °C herunter gekühlt. Am folgenden Tag konnten die Zellen dann in den flüssigen Stickstoff überführt werden, in dem sie für Jahrzehnte gelagert werden können.

3.2.5 Auftauen von Zellen

Da das dem Einfriermedium beigemischte DMSO (Merck KGaA, Darmstadt) bei Raumtemperatur zelltoxisch ist, musste der Auftauvorgang möglichst schnell vonstattengehen. Dafür wurden die Kryoröhrchen (1,8 ml Cryo TubeTM, Roskilde, Dänemark) zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, der Inhalt anschließend in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 10 ml Medium verdünnt. Im nachfolgenden

Waschschritt wurden die Zellen zunächst für 7 min bei 4 °C mit 200 x g zentrifugiert (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet erneut in 10 ml Medium resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen in 500 µl Medium resuspendiert und in eine Vertiefung einer 24-well-Platte (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) ausgesät. Um das Wachstum zu verbessern, wurde den frisch aufgetauten Zellen jeweils 1 ml frisches Medium (mit 20 % FCS) und 1 ml konditioniertes Medium pro Vertiefung beigelegt. Die Dichte der Zellen wurde täglich unter dem inversen Mikroskop kontrolliert und das Medium alle zwei Tage gewechselt. Nachdem die Zellen den Boden der Vertiefung komplett bedeckten, wurden die Hälfte der Zellen in eine weitere Vertiefung passagiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Nach ungefähr einer Woche konnten die Zellen von den Vertiefungen der 24-well-Platte (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) in eine 25 cm² (Wachstumsfläche) Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) überführt werden. Ab diesem Zeitpunkt wurde den Zellen nur noch das 10 % FCS enthaltende Medium beigelegt.

3.2.6 Wachstumskurve und Populationsverdopplungszeit

Zur Bestimmung der Populationsverdopplungszeit wurde eine Wachstumskurve erstellt.

Dazu wurden die Zellen zunächst auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 1 ml in sechs Vertiefungen einer 24-well-Platte (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) pipettiert. Alle 24 Stunden wurden die Zellen in den Vertiefungen zunächst durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde von einem Aliquot eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe) unter einem Mikroskop bestimmt und protokolliert. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt, indem vor der Resuspendierung vorsichtig und ohne die abgesunkenen Zellen aufzuwirbeln 500 µl Medium abgenommen wurde und im Anschluss ebenso viel frisches Medium hinzugefügt wurde.

Die Zellzählung wurde solange durchgeführt, bis eine Plateauphase erreicht war. Für die Auswertung wurde eine halblogarithmische Darstellung gewählt, bei der die Zellzahl gegen die Zeit aufgetragen wurde. Durch diese Art der Darstellung ergab sich in der Phase des exponentiellen Wachstums eine Gerade, wobei die Steigung der Gerade der Teilungsrate bzw. der Populationsverdopplungszeit entsprach.

3.3 Nachweis der spontanen Zytotoxizität

Es erfolgte eine Überprüfung der Zytotoxizität der LGL-Zellen, im Folgenden als Effektorzellen bezeichnet. Sie lag vor, wenn die Zellen in der Lage waren, andere, adhärenente Zellen (Zielzellen) zu lysieren. Als adhärenente Zelllinien wurden in diesem Fall eine CTAC-Zelllinie (kanine Schilddrüsenadenokarzinom-Zellen) und eine Vero-Zelllinie benutzt.

3.3.1 Zielzellen

Als Zielzellen wurde die CTAC-Zelllinie, eine kanine Schilddrüsenadenokarzinom-Zelllinie (Kasza, 1964) genutzt, die empfindlich gegenüber der spontanen zytotoxischen Aktivität kaniner natürlicher Killerzellen ist (Knapp et al., 1993; Krakowka, 1983). Als weitere Zelllinie wurde eine Vero-Zelllinie verwandt, die als gegenüber den NK-Zellen nicht sensibel beschrieben ist (Schmitz, 2000). Beide Zelllinien stammten aus dem Kryoarchiv des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die adhärenenten Zellen wurden in 25 cm² Gewebekulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) bei 5 % CO₂-Atmosphäre und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Einmal in der Woche wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Als Kulturmedium diente für beide Zelllinien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), welches mit 10 % fetalem Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetzt wurde. Einmal in der Woche wurden die Zellen zusätzlich passagiert. Dafür wurde die Konfluenz zunächst mikroskopisch kontrolliert. Im Anschluss daran wurde zunächst das alte Medium abgesaugt, 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) hinzugefügt und die Zellen 5 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml des DMEM-Mediums wurde die Zellsuspension in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt und für 6 min zentrifugiert (200 x g, 15 °C) (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen). Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 3 ml DMEM-Medium resuspendiert und ca. 50 µl der Zellsuspension und 5 ml DMEM-Medium in eine neue 25 cm² Gewebekulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) überführt.

3.3.2 Vorbereitung des MTT-Tests

Der MTT-Test wurde 1983 von Mosmann als kolorimetrische Methode zum Nachweis der Zellviabilität entwickelt und löste damit den radioaktiven Standard-Proliferationstest ab, bei dem mit radioaktivem ³H-Thymidin gearbeitet wurde. Dieser hat diverse Nachteile, wie radioaktiven Abfall und hohe Kosten durch teure Radioisotope (Mosmann, 1983; Wagner et al., 1999).

Die Zielzellen wurden zunächst mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in eine 96-well-Platte (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) eingesät. Im Anschluss wurde die Platte mikroskopisch auf deutliche Konzentrationsabweichungen oder Pipettierfehler überprüft und über Nacht (mindestens 12 Stunden lang) im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Danach erfolgte eine erneute mikroskopische Kontrolle, um die Konfluenz der Zielzellen zu überprüfen. Das DMEM-Medium sowie die nicht angewachsenen Zielzellen wurden abgesaugt. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt, sodass das Verhältnis von Zielzellen zu Effektorzellen ca.1:100 betrug. Nach Zugabe der Effektorzellen zu den Zielzellen wurde die Platte mit beiden Zelllinien erneut für 14 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Den Kontrollreihen wurden keine Effektorzellen hinzugegeben, sondern die Vertiefungen lediglich mit Medium aufgefüllt.

Nach der 14-stündigen Inkubation und der erneuten Sichtkontrolle unter dem Mikroskop wurde die Platte mit PBS (pH 7,4, siehe 8.3.3 im Anhang) aus einer Spritzflasche vorsichtig gewaschen, so dass alle Effektorzellen und die lysierten Zielzellen heraus gespült wurden. Im Anschluss wurden in jede Vertiefung $10\text{ }\mu\text{l}$ der MTT-Stammlösung (MTT-Formazan 5 mg/ml PBS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und $100\text{ }\mu\text{l}$ Medium einpipettiert. Erneut erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden im Brutschrank, bei der die adhären, lebenden, nicht lysierten Zielzellen durch ihre Stoffwechselaktivität, das schwach gelbe Tetrazoliumsalz (MTT) in schwach blaue bis violette, wasserunlösliche Farbkristalle umzusetzen.

Nachdem der Überstand vorsichtig abgekippt und durch Klopfen der umgedrehten Platte auf mehrere Zellstofflagen vollständig entfernt worden ist, wurden die Zellen mit reinem DMSO (Merck KGaA, Darmstadt) zerstört und die Farbkristalle gelöst. Um die Lösung zu beschleunigen, wurde die Platte auf eine Rüttelplatte verbracht. Die Kontrolle, ob sich alle Kristalle gelöst hatten, erfolgte mikroskopisch.

3.3.3 Rose-Bengal-Assay (RBA)

Zur Verifizierung der durch den MTT-Test gewonnenen Ergebnisse wurde eine zweite, ebenfalls kolorimetrische Methode angewandt.

Der Rose-Bengal-Assay wird zur quantitativen Bestimmung der spontanen zytotoxischen Aktivität genutzt (Gondolf, 1994). Es handelt sich hierbei um ein physikalisches Verfahren, bei dem durch Diffusion der den Zellen zugegebene Farbstoff in die Zellen eindringt.

Für den Rose-Bengal-Assay wurden Zielzellen und Effektorzellen wie beim MTT-Test vorbereitet. Nach Ablauf der Inkubation wurden auch hier die Effektorzellen und die lysierten Zielzellen mittels einer mit PBS (pH 7,4 siehe 8.3.3 im Anhang) gefüllten Spritzflasche aus den Vertiefungen der Testplatte heraus gespült.

In jede Vertiefung wurden anschließend 100 µl der Rose Bengal-Lösung (0,25 % w/v in NaCl-PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zugegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte erneut wie bereits beschrieben zum Entfernen des nicht von den verbliebenen adherenten Zellen aufgenommenen Farbstoffs gewaschen und der Farbstoff in den Zellen danach durch die Zugabe von 200 µl Ethanol-PBS (50 % v/v) für 5 min in den Überstand gelöst. Im Anschluss konnte mit der Auswertung begonnen werden.

3.3.4 Auswertung des MTT-Tests und des RBAs

Die Auswertung der beiden Testverfahren, die auf einem ähnlichen Prinzip basieren, erfolgte direkt im Anschluss durch Bestimmung der optischen Dichte im ELISA-Reader (Titertek[®]Multiskan Plus, Flow Laboratories, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm.

3.3.5 Berechnung der Zytotoxizität

Für die Berechnung der Zytotoxizität wurde die Differenz der optischen Dichten der Testansätze (Effektorzellen + Zielzellen) und der Kontrollansätze, welchen keine Effektorzellen hinzugegeben worden sind, entsprechend der nachfolgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zytotoxische Aktivität [\%]} = 100 - \frac{\text{OD Testansatz}}{\text{OD Kontrollansatz}} \cdot 100$$

3.3.6 Rosettenformation

Um zu überprüfen, in wie weit die Zellen einen direkten Zell-Zellkontakt herstellen und damit Rückschlüsse auf eine zytotoxische Aktivität der Large Granular Lymphocytes ziehen zu können, wurden die CTAC-Zellen mit den LGL-Zellen in einem Verhältnis von 1:5 für 14 Stunden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß im Brutschrank bei 37 °C in einer 5 %igen-CO₂ Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde mit der Zytocentrifuge (Shandon Elliott Cytospin Centrifuge) bei geringer Drehzahl (25 x g, 10 min), damit die Zellen nicht auseinander gerissen wurden, ein Zytospinpräparat erstellt. Dieses wurde anschließend 30-45 min mit Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt) gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet.

3.4 MTT-Test zur Überprüfung der Proliferation

3.4.1 Stimulation mit Interleukin 2

Zur Stimulation der Large Granular Lymphocytes wurde Interleukin 2 (Humanes Interleukin 2, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) in einer Konzentration von 50 U/ml Medium eingesetzt (Tompkins et al., 1989).

3.4.2 Stimulation mit Concanavalin A

Für die Stimulation der Zellen mit Concanavalin A (Con A, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wurde die von Wagner (1998) als optimal für kanine Lymphozyten ermittelte Konzentration von 2 µl/ml Medium eingesetzt. Dafür wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, indem das gefriergetrocknete Con A in 5 ml sterilem Medium gelöst wurde, sodass die erstellte Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert werden konnte. Zur weiteren Verwendung wurden 100 µl der Stammlösung mit 900 µl Medium versetzt, um eine endgültige Konzentration von 100 µl/ml zu erhalten. Entsprechend wurden anschließend die Lymphozytensuspension, Medium und Con A-Gebrauchslösung so eingesetzt, dass eine Konzentration von 2 µg Con A/ml Medium für die Stimulation vorlag.

3.4.3 Stimulation mit 20 % FCS

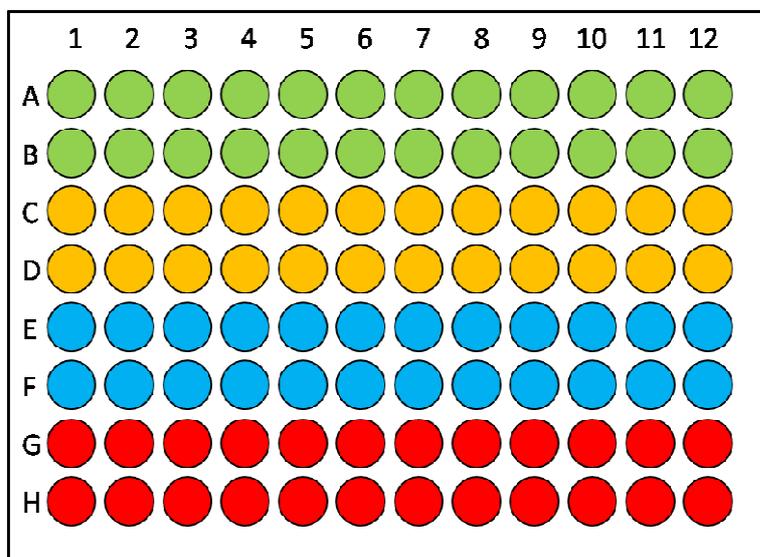
Der MTT-Test ist auch zur Überprüfung der Zellproliferation oder für Versuche geeignet, bei denen die Aktivität einer Zelllinie kontrolliert werden soll (Mosmann, 1983). Für die Bestimmung der Proliferationsrate der Zellen ist es von Bedeutung, dass die umgesetzten Farbstoffkristalle direkt mit der Anzahl der Zellen korrelieren (Mosmann, 1983). Im Gegensatz zu den Versuchen, bei denen die zytotoxische Aktivität überprüft wurde, wurde bei Versuchen zur Proliferation lediglich die S87-Zelllinie eingesetzt.

Für die Stimulation mit FCS wurden das unter Kapitel 3.2.1 beschriebene Kulturmedium statt mit 10 % mit der höheren Konzentration von 20 % FCS versetzt. Zunächst wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und anschließend jeweils 100 µl der Zellsuspension in jede Vertiefung einer 96-well-Platte (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) pipettiert. Den Zellen in den ersten beiden Zeilen wurde lediglich normales (nicht konditioniertes), 10 % FCS enthaltendes Medium zugesetzt. Diese Zellen galten damit als unstimuliert und stellten jeweils die Kontrollwerte für die stimulierten Zellen dar. Die Zellen in der dritten und vierten Zeile wurden mit 20 %igem FCS-Medium versorgt. Die Zellen in den darauf folgenden beiden Zeilen wurden mit Interleukin 2 und die Zellen in den letzten

beiden Zeilen mit Concanavalin A stimuliert (vgl. Abbildung 1). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Die erste Messung erfolgte direkt im Anschluss an die Präparation der Platte und wurde wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden zunächst nur die ersten zwei Reihen untersucht. Dieser Versuch wurde in regelmäßigen Abständen von zwei Tagen durchgeführt, um die Entwicklung der Zellpopulation verfolgen zu können. Dabei wurden jeweils die nächsten beiden, noch nicht gemessenen Reihen für die Versuche genutzt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die anderen Reihen, die noch weiter untersucht werden mussten, mit frischem, entsprechend der Versuchsanordnung Mitogen enthaltendem Medium versorgt. Die gemessenen Werte wurden in Beziehung zu den Werten der unstimulierten Zellen gesetzt und daraus ein Stimulationsindex nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Stimulationsindex (SI)} = \frac{\text{Mittelwert (OD) der stimulierten Zellen}}{\text{Mittelwert (OD) der unstimulierten Zellen}}$$

Abbildung 1: Schematische Darstellung des unter Kapitel 3.4 beschriebenen Stimulationsversuchs



In grün sind die unstimulierten Zellen dargestellt, denen lediglich normales Medium beigegefügt wurde. In gelb Zellen, die mit Interleukin 2, in blau, die mit Concanavalin A und in rot, die mit 20 % FCS-Medium inkubiert wurden.

3.5 Analyse der Klonierungsgrenze

3.5.1 Limited-Dilution-Klonierung

Bei der Limited-Dilution-Klonierung handelt es sich um eine Klonierungsmethode, die sowohl für adhärenente als auch für Suspensionszellen genutzt werden kann. Hierbei wurde zunächst mittels der Neubauer-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe) die Zellzahl pro ml bestimmt und anschließend anhand des Ergebnisses eine Verdünnungsreihe angelegt. Jede Verdünnungsstufe wurde hierbei in einem Verhältnis 1:10 angesetzt. Diese Verdünnungen wurden so weit durchgeführt, bis eine Verdünnungsstufe mit einer rein rechnerischen Konzentration von 100 Zellen/ml erreicht wurde. In eine 96-well-Platte (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) wurden verschiedene Volumina der unterschiedlichen Verdünnungsreihen pipettiert und die exakte Zellzahl pro Vertiefung anschließend mikroskopisch ermittelt.

Anschließend wurden die Vertiefungen auf ein Volumen von 200 µl mit Medium aufgefüllt, um den Zellen entsprechende Nährstoffe zur Verfügung zu stellen.

Es folgte eine tägliche mikroskopische Kontrolle, ob sich die Zellzahl in einer Vertiefung verändert hatte. Jeden zweiten Tag wurden vorsichtig und ohne die Zellen aufzuwirbeln 100 µl des verbrauchten Mediums aufgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

3.5.2 Klonierung im Weichagar

Bei der Klonierung im Weichagar werden die Zellen in einem durch Zugabe von Agar halbfest gemachten (weichen) Medium kultiviert. Durch die geleeartige Konsistenz des 2 %igen Agars werden die Zellen im dreidimensionalen Raum fixiert, können aber dennoch proliferieren. Die so entstehenden Zellklone (Zellkolonien) können einzeln entnommen und zur Subklonierung weiter kultiviert werden. Ein weiterer Vorteil der Methode ist, dass einem festeren Grundagar sogenannte „feeder cells“, Unterstützungszellen, beigemischt werden können, um durch deren wachstumsfördernde Stoffwechselprodukte die Proliferation der zu klonierenden Zellen im darüber liegenden Weichagar zu verbessern und zu fördern.

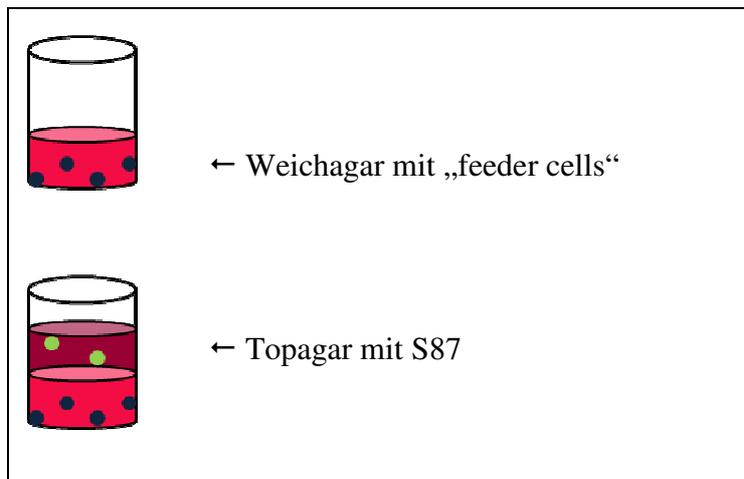
Als „feeder cells“ wurden zum einen S87, zum anderen Fibroblasten genutzt. Die adhärenenten Fibroblasten wurden bereits einen Tag zuvor in die 6-well-Platten (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) eingesät, um ein optimales Anheften der adhärenenten Zellen zu ermöglichen. Im Anschluss wurden 2 ml der Agarmixtur (siehe unten) auf die „feeder cells“ pipettiert. Nach 15 min war der Agar soweit ausgehärtet, dass die zweite Schicht bestehend

aus der LGL-Zellsuspension und der Agarmixtur auf die erste Schicht pipettiert werden konnte. Im Anschluss konnte das Ergebnis unter dem inversen Mikroskop betrachtet werden. Im weiteren Verlauf wurde die Vertiefungen der Platte täglich auf das Ausbilden von Zellkolonien untersucht. Auch hier wurden verschiedene Zellkonzentrationen angesetzt, um feststellen zu können, ab welcher Zelldichte die Zellen anfangen zu proliferieren.

Agarmixtur

- 12,5 ml 2x DMEM (siehe unter 8.3.3 im Anhang)
- 15 ml 1x DMEM (siehe unter 8.3.3 im Anhang)
- 10 ml Pferdeserum (inaktiviert) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 12,5 ml Agar (2 %)
 - 2 g Bacto[®] Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA)
 - mit Aqua dest. auf 100 g aufwiegen

Abbildung 2: Schematische Darstellung des unter 3.5.2 beschriebenen Versuchsaufbaus zur Klonierung im Weichagar



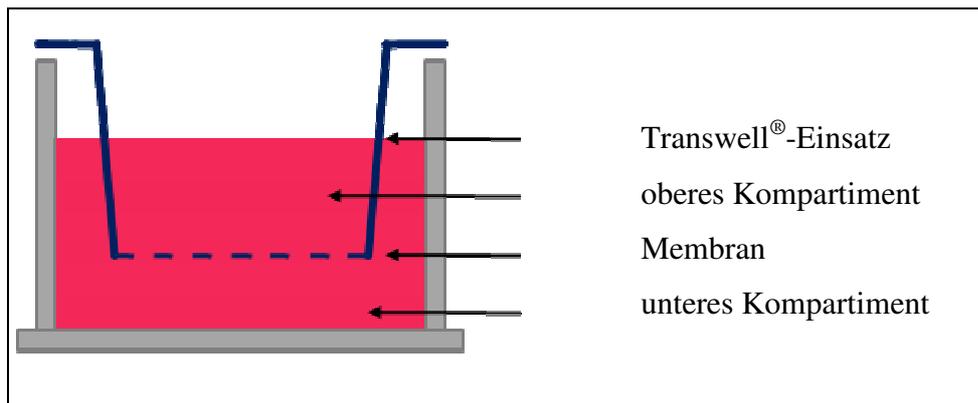
3.5.3 Klonierung mit Transwell[®]-Einsätzen

Bei Zellkulturplatten mit Transwell[®]-Einsätzen (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, USA) kann durch ein Zwei-Kompartiment-System eine Trennung in zwei Bereiche einer Plattenvertiefung ermöglicht werden, die zwar durch eine Membran miteinander in Kontakt stehen, die Poren jedoch so klein sind, dass lediglich Wachstumsfaktoren hindurch diffundieren können. Die Zellen selbst sind jedoch zu groß, um die Membran zu durchqueren.

Auch hier besteht der Vorteil darin, dass ähnlich wie beim Weichagar, „feeder cells“ in ein Kompartiment eingesät werden können, ohne dass die Gefahr besteht, dass sich die Zellpopulationen durchmischen.

In diesem Fall wurde zum einen eine 6-Transwell®-Platte (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, Massachusetts, USA), zum anderen eine 96-Transwell®-Platte (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, Massachusetts, USA) verwendet. Als „feeder cells“ dienten Fibroblasten und Zellen der Ursprungszelllinie selbst. Die adhärennten Zellen wurden bereits einen Tag vorher eingesät, um ein optimales Anwachsen zu gewährleisten. Am nächsten Tag konnte das zweite Kompartiment eingesetzt werden, sodass es mit dem Medium des unteren Kompartiments über die Membran in Kontakt stand. In das obere Kompartiment konnten nun Zellen in beliebiger Konzentration eingesät werden. Es erfolgte eine tägliche Wachstumskontrolle unter dem inversen Mikroskop.

Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Transwell®-Einsatzes



3.6 Chromosomenpräparation

Um die S87-Zelllinie auf chromosomale Aberrationen untersuchen zu können, wurde eine Chromosomenpräparation vorgenommen. Diese erfolgte nach der von Barch (1991) beschriebenen und von Henegariu et al. (2001) modifizierten Methode. Dazu musste der Mitosevorgang in der Metaphase unterbrochen werden. Um dies zu erreichen, wurde den Zellen zwei Stunden vor Beginn der Präparation 0,05 µg/ml Colcemid® (Biochrom AG Seromed, Berlin), ein synthetisches Analogon zum Colchizin, dem Gift der Herbstzeitlosen, hinzugegeben und die Zellen für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Colchizin verhindert die Ausbildung des Spindelapparates und unterbindet das Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden, so dass sich Metaphaseplatten anreichern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension in

sterile Zentrifugationsröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 10 min bei 200 x g zentrifugiert (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde abgesaugt und im Anschluss das Pellet in auf 37 °C vorgewärmter 0,075 M KCL-Lösung (siehe 8.3.3 im Anhang) resuspendiert. Die Zellen wurden in dieser hypotonen Lösung für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, wobei es durch die Hypotonie zum Wassereinstrom kommt, das Zellvolumen sich vergrößert und eine Instabilität der Zellmembran herbeigeführt wird. Nach einer erneuten Zentrifugation (200 x g, 8 min, RT) wurde mit der Vorfixierung begonnen. Das Fixans setzte sich folgendermaßen zusammen: 75 ml 99,8 % Methanol (Rotipuran[®], Carl Roth, Karlsruhe) wurden mit 25 ml 100 % Essigsäure (Rotipuran[®], Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und auf -20 °C gekühlt. Bei der Vorfixierung wurde nach dem Absaugen des Überstandes bis auf 1 cm und der Resuspendierung im restlichen Überstand zwei Teile hypotone Lösung zugefügt und im Anschluss ein Teil des auf -20 °C gekühlten Fixans. Nach 2-3 min Inkubation wurde erneut zentrifugiert (200 x g, 8 min, RT) und nach dem Absaugen des Überstandes das Pellet in reinem Fixans resuspendiert. Dabei wurde darauf geachtet, die Zellsuspension stets in Bewegung zu halten, damit die Zellen nicht verklumpten. Dieser zuletzt beschriebene Waschvorgang wurde insgesamt fünfmal durchgeführt.

Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml Fixans resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension aus einer Höhe von ca. 20-30 cm auf einen auf -20 °C gekühlten Objektträger (SuperFrost[®] Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen) mit Hilfe einer Pipette aufgetropft. Beim Auftreffen der Zellen auf den Objektträger platzen die Zellen im Idealfall auf und die Metaphaseplatten werden frei. Danach wurden die Objektträger für 4 Sekunden in 70 °C heißen Wasserdampf gehalten, sodass die kondensierten Chromosomen rehydrierten. Anschließend wurde auf den Rand des Objektträgers ein Tropfen 100 % Essigsäure (Rotipuran[®], Carl Roth, Karlsruhe) gegeben und nach 5 Sekunden Wartezeit der Objektträger erneut für 4 Sekunden in den Wasserdampf gehalten.

Nachdem die Objektträger bei Raumtemperatur luftgetrocknet waren, standen sie für die verschiedenen weiteren Färbemethoden zur Verfügung. Den Kontrollzellen (PBMC) wurden 24 Stunden vor Beginn der Präparation zur Stimulation 10 ml „Prämix“ (siehe 8.3.3 im Anhang) zugegeben.

3.6.1 Giemsa-Färbung

Für die Giemsa-Färbung mussten zunächst zwei Puffer, Sörensen A und Sörensen B, hergestellt werden. Für die Sörensen A-Lösung wurde 4,539 g Kaliumdihydrogenphosphat

(KH_2PO_4 , Merck KGaA, Darmstadt) in 500 ml Aqua dest. gelöst, für die Sörensen B-Lösung wurden 5,938 g Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, Merck KGaA, Darmstadt) in 500 ml Aqua dest. gelöst.

Für die Erstellung der Gebrauchslösung wurden von beiden Puffern jeweils 10 ml miteinander gemischt. Dabei entstand eine Lösung mit einem pH von 6,8. Dazu wurden 5 ml der Giemsa-Stammlösung (Merck KGaA, Darmstadt) gegeben und die Färbelösung in eine Glasküvette gefüllt. Im Anschluss wurden die Objektträger für 6 min in der Glasküvette gefärbt. Nach Ablauf des Färbeprozesses wurde die Küvette solange mit Leitungswasser gespült, bis das Wasser klar blieb. Danach erfolgte eine weitere Spülung mit destilliertem Wasser.

Die Objektträger wurden luftgetrocknet und anschließend manuell mit Eukitt[®] (O. Kindler, Freiburg i. Br.) und einem Deckglas eingedeckelt.

3.6.2 DAPI-Färbung

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 358 nm und einem Emissionsmaximum von 461 nm. Für die DAPI-Färbung wurden die präparierten Metaphaseplatten auf den Objektträgern zunächst in mit McIlvain's Puffer (pH 7,0, siehe 8.3.3 im Anhang) gefüllten Küvetten gespült. Anschließend wurde eine DAPI-Arbeitslösung erstellt, indem die Stammlösung (2 mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe) 1:100 mit McIlvain's Puffer verdünnt wurde. In dieser Färbelösung wurden die Objektträger 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend nochmals mit McIlvain's Puffer gespült. Im Anschluss konnten sie mit einem Tropfen Puffer und einem Deckglas eingedeckt und mit Fixogum (Marabu, Tamm) verschlossen werden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse 80i, Nikon GmbH, Düsseldorf) mit einem entsprechenden DAPI-Filter (340-450 nm, Absorptionsmaximum 360 nm; Nikon GmbH, Düsseldorf) und dem Program NIS-Elements BR 3.2 (Nikon GmbH, Düsseldorf).

3.6.3 G-Banding

Durch spezielle Färbemethoden ist es möglich, dass die Metaphasechromosomen eine Bänderung erhalten, welche eine bessere Identifizierung der einzelnen Chromosomen ermöglicht. Dafür wurden die Chromosomen zunächst nach der im Kapitel 3.6 beschriebenen Methode präpariert und die Objektträger vor der Giemsa-Färbung zunächst in PBS-Puffer (pH 7,4, siehe 8.3.3 im Anhang) gespült. Im Anschluss wurden die Objektträger für 10 Sekunden in einer Trypsingebrauchslösung (siehe 8.3.3 im Anhang) geschwenkt und danach sofort für

10 Sekunden erneut in PBS-Puffer (pH 7,4 siehe 8.3.3 im Anhang) gespült. Die Objektträger konnten anschließend wie unter Kapitel 3.6.1 beschrieben gefärbt werden.

3.6.4 Erstellung der Karyogramme

Um zu überprüfen, inwieweit mögliche numerische Chromosomenabweichungen einer Regularität und Kontinuität unterliegen, wurden von Passage 10 jeweils zehn Karyogramme von Metaphaseplatten mit 38 und mit 39 Chromosomen, und von Passage 80 jeweils zehn Karyogramme von Metaphaseplatten mit 39 und mit 40 Chromosomen angefertigt. Die fehlenden oder überschüssigen Chromosomen wurden entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit, wie sie nach den Vorgaben der San Juan Conference (Jones, 1965) definiert ist, einsortiert und tabellarisch notiert.

3.7 Transmissionselektronenmikroskopie

3.7.1 Darstellung der Zellmorphologie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die S87-Zellen zunächst zweimal in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt) gewaschen, indem 1 ml der auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß zunächst zentrifugiert (10 min, RT, 400 x g) (Mikroliter, Andreas Hettich, Tuttlingen) und anschließend das Zellpellet in 1 ml HBSS resuspendiert wurde. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Puffer bis auf 200 µl abgesaugt und die Zellen darin resuspendiert. Fixiert wurden die Zellen in 1,5 %igem Glutaraldehyd (siehe 8.3.3 im Anhang) für 3 h bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 0,166 M Cacodylatpuffer (pH 7,3, siehe 8.3.3 im Anhang) gewaschen, um das Glutaraldehyd zu entfernen. Für die Nachfixierung wurden die Zellen in 1 %iger Osmiumtetroxidlösung (siehe 8.3.3 im Anhang) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um die 1 %ige Osmiumtetroxidsäure zu entfernen, wurde die Lösung nach der Inkubationszeit vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal in 0,166 M Cacodylatpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 % und 90 %) jeweils zweimal 10 min und anschließend zweimal 15 min in 100 %igem Alkohol und dreimal 10 min in Xylol entwässert. Für die Kunststoff-Einbettung wurde zunächst eine Xylol-Eponmischung (Epon 812, Fluka, Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) im Verhältnis 1:1 angesetzt und die Zellen für 15 min in dem Gemisch belassen und im Anschluss eine Inkubation in einem 1:2 Gemisch über Nacht vorgenommen. Am nächsten Tag erfolgte eine Überführung in pures Epon (Epon 812, Fluka,

Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) zunächst für eine Stunde, wobei das Eppendorfgefäß zwischendurch immer wieder auf 45 °C erwärmt wurde. Nach der Zugabe von frischem Epon (Epon 812, Fluka, Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) wurden die Zellen zunächst für 24 h bei 45 °C, anschließend für 20 h bei 60 °C inkubiert. Nach einer Woche Aushärtung konnte das eingebettete Zellpellet vorsichtig aus dem Eppendorfgefäß gelöst werden und Semi- und Ultradünnschnitte entsprechend der Standardpräparationstechnik mit einem Ultramikrotom angefertigt werden. Die Untersuchungen erfolgten im Elektronenmikroskop (EM 109, Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 80 kv.

3.8 Immunzytologische Untersuchungen

3.8.1 Einbettung von Zellpellets in Paraffin

Die immunzytologische Untersuchungen wurden größtenteils an in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebetteten Zellpellets vorgenommen.

Dazu wurden zunächst 15 ml Zellsuspension in ein konisches Zentrifugationsröhrchen überführt und anschließend 7 min bei 15 °C mit 1000 x g zentrifugiert (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen). Im Anschluss wurde der Überstand im Zentrifugationsröhrchen abgesaugt. Das dabei entstandene Pellet wurde in 1500 µl frischem Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dieses wurde erneut 10 min bei Raumtemperatur mit 2000 x g (Mikroliter, Andreas Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Resuspendierung erfolgte mit 10 %igem ungepuffertem Formalin, in dem die Zellen über Nacht fixiert wurden.

3.8.2 Herstellung eines Paraffinblocks

Nach der Fixation über Nacht wurden die Zellen erneut 10 min bei RT mit 2000 x g zentrifugiert (Mikroliter, Andreas Hettich, Tuttlingen). Die Spitze des Eppendorfgefäßes wurde mit Hilfe einer Schere abgeschnitten und in eine mit einem Filterpapier ausgelegte Einbettungskapsel gelegt. Es erfolgte die Einbettung nach Standardmethoden im Gewebereinbettungsautomaten (Tissue-Tek[®] VIP[™] 5 Jr., Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) und danach das Ausgießen an einer Ausgießstation (Tissue-Tek[®] TEC[™] 5, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) bei 65 °C in Paraffin (Roti[®]-Plast, Schmelzpunkt 56-58 °C, Carl Roth, Karlsruhe) in den üblichen Metallformen. Der Paraffinblock kann dauerhaft bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.8.3 Herstellung eines Gefrierblocks

Für die Erstellung eines Gefrierblockes wurde zunächst mit Hilfe einer Einwegpipette ein ca. linsengroßes Stück des Zellpellets in eine Metallausgießschale, wie sie auch bei der Herstellung von Paraffinblöcken benutzt wird, überführt. Danach wurde das Zellpellet mit O.C.T.TM Einbettmedium (Tissue-Tek[®] O.C.TTM Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) überschichtet und für 5 Minuten bei -40 °C im Kryotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung, Nußloch) ausgehärtet.

Im Anschluss konnte mit dem Anfertigen der Gefrierschnitte begonnen werden. Die so hergestellten Gefrierblöcke können in Alufolie eingewickelt jahrelang bei -80 °C gelagert werden.

3.8.4 Anfertigung der Paraffinschnitte

Für die immunzytologischen Untersuchungen wurden die Schnitte stets einen Tag vor Beginn der immunzytologischen Untersuchung angefertigt.

Dafür wurden die Paraffinblöcke zunächst bei -20 °C für 30 min in einem Eisschrank auf einer mit Eis gefüllten Schale gekühlt, um die Schneidbarkeit zu verbessern. Im Anschluss konnten Paraffinschnitte (2 µm Schnitteinstellung) mit einem Rotationsmikrotom (Rotationsmikroskop RM 2255, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) angefertigt werden. Die Paraffinschnitte wurden in ein mit 40-42 °C warmem Wasser gefülltes Wasserbad überführt und auf einen Objektträger (SuperFrost[®] Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen) mit Hilfe eines Pinsels aufgezogen. Über Nacht wurden die Paraffinschnitte luftgetrocknet.

3.8.5 Anfertigung der Gefrierschnitte

Für die Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die Gefrierblöcke zunächst auf den Probenblock aufgefroren. Die Schnitte wurden im Kryotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung, Nußloch) bei -22 °C (Zellpellet) und bei -20 °C (Positivkontrolle; Lymphknoten einer Sektionskatze) angefertigt und direkt auf SuperFrost[®] Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Teningen) aufgezogen. Die angefertigten Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend 10 min in Aceton fixiert. Es folgte eine Trocknung für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die angefertigten Gefrierschnitte konnten entweder nach der Trocknungszeit direkt für die immunzytologische Untersuchung verwendet, oder in kleinen Transportboxen (Rotilabo®-Objektträgertransportkisten, Carl Roth, Karlsruhe) ebenfalls bei -80 °C eingefroren werden.

Falls die Schnitte vor Beginn der immunzytologischen Untersuchung eingefroren waren, mussten sie zunächst 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und luftgetrocknet werden.

3.8.6 Seren zur Blockierung unspezifischer Antigen-Reaktionen

Das jeweils benutzte Pferdeserum (PS), Rattenserum (RS), Ziegenserum (ZS) und Schweineserum (SS) (alle PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) wurden bis zur Verwendung bei -20 °C im Gefrierfach gelagert und vor der Benutzung bei Raumtemperatur aufgetaut.

3.8.7 Antiseren

3.8.7.1 Primärantikörper

Tabelle 2: Primärantikörper (Klon und Bezugsquelle) und ihr Einsatzgebiet

Antikörper/Klon	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Einsatzgebiet
Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg; (A0452)	Pan-T-Zell-Marker zum Nachweis des CD3-Antigens (Beebe et al., 1994)
Rat Anti-Mouse CD45R, Klon RA3-6B2	Linaris, Dossenheim; (ADI-MCD045R-B)	Monoklonaler Antikörper gegen das CD45R-Antigen auf B-Zellen, der sowohl B-Zellen und Plasmazellen als auch deren Vorstufen erfasst (Coffman und Weissman, 1981b; Monteith et al., 1996)
Mouse Anti- Human B Lymphocyte Antigen (BLA.36), Klon A27-42	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg; (M533)	Antikörper gegen das humane B-Lymphozyten-Antigen 36 (BLA.36); Mensch: Reed-Sternberg-Zellen von Hodgkin-Lymphomen sowie frühe und aktive B-Zellen; Katze: zur B-/T-Zelldifferenzierung (Darbes et al., 1998; Day et al., 1999; Della Croce et al., 1991; Pohlman et al., 2009; Walton und Hendrick, 2001)
Monoclonal Mouse Anti- Human CD79 α /APC, Klon HM57	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg;(C7252)	Monoklonaler Antikörper zum Nachweis von B-Zellen bei der Katze (Valentine et al., 2000; Walton und Hendrick, 2001; Waly et al., 2005)

Tabelle 2: Primärantikörper (Klon und Bezugsquelle) und ihr Einsatzgebiet (Fortsetzung)

Antikörper/Klon	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Einsatzgebiet
Maus Anti-Katze CD4, Klon vpg 38	Serotec, Kidlington, UK; (MCA 1350)	Der Nachweis erfolgte an Gefrierschnitten, da es sich hierbei um ein sogenanntes fixierungs- bzw. prozessierungssensitives Antigen handelt (Blaschitz et al., 2008; Kunder et al., 2007; Waly et al., 2001). Der Antikörper dient der Detektion von CD4 ⁺ T-Helferzellen.
Maus Anti-Katze CD8 (α- und β- Kette) des CD8, Klon vpg 9	Serotec, Kidlington, UK; (MCA 1347)	Nachweis an Gefrierschnitten (s.o.), CD8 fungiert als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors und interagiert spezifisch mit dem Klasse-I-Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-I). Er wird von zytotoxischen T-Zellen exprimiert und kann somit zur Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen genutzt werden (Tompkins et al., 1990).
CD56 (NCAM), Klon CD564	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar; (NCL- CD56-504)	Das CD56-Antigen kann von Large Granular Lymphocytes exprimiert werden (Lanier et al., 1986c) und wird auch als neuronales Zell-Adhäsions-Molekül (N-CAM) bezeichnet (Lanier et al., 1989).
Monoclonal Mouse Anti- Human natural killer cell-like, Klon NK1	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg; (M1014)	Mensch: Marker für Large Granular Lymphocytes. Hier sind es vor allem CD3 ⁺ /CD8 ⁺ Large Granular Lymphocytes, die eine positive Reaktion zeigen (Loughran, 1993).
Rabbit Anti- Human Granzyme B Polyclonal Antibody	Spring Bioscience, Fremont, Kalifornien, USA; (E2580)	Granzym B wurde von Tsuboi et al. (2010) als potenzieller Marker für die Diagnose eines Large Granular Lymphocyte-Lymphoms bei der Katze beschrieben.
Maus α-p27 FeLV, Klon PF12J-10A und Maus α-gp70 FeLV, Klon C11D82i	Custom Monoclonals Int.; Sacramento, CA.USA	Der Nachweis der FeLV-Antigene erfolgte mittels der indirekten Immunperoxidase-Technik (IPO) (Reinacher und Theilen, 1987).

Tabelle 2: Primärantikörper (Klon und Bezugsquelle) und ihr Einsatzgebiet (Fortsetzung)

Antikörper/Klon	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Einsatzgebiet
Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein, Klon 100/D5	Novocastra; Newcastle Upon Tyne, UK; (NCL-L-bcl-2)	Bcl-2 gehört zu einer gleichnamigen Proteinfamilie und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose, bei der es als antiapoptotisches Protein fungiert.
Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Klon PC10	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg; (M0879)	PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) wurde erstmals im Rahmen von Untersuchungen von Patienten mit Lupus erythematoses entdeckt und dient als Hinweis für die Proliferationsaktivität von Zellen (Miyachi et al., 1978).
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Klon MIB-1	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg; (M7240)	Das Ki-67-Antigen kann nur bei proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Ki-67 wird von normalen und neoplastischen Zellen in der G ₁ -, S- und G ₂ -, nicht aber in der G ₀ -Phase exprimiert (Gerdes et al., 1984; Scholzen und Gerdes, 2000).

Tabelle 3: Inkubationsmethoden

Antikörper/Klon	Verdünnung, Sek. Ak., Methode	Vorbehandlung, Serum zum Blocken (Zeit)	Inkubationszeit (Temperatur)
Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3	1:100 (TBS/20 % SS), Schwein Anti-Kaninchen IgG, PAP	Target Retrieval (Dako Diagnostika GmbH, Hamburg), SS (15 min)	über Nacht (4 °C)
Rat Anti-Mouse CD45R, Klon RA3-6B2	1:1000 (TBS/1 % BSA), Biotin. Rabbit Anti-Rat IgG, ABC	Zitratpuffer pH 6,0 (siehe 8.3.3 im Anhang), PS (15 min)	über Nacht (4 °C)
Mouse Anti-Human B Lymphocyte Antigen (BLA.36), Klon A27-42	1:50 (TBS/1 % BSA), Biotin. Horse Anti-Mouse IgH (H+L), ABC	Zitratpuffer pH 6,0 (siehe 8.3.3 im Anhang), PS (10 min)	über Nacht (4 °C)

Tabelle 3: Inkubationsmethoden (Fortsetzung)

Antikörper/Klon	Verdünnung, Sek. Ak., Methode	Vorbehandlung, Serum zum Blocken (Zeit)	Inkubationszeit (Temperatur)
Maus α -p27 FeLV, Klon PF12J-10A	p27 1:100, gp70 1:200 (beides in TBS/20 % SS) mischen 1:1, Kaninchen Anti-Maus IgG PO, IPO	TUF [®] (Target Unmasking Fluid; Dianova, Hamburg), SS (15 min)	über Nacht (4 °C)
Maus α -gp70 FeLV, Klon C11D82i			
CD56 (NCAM), Klon CD564	1:100 (TBS/1 % BSA), Biotin. Horse Anti-Mouse IgG (H+L), ABC	Zitratpuffer pH 6,0 (siehe 8.3.3 im Anhang), PS (10 min)	60 min (4 °C)
Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein, Klon 100/D5	1:80 (TBS), Biotin. Horse Anti-Mouse IgG (H+L), ABC	Zitratpuffer pH 6,0 (siehe 8.3.3 im Anhang), PS (15 min)	über Nacht (4 °C)
Maus Anti-Katze CD8 (α - und β -Kette) des CD8, Klon vpg 9	1:500 (TBS), Ratte Anti-Maus IgG (H+L), PAP	RS (10 min)	über Nacht (4 °C)
Maus Anti-Katze CD4, Klon vpg 38	1:10 (TBS), Ratte Anti-Maus IgG (H+L), PAP	RS (10 min)	über Nacht (4 °C)
Monoclonal Mouse Anti-Human natural killer cell-like, Klon NK1	1:75 (TBS/1 % BSA), Biotin. Horse Anti-Mouse IgG (H+L), ABC	ZS (15 min)	über Nacht (4 °C)
Rabbit Anti-Human Granzyme B Polyclonal Antibody	1:10, 1: 50, 1:100, 1:200 (TBS/20 % SS) a) Biotin. Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) b) Biotin. Horse Anti-Maus IgG (H+L) PAP, Steptavidin HRPO	a) Zitratpuffer pH 6,0 (siehe 8.3.3 im Anhang) b) Target Retrieval (Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) c) 0,25 % Trypsin (Trypsin from hog pancreas 127 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim) (15 min, 37 °C) ZS (15 min)	über Nacht (4 °C)

Tabelle 3: Inkubationsmethoden (Fortsetzung)

Antikörper/Klon	Verdünnung, Sek. Ak., Methode	Vorbehandlung, Serum zum Blocken (Zeit)	Inkubationszeit (Temperatur)
Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Klon PC10	1:100 (TBS/1 % BSA), Ratte Anti-Maus IgG (H+L), PAP	Zitratpuffer pH 4,0 (siehe 8.3.3 im Anhang), RS (15 min)	über Nacht (4 °C)
Monoclonal Mouse Anti-Human CD79 α /APC, Klon HM57	1:50 (TBS/1 % BSA), Biotin. Horse Anti-Mous IgG (H+L), ABC	Zitratpuffer pH 6,0 (siehe 8.3.3 im Anhang), PS (15 min)	über Nacht (4 °C)
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Klon MIB-1	1:100 (TBS/1 % BSA), Ratte Anti-Maus IgG (H+L), PAP	Zitratpuffer pH 6,0 (siehe 8.3.3 im Anhang), RS (15 min)	über Nacht (4 °C)

Abkürzungen: ABC: Avidin-Biotin-Komplex, BSA: Bovine Serum Albumin, IPO: Immunperoxidase-Technik, PAP: Peroxidase Anti-Peroxidase, PS: Pferdeserum, SS: Schweineserum, TBS: Tris-buffered Saline, ZS: Ziegenserum

3.8.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 4: Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Verdünnung	Inkubationszeit (Temperatur)
Kaninchen α -Maus IgG-PO	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg; (P0161)	1:100 in TBS/20 % SS	30 min (RT)
Schwein Anti-Kaninchen IgG	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg; (ZO 196)	1:100 in TBS/20 % SS	30 min (RT)
Biotin. Rabbit Anti-Rat IgG (H+L), Moused absorbed	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA; (BA-4001)	9 μ l auf 1 ml TBS/1 % BSA	30 min (RT)

Tabelle 4: Sekundärantikörper (Fortsetzung)

Antikörper	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Verdünnung	Inkubationszeit (Temperatur)
Biotin. Horse Anti-Mouse IgG (H+L)	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA; (BA-2000)	9 µl auf 1 ml TBS/1 % BSA	30 min (RT)
Ratte Anti-Maus IgG (H+L)	Dianova GmbH, Hamburg; (415005166)	1:100 in TBS	30 min (RT)
Biotin. Goat anti Rabbit IgG H+L	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA; (BA-1000)	1:100 in TBS/1 % BSA	30 min (RT)

H+L: reagiert mit der schweren (heavy) und der leichten (light) Kette. Biotin.: biotinyliert

3.8.7.3 Tertiärantikörper

Tabelle 5: Tertiärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Verdünnung	Inkubationszeit (Temperatur)
PAP vom Kaninchen	Dianova GmbH, Hamburg; (323-005-024)	1:600 in TBS/1 % BSA	30 min (RT)
ABC-Komplex, Peroxidase Standard	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA; (PK-4000)	9 µl A+B auf 1 ml TBS/1 % BSA	30 min (RT)
PAP von der Maus	Dianova GmbH, Hamburg; (N223005024)	1:500 in TBS	30 min (RT)
Streptavidin HRPO Conjugate	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe (SA1007)	1:500 in TBS/1 % BSA	30 min (RT)

3.8.8 Allgemeines Protokoll zu den immunzytologischen Untersuchungen

- 1) Aufziehen der Paraffinschnitte auf SuperFrost[®] Plus Objektträger (SuperFrost[®] Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen) und Trocknung über Nacht
- 2) Jeweils 3 min mit dreimaliger Wiederholung die Schnitte entparaffinieren in Xylol-Ersatz (Roti-Histol[®]), und anschließend rehydrieren je zweimal 3 min in Isopropanol, 3 min in 96 %igem und 3 min in 80 %igem Alkohol
- 3) Hemmung der endogenen Peroxidase in Methanol mit frisch zugesetztem 0,5 %igem Wasserstoffperoxid (Merck KGaA, Darmstadt) für 30 min
- 4) Einmaliges Waschen der Schnitte für 5 min mit Tris-buffered saline (TBS) (pH 7,8; siehe 8.3.3 im Anhang)
- 5) Vorbehandlung
 - a. mit auf 97 °C erwärmtem Target Retrieval (Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) im Wasserbad für 20-25 min, anschließend kühlen die Objektträger 15 min bei RT darin ab
 - b. mit auf 97 °C erwärmtem Zitratpuffer (siehe 8.3.3 im Anhang) im Wasserbad für 20-25 min, anschließend kühlen die Objektträger 15 Minuten bei RT darin ab
 - c. mit 0,25 % Trypsin (Trypsin from hog pancreas 127 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim) mit 0,02 g CaCl₂ in Aqua dest., pH: 7,6, Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C
- 6) Umsetzen der Objektträger in Coverplates[™] (Shandon Racks, Thermo Scientific, Dreieich)
- 7) Einmaliges Spülen der Objektträger für 5 min mit 2 ml TBS
- 8) 15-minütige Inkubation mit dem Blockingserum
- 9) Auftragen des Primärantikörpers und Inkubation
- 10) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die Coverplates[™] für 5 min

- 11) Auftragen des Sekundärantikörpers und Inkubation
- 12) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die CoverplatesTM
- 13) Auftragen des Tertiärantikörpers und Inkubation
- 14) Zweimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die CoverplatesTM
- 15) Entnahme der Objektträger aus den CoverplatesTM und einmaliges Spülen in einer mit TBS gefüllten Küvette (5 min, RT)
- 16) Inkubation der Schnitte für 10 min unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette mit 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH) mit 0,01% H₂O₂ in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; siehe 8.3.3 im Anhang)
- 17) Dreimaliges Waschen der Schnitte für 5 min mit TBS und einmal für 5 min in Aqua dest.
- 18) Inkubation der Objektträger für 5 min in Kardasewitsch-Lösung (siehe 8.3.3 im Anhang) zur Reduktion von Formalinpigment
- 19) Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxylin (Papanicolaou1b; Merck KGaA, Darmstadt) für ca. 15 sek
- 20) 5 min Bläuen in lauwarmem Leitungswasser
- 21) 5 min in Aqua dest. spülen
- 22) In der aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 50 %iger Alkohol, 1 x 80 %iger Alkohol, 1 x 96 %iger Alkohol), zweimal in Isopropanol und dreimal in Xylol-Ersatz (Roti-Histol[®]) jeweils 3 min entwässern
- 23) Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec[®], Vogel Wilhelm GmbH, Gießen)

3.8.9 Immunzytologische Kontrollen

3.8.9.1 Positivkontrollen

3.8.9.1.1 FeLV

Als Positivkontrolle wurde die Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Milz einer wiederholt FeLV-positiv getesteten Katze verwandt, welche im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen seziert wurde und auch in der Routinediagnostik als Positivkontrolle genutzt wird.

3.8.9.1.2 CD45R

Als Positivkontrolle diente der Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Darmlymphknoten einer Katze mit B-Zell-Lymphom, welcher aus der Routineeinsendung zur Tumordiagnostik stammte und auch in der Routinediagnostik als Positivkontrolle verwendet wird.

3.8.9.1.3 CD3

Es wurde ein Darmlymphknoten einer Katze mit T-Zell-Lymphom aus den Routineeinsendungen zur Tumordiagnostik verwandt, welcher auch in der Routinediagnostik als Positivkontrolle genutzt wird.

3.8.9.1.4 CD56 (N-CAM)

Als Positivkontrolle wurde entsprechend den Herstellerangaben (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Kleinhirngewebe einer Katze verwandt.

3.8.9.1.5 Bcl-2, Granzym B und NK1

Als Positivkontrolle diente in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes felines Tonsillengewebe aus den Routineeinsendungen zur Tumordiagnostik, bei der eine folliculäre Hyperplasie diagnostiziert wurde. Zusätzlich wurde für den Nachweis von Granzym B noch humane Tonsille (zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen) als Positivkontrolle verwendet.

3.8.9.1.6 CD4 und CD8

Als Positivkontrollen wurden Gefrierschnitte von Lymphknoten einer Sektionskatze genutzt.

3.8.9.1.7 Proliferationsmarker

Als Positivkontrollen dienten Schnitte von feline Darm-Krypten-Gewebe, welches physiologisch eine hohe Proliferationsrate zeigt,

3.8.9.2 Negativkontrollen

Als Negativkontrolle für den Nachweis von FeLV, CD56, Bcl-2, NK1, CD79 α , BLA.36, PCNA, Granzym B, CD4, und CD8 fungierten Vorgänger- oder Folgeschnitte des gleichen Paraffin- bzw. Gefrierblocks, die mit einem nicht reagierenden Antikörper (T1, Kontrollantikörper gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-T-Lymphozyten) (Hirschberger, 1987) in gleicher Weise inkubiert wurden.

Als Negativkontrolle für die CD45R-Immunzytologie wurde reines Ratten IgG2a (Linaris, Dossenheim), für die CD3-Immunzytologie Kaninchen-Kontrollserum in den entsprechenden Verdünnungen der Primärantikörper verwandt.

3.8.9.3 Beurteilung der Immunzytologie

Als positive Reaktion wurde eine mittel- bis dunkelbraun feingranulär zytoplasmatische, bzw. Membran-assoziierte Färbung gewertet, die bei den entsprechenden Negativkontrollen nicht zu beobachten war. Bei den immunzytologischen Untersuchungen, bei denen positive Reaktionen registriert wurden, wurde der Anteil der positiven Zellen abgeschätzt und prozentual angegeben.

3.8.10 Lebendinkubation mit Antikörpern gegen CD4 und CD8

Abweichende Schritte von dem immunzytologischen Routineprotokoll (siehe unter 3.8.8)

- 1) jeweils 500 μ l Zellen (Konzentration: 5×10^6 Zellen/ml) in zwei Eppendorfgefäße überführen
- 2) Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 400 x g (Mikroliter, Andreas Hettich, Tuttlingen)
- 3) Überstand verwerfen und die Zellen in 250 μ l des verdünnten Primärantikörpers bzw. des Kontrollserums resuspendieren
- 4) Inkubation der Eppendorfgefäße für 90 min auf Eis
- 5) Erstellung eines Zytozentrifugenpräparates: 25 x g, 10 min (Shandon Elliott Cytospin Centrifuge)

- 6) Umsetzten der Objektträger in Coverplates™ (Shandon Racks, Thermo Scientific, Dreieich)

Ab diesem Schritt ist das weitere Vorgehen identisch mit dem unter 3.8.8 beschriebenen Protokoll ab Schritt 7.

3.8.11 Doppelmarkierung CD3 und CD45R

Für die Doppelmarkierung wurden die Zytospinpräparate zunächst 30 sek in Aceton fixiert. Im Anschluss wurden die Objektträger dreimal in einer mit TBS gefüllten Küvette gespült. Sobald die Fluoreszenzfarbstoffe aufgetragen worden sind, wurden die Küvetten nur noch in Dunkelheit bearbeitet.

Tabelle 6: Sekundärantikörper für die Doppelmarkierung

Antikörper	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Verdünnung
Goat Anti-rabbit Cy 2 markiert	Dianova GmbH, Hamburg; (111225003)	1:100 in TBS/1 % BSA
Goat Anti-rat Cy 3 markiert	Dianova GmbH, Hamburg; (112165143)	1:100 in TBS/1 % BSA

- 1) Umsetzten der Objektträger in die Coverplates™ (Shandon Racks, Thermo Scientific, Dreieich)
- 2) 30-minütige Inkubation mit dem 5 %igem Ziegen Serum
- 3) Auftragen des ersten Primärantikörpers (CD 3, siehe Tabelle 3 und Tabelle 4) und Inkubation über Nacht bei 4 °C
- 4) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die Coverplates™ für 5 min
- 5) Auftragen des ersten Sekundärantikörpers Goat Anti-rabbit, Cy 2 markiert (Dianova GmbH, Hamburg) und Inkubation für 1 Stunde bei RT in Dunkelheit
- 6) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die Coverplates™
- 7) Auftragen des zweiten Primärantikörpers (CD 45R, siehe Tabelle 3 und Tabelle 4) und Inkubation über Nacht bei 4 °C

- 8) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die CoverplatesTM für 5 min
- 9) Auftragen des zweiten Sekundärantikörpers Goat Anti-rat, Cy 3 markiert (Dianova GmbH, Hamburg) und Inkubation für 1 Stunde bei RT in Dunkelheit
- 10) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die CoverplatesTM
- 11) Auftragen von 100 µl des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (vgl. 3.9.4) 1:500 verdünnt und Inkubation für 10 min
- 12) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die CoverplatesTM
- 13) Manuelles Eindecken mit 40 µl Einbettmedium (Entellan, Merck KGaA, Darmstadt)

3.8.11.1 Auswertung der Doppelmarkierung

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, (Nikon Eclipse 80i, Nikon GmbH, Düsseldorf) mit einem entsprechenden DAPI-Filter (340-450 nm, Absorptionsmaximum 360 nm; Nikon GmbH, Düsseldorf) und einem Filter zu Detektion von Cy3- bzw. Cy2-markierten Sekundärantikörpern und dem Program NIS-Elements BR 3.2 (Nikon GmbH, Düsseldorf), indem der gleiche Bildausschnitt zweimal hintereinander jeweils mit dem entsprechenden Filter fotografiert wurde und die beiden Bilder übereinander gelegt wurden. Eine Nachbearbeitung hinsichtlich des Kontrasts und der Helligkeit erfolgte mittels des Bildbearbeitungsprogramms „Photoshop“ (Adobe Photoshop CS4, Adobe Systems GmbH, München).

3.8.11.2 Negativkontrollen

Als Negativkontrolle für die CD45R-Immunzytologie wurde reines Ratten-IgG2a (Linaris, Dossenheim), für die CD3-Immunzytologie Kaninchen-Kontrollserum in den entsprechenden Verdünnungen der Primärantikörper verwandt.

3.9 Untersuchungen zur Zentrosomenausstattung

3.9.1 Probenvorbereitung

Zur Untersuchung der Zentrosomenausstattung der Large Granular Lymphocytes wurden zunächst 15 ml Zellsuspension aus den Kulturflaschen entnommen, in konische Zentrifugationsröhrchen überführt und für 7 min bei 4 °C mit 700 x g abzentrifugiert (Rotina 48 C, Andreas Hettich, Tuttlingen). Im Anschluss wurde das dabei gewonnene Zellpellet in sterilem PBS (pH 7,4, siehe 8.3.3 im Anhang), resuspendiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Im Anschluss daran wurde mittels einer Zytocentrifuge (Shandon Elliott Cytospin Centrifuge) ein Zytocentrifugenpräparat erstellt, indem die Zellen 5 min mit 250 x g auf die Objektträger (PolysineTM Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen) aufgebracht wurden.

3.9.2 Seren

Zum Blocken wurde 5 % Ziegen Serum in PBS benutzt.

3.9.3 Antiseren

Zum Nachweis von γ -Tubulin, welches das Hauptprotein der Zentrosomen ist, wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (monoclonal Anti- γ -Tubulin, Clone GTU-88, Sigma-Aldrich, Steinheim) verwandt, welcher 1:500 in TBS/1 %BSA verdünnt wurde.

Als Sekundäntikörper kam ein Cy 3-markierter Antikörper aus dem Schaf (Cy 3-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Mouse IgG (H+L), Dianova GmbH, Hamburg) 1:500 in TBS verdünnt zum Einsatz.

3.9.4 Fluoreszenz-Kernfarbstoff

Um die Zellkerne eindeutig zu identifizieren und somit eine Zuordnung der Zentrosomen zu ermöglichen, wurde DAPI (Stammlösung: 2 mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe) als Kernfarbstoff in einer Verdünnung von 1:500 in TBS verwandt.

Die weiteren Schritte erfolgten weitestgehend entsprechend den Angaben von Miki et al. (2004), wobei bei der Permeabilisierung geringfügig vom vorgegebenen Protokoll abgewichen wurde (siehe 3.9.5 im Anhang).

3.9.5 Vorbehandlung

Die Zytocentrifugenpräparate wurden zunächst für 20 min in 10 % Formalin mit 10 % Methanol bei Raumtemperatur fixiert und anschließend luftgetrocknet. Im Anschluss erfolgte eine 5-minütiges Waschen in PBS (pH 7,4, siehe 8.3.3 im Anhang).

Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte in 0,25 % Triton X-100 in PBS (Serva GmbH, Heidelberg) für 15 min.

3.9.6 Durchführung der Immunfluoreszenz

- 1) Umsetzen der Objektträger in CoverplatesTM (Shandon Racks, Thermo Scientific, Dreieich)
- 2) Auftragen der Blockierungslösung (5 % Ziegen Serum in PBS) und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur
- 3) Auftragen von 100 µl des Primärantikörpers (monoclonal Anti- γ -Tubulin, Clone GTU-88, Sigma-Aldrich, Steinheim) 1:500 verdünnt in TBS/1 % BSA und Inkubation über Nacht bei 4 °C
- 4) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die CoverplatesTM
- 5) Auftragen von 100 µl des Sekundärantikörpers (Cy 3-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Mouse IgG (H+L), Dianova GmbH, Hamburg) 1:100 in TBS und Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur (ab diesem Schritt wurden die Schnitte im Dunklen inkubiert)
- 6) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die CoverplatesTM
- 7) Auftragen von 100 µl des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (siehe 3.9.4 im Anhang) 1:500 verdünnt und Inkubation für 10 min
- 8) Dreimaliges Spülen mit TBS durch Einbringen von je 2 ml Puffer in die CoverplatesTM
- 9) Manuelles Eindecken mit 40 µl Einbettmedium (Entellan, Merck KGaA, Darmstadt)

Im Anschluss können die Objektträger bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

3.9.6.1 Negativkontrolle

Die Negativkontrolle wurde anstatt mit dem Primärantikörper mit TBS/1 % BSA inkubiert.

3.9.7 Nachweis von γ -Tubulin an FFPE-Material

Die Schnitte wurden zunächst jeweils 3 min mit dreimaliger Wiederholung entparaffiniert und rehydriert in Xylol-Ersatz (Roti-Histol[®]), anschließend zweimal je 3 min in Isopropanol und je 3 min in 96 %igem und 80 %igem Alkohol. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. erfolgte die Proteolyse mit 0,01 % Trypsin in PBS (Trypsin from hog pancreas 127 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 10 min bei 37 °C im Wasserbad. Die Schnitte wurden zweimal mit PBS gespült und anschließend in die Coverplates[™] (Shandon Racks, Thermo Scientific, Dreieich) umgesetzt. Ab diesem Zeitpunkt war das Protokoll identisch mit dem für die Zytozentrifugenpräparate. Am Ende wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 50 %iger Alkohol, 1 x 80 %iger Alkohol, 1 x 96 %iger Alkohol), zweimal in Isopropanol und dreimal in Xylol-Ersatz (Roti-Histol[®]) jeweils 3 min entwässert und mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec[®], Vogel Wilhelm GmbH, Gießen) eingedeckt.

3.9.8 Zytologische Auswertung

Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurde wie unter 3.8.11.1 beschrieben durchgeführt.

Als positives Signal wurden nur die roten Signale gewertet, die sich innerhalb einer Zelle, zumeist nah des Zellkern befanden.

3.9.9 Statistische Auswertung

Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl pro Zelle beurteilt. Dabei wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson mit Hilfe eines Statistikprogramms (SPSS Statistics 22, IBM, Ehningen) auf die Frage hin untersucht, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den Zellen aus Passage 10, den Kontrollzellen und den Zellen aus Passage 80 und zwischen den Zellen aus Passage 10 und Passage 80 festzustellen war. Ebenso wurde die Zentrosomenzahl (siehe 3.1.2.1) untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt.

3.10 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden optische Signale einer zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zelle durch Laserstrahlen analysiert. Dabei wird zwischen einem „Forward Scatter“, der das Volumen einer Zelle anhand der Beugung des Lichts im flachen Winkel analysiert und einem „Side Scatter“, mit dem Aussagen über die Granularität einer Zelle anhand der Brechung der Lichts im rechten Winkel gemacht werden können, unterschieden. Durch die Markierung mit einem an einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gebundenen Primärantikörper können Rückschlüsse auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle gezogen werden. Um die zu untersuchende Zellpopulation definieren zu können, wurden die Zellpopulationen durch Bildung von sogenannten Auswertefenstern („Gates“) entsprechend ihrer Eigenschaften zusammengefasst. Diese Einteilung wurde anhand der Ansätze vorgenommen, die nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert wurden (Negativkontrollen).

3.10.1 Primärantikörper

Tabelle 7: Primärantikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper/Klon	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Verdünnung
Maus Anti-Katze CD8 (α - und β -Kette) des CD8, Klon vpg 9	Serotec, Kidlington, UK; (MCA 1347)	1:100
Maus Anti-Katze CD4, Klon vpg 38	Serotec, Kidlington, UK; (MCA 1350)	1:100

3.10.2 Sekundärantikörper

Tabelle 8: Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper/Klon	Bezugsquelle (Bestell-Nr.)	Verdünnung
Goat Anti-Mouse, FITC	Southern Biotech, Birmingham, Alabama USA; (1070-02)	1:50

3.10.3 Versuchsdurchführung der Durchflusszytometrie

Zur Vorbereitung wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 150 μl in jede Vertiefung einer 96-well-Platte mit Rundboden (PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich) pipettiert. Die Zellen wurden mit 440 x g für 3 min bei 20 °C abzentrifugiert (Zentrifuge 4K15C, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode im Harz) und der Überstand vorsichtig aus der umgedrehten Platte ausgeschlagen. Das Zellpellet wurde in 50 μl des 1:100 in der Waschlösung (0,01 % NaN_3 in PBS) verdünnten Primärantikörpers resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Ausschlagen des Überstands aus der Platte wurden die Zellen in 100 μl Waschlösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und nach Ausschlagen des Überstands das Zellpellet in 50 μl des 1:50 in Waschlösung verdünnten Sekundärantikörpers resuspendiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde darauf geachtet, die Zellen vor direktem Lichteinfluss zu schützen. Daher wurden sie für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte erneut ein Waschschrift. Dazu wurde das Zellpellet in 50 μl PBS (pH 7,4, siehe 8.3.3 im Anhang) resuspendiert und in die mit 200 μl PBS (pH 7,4) gefüllten Teströhrchen überführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Gerät FACS-Calibur™ (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) welches mit einem 488 nm-Argon-Ionen-Laser und einem 635 nm-Dioden-Laser ausgestattet ist (Standort: Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen). Die Datenauswertung wurde mithilfe des Computerprogramms FCS-Express (Version 2, De Novo-Software, Thornhill, Ontario, Kanada) durchgeführt.

3.11 Molekularbiologische Untersuchungen

3.11.1 RNS-Isolierung

Die RNS-Isolierung wurde mit Hilfe des Quick-RNA Mini-Prep-Kit (Zymo Research, Freiburg) durchgeführt, aus dem die im Anschluss aufgeführten Komponenten stammen. Dafür wurde zunächst ein DNase-I-Mix- in einem sterilen Eppendorfgefäß angesetzt:

Tabelle 9: DNase-I-Mix

Komponente	Volumen
DNase Reaction Buffer	5 μl
10 x DNase-free Water	3 μl
RNA Wash-Buffer	64 μl

Die Suspensionzellen (Konzentration: 5×10^6 Zellen/ml) wurden zunächst pelletiert (2000 x g bei RT) (Mikroliter, Andreas Hettich, Tuttlingen), der Überstand abgenommen und in 300 μ l RNA-Lysis Buffer resuspendiert und wenige Sekunden gevortext (IKA[®] MS1 Shaker, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (10000 x g, 1 min, RT) und der Überstand wurden auf den Spin-Away-Filter in einem Collection Tube überführt und erneut 1 min bei 10000 x g zentrifugiert, um den Großteil der genomischen DNS zu entfernen. Es erfolgte die Zugabe von 300 μ l Ethanol. Dieses Gemisch wurden anschließend in ein Zymo-Spin IIICG Column überführt und 30 sek bei 10000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 400 μ l RNA Wash-Buffer auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 30 sek (10000 x g) wurden 80 μ l DNase-I-Mix (Tabelle 9) auf die Säule pipettiert und die Probe für 15 min bei RT inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 30 sek (10000 x g) wurden 400 μ l RNA-Prep-Buffer dazu gegeben, die Probe zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. In zwei Schritten wurde zunächst 700 μ l, danach 400 μ l RNA Wash-Buffer auf die Säule gegeben. Dazwischen und erfolgte eine erneute Zentrifugation (30 sek, 10000 x g), im Anschluss wurde die Probe für 2 min zentrifugiert, um den Waschpuffer zu entfernen. Die Säule wurde auf ein steriles Eppendorfgefäß umgesetzt und 30 μ l RNase freies Wasser direkt auf die Säule gegeben und anschließend auf Höchstgeschwindigkeit für 30 sek zentrifugiert. Im Anschluss konnte die Konzentration der isolierten RNS direkt bestimmt und die RNS weiter verwendet oder eingefroren werden.

3.11.2 Messung der isolierten RNS

Der RNS-Gehalt wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) gemessen. Für die Nullwertmessung wurde RNase freies Wasser verwendet. Im Anschluss konnte der RNS-Gehalt bestimmt werden. Als Probenvolumen wurden dabei die vom Hersteller empfohlenen 2 μ l gewählt.

3.11.3 Isolierung von DNS mit AquaGenomic™

Für die DNS-Isolierung wurden die Zellen zunächst auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und 1 ml Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Durch Zentrifugation mit 2000 x g (Mikroliter, Andreas Hettich, Tuttlingen) bei Raumtemperatur wurde ein Zellpellet erstellt. Dann erfolgte die DNS-Isolierung:

1. Extraktion der DNS

Zunächst wurde das Zellpellet in 100 µl AquaGenomic™ (MoBiTec GmbH, Göttingen) resuspendiert und 30 sek gevortext (IKA® MS1 Shaker, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Es folgte eine 4-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und die Lösung wurde erneut für 30 sek gevortext.

2. Pelletieren des Zelldebris

Die Zellsuspension wurde für 2 min bei Raumtemperatur mit 15000 x g zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5415C, Eppendorf GmbH, Hamburg) um den Zelldebris abzuzentrifugieren.

3. Pelletieren der DNS

Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt und 90 µl 100 %iges Isopropanol zugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung 30 sek gevortext; zu diesem Zeitpunkt war die DNS bereits als kleiner weißer Strang sichtbar. Die DNS wurde 2 min bei Raumtemperatur mit 15000 x g zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5415C, Eppendorf GmbH, Hamburg) und damit pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Es erfolgte eine zweimalige Waschung mit 1 ml 70 %igem Ethanol, welches anschließend entfernt wurde und das Pellet bei geöffnetem Deckel einige Minuten getrocknet wurde. Das Pellet wurde in 100 µl 10 mM Tris (s. 8.3.3) gelöst und anschließend 30 sek gevortext.

Über Nacht konnte die DNS rehydrieren. Am nächsten Tag wurde die Lösung für 30 sek bei Raumtemperatur mit 15000 x g zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5415C, Eppendorf GmbH, Hamburg), der Überstand konnte in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt werden.

3.11.4 Messung der isolierten DNS

Der DNS-Gehalt wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) gemessen. Für die Nullwertmessung wurde DNS-freier Rehydrierungspuffer (10 mM Tris (s. 8.3.3)) verwendet. Im Anschluss konnte der DNS-Gehalt bestimmt werden. Als Probenvolumen wurden dabei die vom Hersteller empfohlenen 2 µl gewählt.

3.11.5 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert auf dem Prinzip, dass eine bestimmte Sequenz des DNS-Ausgangsmaterials in mehreren Zyklen mit Hilfe von zwei, die zu suchende Sequenz flankierenden Primern und einer DNS-Polymerase vervielfältigt wird. Dieses Prinzip wurde bereits in den 80er Jahren von Saiki et al. (1985) und Mullis et al. (1986) entwickelt, wobei letzterer sieben Jahre später dafür den Chemie-Nobelpreis erhielt.

3.11.5.1 RT-Reaktion

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion oder auch RT-PCR ermöglicht ein Umschreiben von RNS in cDNS, welche dann als Vorlage-DNS für weitere PCRs zur Verfügung steht. Die erste Beschreibung einer solchen Umschreibung von RNS in cDNS mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase erfolgte bereits Anfang der 70er Jahre durch Spiegelman et al. (1971).

Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben des Kits (Quiagen QuAntiTect Antisense Transcription Kit, Quiagen, Hilden). Dazu wurde der RNS-Gehalt ähnlich wie unter 3.11.2 beschrieben pro μl bestimmt und anschließend entsprechend verdünnt, sodass beim Einsetzen von 6 μl eine Konzentration von 150 ng/ μl entstand. Die Reaktionskomponenten wurden wie folgt in ein PCR-Tube gegeben, nachdem sie aufgetaut, wenige Sekunden gevortext (IKA[®] MS1 Shaker, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und kurz abzentrifugiert (SpectrafugeTM Mini, Laboratory Centrifuge, Labnet International, Edison, New Jersey, USA) wurden.

Tabelle 10: Ansatz 1 für die RT-Reaktion

Reaktionskomponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
gDNS Wipeout Buffer 7x	2 μl	1x
Template RNS	6 μl	
RNase-freies Wasser	6 μl	

Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 min bei 42 °C im Cycler zur Entfernung von genomischer DNS. Die PCR-Versuche wurden alle mit Thermocyclern des Typs Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) durchgeführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben auf Eis gehalten. Es erfolgte der Ansatz des Antisensetranskriptasemix nach entsprechendem Rezept:

Tabelle 11: Ansatz 2 für die RT-Reaktion

Reaktionskomponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
Quantitative Antisense Transkriptase	1 µl	
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl	1x
RT-Primermix	1 µl	
Template RNS	14 µl	

Die PCR-Tubes wurden erneut wenige Sekunden gevortext und abzentrifugiert und dann zunächst für 15 min bei 42 °C und im Anschluss für 3 min bei 95 °C inkubiert. Am Ende erfolgte eine Kühlung auf 4 °C und die cDNS konnte direkt weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.11.6 PCR zum Nachweis eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements

Der Nachweis des T-Zell-Rezeptors-Rearrangements wurde über die Amplifikation der CDR3 abgeschätzt. Die PCR wurde mit von Moore et al. (2005) entwickelten Primern durchgeführt. Dafür wurden aus den als Lyophilisat gelieferten Primern (biomers.net GmbH, Münster) zunächst mit 10 mM Tris (s. 8.3.3) eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/µl hergestellt, welche dann zu einer Gebrauchslösung von 10 pmol/µl verdünnt wurde.

Tabelle 12: Sequenz und Orientierung der Primer zum Nachweis eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements

Primer	Basensequenz (5'-3')	Orientierung
TCRG V	AAGAGCGAYGAGGGMGTTGT	Sense
TCRG J	CTGAGCAGTGTGCCAGSACC	Antisense

Für die Reaktion wurde das Quiagen[®] Multiplex PCR Kit (Quiagen, Hilden) eingesetzt, welches eine effiziente Amplifikation von zwei oder mehr Primern ermöglicht und zusätzlich den Vorteil bietet, dass eine sogenannte „hotstart“ Taq-Polymerase (HotStarTaq[®] DNS Polymerase) verwendet wird, welche zunächst in inaktivier Form vorliegt und erst für 15 min bei 95 °C aktiviert werden muss. Dadurch wird eine Fehlanlagerung der Primer während der Vorbereitungsphase verhindert. Die aus den S87-Zellen isolierte DNS und die der Positivkontrolle (s.u.) wurden in einer Konzentration von 50 ng/µl eingesetzt. Die Proben wurden stets im Doppelansatz angesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes erfolgte folgendermaßen:

Tabelle 13: Zusammensetzung für den Mastermix zum Nachweis eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Steriles Wasser		10,5
„2 x Quiagen Multiplex Master Mix“	2fach konzentriert	12,5
Sense-Primer	10 µM	0,5
Antisense-Primer	10 µM	0,5
Template DNS		1

Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Angaben von Moore et al. (2005) gewählt, wobei die Zeitintervalle geringfügig vom Ursprungsprotokoll abwichen und im Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) eingestellt:

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die PCR zur Überprüfung eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)	Zahl d. Wdh.
Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	15 min	95	
Schmelzen	30 sek	94	5
Anlagern	90 sek	70	
Schmelzen	30 sek	94	5
Anlagern	90 sek	68	
Schmelzen	30 sek	94	34
Anlagern	90 sek	65	
Abschließende Verlängerung	10 min	72	
Kühlen	Bis zur Entnahme	4	

3.11.6.1 Kontrollen

Für die Negativkontrolle wurde die DNS durch die gleiche Menge an sterilem Wasser ersetzt. Als Positivkontrolle wurde ein felines T-Zell-Lymphom im Mediastinum gewählt, welches routinemäßig in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden ist. Im Rahmen einer anderen Dissertation wurde die DNS mittels Hitzebehandlung, Chelex 100 und Chloroform isoliert und bei -20 °C gelagert (Fischer, 2013).

3.11.7 PCR zum Nachweis eines Rearrangements der B-Zell-Rezeptorgene

Der Nachweis eines B-Zell-Rezeptor-Rearrangements erfolgte mittels Amplifikation des CDR3 der schweren Kette. Dabei wurde eine Multiplex-PCR mit fünf, von Henrich et al. (2009) entwickelten Primern gewählt. Dafür wurden aus den als Lyophilisat gelieferten Primern (biomers.net GmbH, Münster) zunächst mit 10 mM Tris (s. 8.3.3) eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μl hergestellt, welche dann zu einer Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/μl mit sterilem Wasser verdünnt wurde.

Tabelle 15: Sequenz und Orientierung der Diagnostik-Primer

Primer	Basensequenz (5'-3')	Orientierung
V1FRIII	GAAGTTCCAGGGCAGACTCAC	Sense
V3FRIII	CCGTGAAGGGCCGATTAC	Sense
Jfam1	CACCGTCACCAGGGCTCCTTG	Antisense
Jfam2k	CACGGTGACCAGGGTC	Antisense
Jfam3k	ACGGTGACCAGGGTA	Antisense

Die Anwendung der Multiplex-PCR ermöglicht das Ansetzen aller fünf Primer in einem PCR-Reaktionsgefäß. Die Zusammensetzung der Komponenten erfolgte, nachdem sie aufgetaut, wenige Sekunden gevortext (IKA[®] MS1 Shaker, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und kurz abzentrifugiert (SpectrafugeTM Mini, Laboratory Centrifuge, Labnet International, Edison, New Jersey, USA) wurden, folgendermaßen:

Tabelle 16: Zusammensetzung der Komponenten für die Amplifikation der CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (μl)
Steriles Wasser		9
„2 x Quiagen Multiplex Master Mix“	2 fach konzentriert	12,5
V1FRIII		0,5
V3FRIII		0,5
Jfam1		0,5
Jfam2k		0,5
Jfam3k		0,5
Template DNS		1

Die Reaktionsbedingungen entsprachen folgenden, von Henrich et al. (2009) festgelegten Bedingungen im Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf):

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)	Zahl d. Wdh.
Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	15 min	95	-
Schmelzen	15 sek	92	35
Anlagern	90 sek	68,5	
Verlängern	10 sek	72	
Abschließende Verlängerung	5 min	72	-
Kühlen	Bis Entnahme	4	-

3.11.7.1 Kontrollen

Für die Negativkontrolle wurde die DNS durch die gleiche Menge an sterilem Wasser ersetzt. Als Positivkontrolle wurde ein Plasmid (LV1.1.34) gewählt (Henrich, 2008).

3.11.8 PCR zum Nachweis des FeLV-Provirus

Da die endogen vorliegenden FeLV-verwandten Abschnitte im Katzen genom Ähnlichkeit zu den Strukturproteinen von FeLV haben, erfolgt der Nachweis aus dem U3-LTR Bereich des proviralen Genoms. In diesem Bereich findet keine Amplifikation von endogenen Sequenzen statt, und es finden sich in diesem Bereich deutliche Sequenzunterschiede zu den exogenen Proviren (Berry et al., 1988; Casey et al., 1981; Kumar et al., 1989; Okabe et al., 1978).

3.11.8.1 Semi-nested PCR

Bei diesem Vorgang werden zwei getrennt voneinander laufende Reaktionen hintereinander geschaltet. Dabei wird das PCR-Produkt der ersten Reaktion erneut mit einem neuen Sense-Primer, der innerhalb des durch die ersten beiden Primer begrenzten Abschnitts liegt, mit dem Antisense-Primer aus der ersten Reaktion kombiniert. Durch diese Methode können auch sehr kleine DNS-Mengen amplifiziert und gleichzeitig ungewollte Amplifikate aus der ersten Reaktion vermieden werden.

Als Primer für die erste Reaktion wurden folgende von Jackson et al. (1993) (Sense-Primer der ersten Reaktion) und Schwartz (2001) (Sense-Primer der zweiten Reaktion und Antisense-Primer) gewählt, welche in dieser Konstellation von Suntz et al. (2007; 2010) erstmals beschrieben wurden. Dafür wurden aus den als Lyophilisat gelieferten Primern (biomers.net

GmbH, Münster) zunächst mit 10 mM Tris (s. 8.3.3) eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/µl hergestellt, welche dann zu einer Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/µl mit sterilem Wasser verdünnt wurde.

Tabelle 18: Sequenz und Orientierung der FeLV-Primer

Primer	Basensequenz (5'-3')	Orientierung
Sense-Primer 1. Reaktion	TTACTCAAGTATGTTCCCATG	Sense
Sense-Primer 2. Reaktion	CTTGAGGCCAAGAACAGTTA	Sense
Antisense-Primer	AGGTCGAACTCTGGTCAACT	Antisense

3.11.8.1.1 Durchführung

Bei der ersten Reaktion erfolgte die Kombination des ersten Sense-Primers mit dem Antisense-Primer. In der zweiten Reaktion wurde ein neuer Sense-Primer mit dem Antisense-Primer der ersten Reaktion kombiniert und als Template-DNS das Amplifikat der ersten Reaktion genutzt. Die Komponenten wurden wenige Sekunden gevortext (IKA[®] MS1 Shaker, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und abzentrifugiert und danach folgendermaßen für beide Reaktionen in ein PCR-Tube gefüllt:

Tabelle 19: Zusammensetzung der Mastermix-Komponenten der ersten und zweiten Reaktion

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Steriles Wasser		17,9
10x Reaktionspuffer	1 fach konzentriert	2,5
dNTP-Mix Gebrauchslösung (je dNTP 10 mM)	dATP:dTTP:dGTP:dCTP (1:1:1:1), je 0,2 mM	0,5
Sense-Primer		1
Antisense-Primer		1
TAQ-DNS Polymerase	0,75 U	0,1
Template		2

Die Reaktionsbedingungen für die erste Reaktion entsprachen den Angaben von Suntz (2007; 2010):

Tabelle 20: Reaktionsbedingungen der ersten Reaktion im Rahmen der semi-nested PCR zum Nachweis von FeLV-Provirus

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)	Zahl d. Wdh.
Denaturierung	120 sek	94	-
Schmelzen	60 sek	92	34
Anlagern	30 sek	55	
Verlängern	30 sek	72	
Abschließende Verlängerung	60 sek	72	-
Kühlen	Bis Entnahme	4	-

Auch die Reaktionsbedingungen für die zweite Reaktion entsprachen den Angaben von Suntz (2007; 2010):

Tabelle 21: Reaktionsbedingungen der zweiten Reaktion im Rahmen der semi-nested PCR zum Nachweis von FeLV-Provirus

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)	Zahl d. Wdh.
Denaturierung	120 sek	94	-
Schmelzen	60 sek	92	29
Anlagern	30 sek	52,7	
Verlängern	30 sek	72	
Abschließende Verlängerung	120 sek	72	-
Kühlen	Bis Entnahme	4	-

3.11.8.2 Kontrolle

Für die Negativkontrolle wurde die Template-DNS durch die gleiche Menge sterilen Wassers ersetzt. Als Positivkontrolle wurde die aus dem Knochenmark isolierte DNS einer FeLV-positiven Sektionskatze eingesetzt.

3.11.9 PCR zum Nachweis einer p53-Mutation

Da p53-Mutationen häufig mit chromosomaler Instabilität vergesellschaftet sind (siehe Literaturübersicht), wurde eine PCR und anschließend eine Sequenzierung zur Detektion von Mutationen im p53-Gen durchgeführt.

Für die PCR wurden mehrere Primersysteme verwandt, um eine relativ große Spanne der p53-Sequenz abdecken zu können. Als Template-DNS wurde eine zuvor mittels RT-Reaktion

amplifizierte cDNS genutzt. Dafür wurden aus den als Lyophilisat gelieferten Primern (biomers.net GmbH, Münster) zunächst mit 10 mM Tris (s. 8.3.3) eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/µl hergestellt, welche dann zu einer Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/µl mit sterilem Wasser verdünnt wurde.

Die ersten vier Primer (cSP53-1, cAP53-1, cSP53-2 und cAP53-2) stammten aus einer Arbeit von Miki et al. (2004), die anderen wurden für die vorliegende Arbeit neu entwickelt. Diese wurden mit Hilfe des online verfügbaren Programms „Primer-BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) auf Grundlage der felinen p53-Sequenz (GenBankID: D26608.1) erstellt.

Tabelle 22: Basensequenzen und Orientierung der Primer zur Analyse der p53-Sequenz

Primer	Basensequenz (5'-3')	Orientierung
cSP53-1	CCAGGACGGTGACACGCTC	Sense
cAP53-1	ACGACGCTATGTCGGAAAG	Antisense
cSP53-2	ATCTCATCCGAGTGGAAG	Sense
cAP53-2	AAATGCCAGGGAAGGAGG	Antisense
cSP53-3	CCAGCCACCTGAAGGCTAAG	Sense
cAP53-3	TCCCACCTCCCCCTACTAAC	Antisense
cSP53-4	GGATGCCAGAGTGGAAAGG	Sense

Die Reaktionskomponenten wurden wie folgt in ein PCR-Tube gegeben, nachdem sie aufgetaut, einige Sekunden gevortext (IKA[®] MS1 Shaker, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und abzentrifugiert (SpectrafugeTM Mini, Laboratory Centrifuge, Labnet International, Edison, New Jersey, USA) wurden.

Tabelle 23: Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die PCR zum Nachweis von p53-Mutationen

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Steriles Wasser		9,5
„2 x Quiagen Multiplex Master Mix“	2fach konzentriert	12,5
Sense-Primer		0,5
Antisense-Primer		0,5
Template-DNS		2

Als Reaktionsbedingungen für den Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) wurden gewählt:

Tabelle 24: Reaktionsbedingungen für die PCR zum Nachweis von p53-Mutationen

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)	Zahl d. Wdh.
Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	15 min	95	-
Schmelzen	30 sek	94	35
Anlagern	90 sek	56	
Verlängern	90 sek	72	
Abschließende Verlängerung	10 sek	72	-
Kühlen	Bis Entnahme	4	-

3.11.10 Agarosegelelektrophorese

Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte nach Auftrennung im 2 %igen Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer (siehe 8.3.3 im Anhang). Dafür wurden 2,2 g Agarose (Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) in 110 g 0,5 x TBE-Puffer zunächst in der Mikrowelle und anschließend auf der Herdplatte gekocht, um die Agarose vollständig aufzulösen. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurden 3,6 µl Midori Green (Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) dazugegeben und das Gel in einer Gießkammer mit Plastikrechen zum Erzeugen der Geltaschen gegossen und ausgehärtet. Danach wurde es in eine Elektrophoresekammer (Gelkammer Easyphor, Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) verbracht und anschließend mit 0,5 x TBE-Puffer überschichtet. Pro PCR-Ansatz wurden 5 µl Probe mit 1 µl Loading dye (6 x DNS Loading Dye, Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) gemischt und vorsichtig in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard wurde mit dem Enzym MSP I geschnittene pUC19-Plasmid-DNS (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) jeweils in die an die Proben angrenzenden Taschen eingebracht. Mittels des elektrischen Spannungsgebers (MWG-Biotech, Ebersberg) wurde eine elektrische Spannung von 90 Volt (Strecke 20 cm) für 90 min angelegt.

3.11.11 Visualisierung und Dokumentation

Die Banden wurden mit Hilfe der UV-Transillumination (Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich) bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem Kodak 1.0 „Digital Imaging“ (Eastman Kodak, Inc., Rochester, New York, USA) abfotografiert.

3.11.12 DNS-Aufreinigung

3.11.12.1 Aufreinigung mit Amicon Ultrafugal Filter

Die Aufreinigung der amplifizierten DNS wurde mit Amicon Ultra Centrifugal Filter (0,5 ml) (Merck KGaA, Darmstadt) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde die amplifizierte DNS zunächst mit 450 µl sterilem Wasser verdünnt und in den Filter, der vorher in das Filtrationscup eingesetzt worden ist, pipettiert. Die Säule wurde für 10 min mit 14000 x g zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge 5415C, Eppendorf GmbH, Hamburg). Der Durchfluss wurde anschließend verworfen, die Säule umgedreht und in ein neues Filtrationscup gestellt. Die Säule wurde erneut bei 1000 x g für 2 min zentrifugiert und anschließend verworfen und die sich im Filtrationscup befindende aufgereinigte DNS in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß pipettiert.

3.11.12.2 Aufreinigung mit ExoSap

Bei dieser Methode werden zwei hydrolytische Enzyme simultan zur Aufreinigung der DNS eingesetzt. Die Exonuclease I degradiert einzelstängige DNS in 3'→5' Richtung und entfernt somit die Primer aus der PCR-Reaktion. FastAP (thermosensitive alkalische Phosphatase) degradiert die nicht inkorporierten Nukleotide. Die Reagenzien wurden, nachdem sie aufgetaut, wenige Sekunden gevortext und kurz anzentrifugiert worden waren, entsprechend den Herstellerangaben von Thermo Scientific (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) folgendermaßen in ein PCR-Tube gegeben:

Tabelle 25: Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die DNS-Aufreinigung mit ExoSap

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Exo-Nuclease		97,2
FastAP		14,4
Template		6

Folgendes Programm wurde im Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) ausgeführt:

Tabelle 26: Reaktionsbedingungen für die DNS-Aufreinigung mit Exosap

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)
Dephosphorylierung	10 min	37
Inaktivierung	5 min	75

3.11.13 Aufarbeitung zur Sequenzierung

Die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente wurde mit den verwendeten PCR-Primern in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung von der Firma GATC Biotech AG (Köln) durchgeführt.

3.11.14 Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

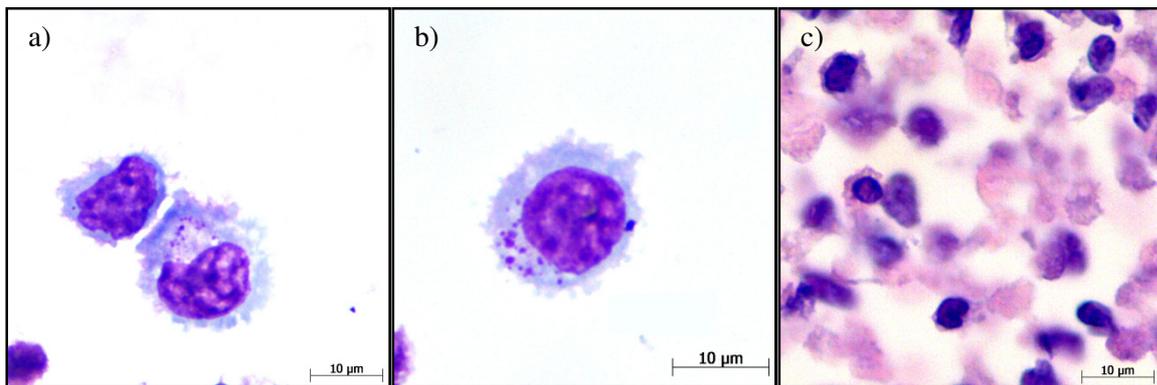
Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe des Computerprogramms BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische Charakteristika

In den Giemsa-gefärbten Zytospinpräparaten (Abbildung 4) stellten sich die Zellen als große, runde bis rund-ovoide, blastoide Zellen mit einer Größe von 10-20 μm dar. Sie wiesen einen großen, zum Teil gelappten Nukleus mit feiner Chromatinstruktur und einen deutlichen Nukleolus, teilweise auch mehrere oder sogar Makronukleoli auf. Zudem zeigten sie eine deutliche Anisozytose und Anisokaryose und ein hohes Kern-Zytoplasmaverhältnis. Eine hohe Mitoserate mit atypischen Mitosefiguren sowie zwei- oder dreikernige Zellen konnten dokumentiert werden. Ein Teil der Zellen enthielt in einem schwach basophilen Zytoplasma unterschiedlich große, azurophile Granula und zudem einige helle, scharf umschriebene Vakuolen. Im Zytospinpräparat lagen die Zellen häufig dicht in kleinen Gruppen von bis zu 15 Zellen zusammen. In Hämatoxilin-Eosin-gefärbten Schnitten eines in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Pellets stellten sich die Zellen aufgrund der Schrumpfungartefakte deutlich kleiner dar (bis 10 μm groß). Sie waren rund bis teilweise polygonal mit einem deutlichen, basophilen Zellkern und einem eosinophilen Zytoplasma. Eine Granulierung ließ sich im Hämatoxilin-Eosin-gefärbten FFPE-Präparat (Abbildung 4) nicht nachvollziehen. In der Toluidinblaufärbung zeigten die Zellen keine metachromatischen Farbeffekte.

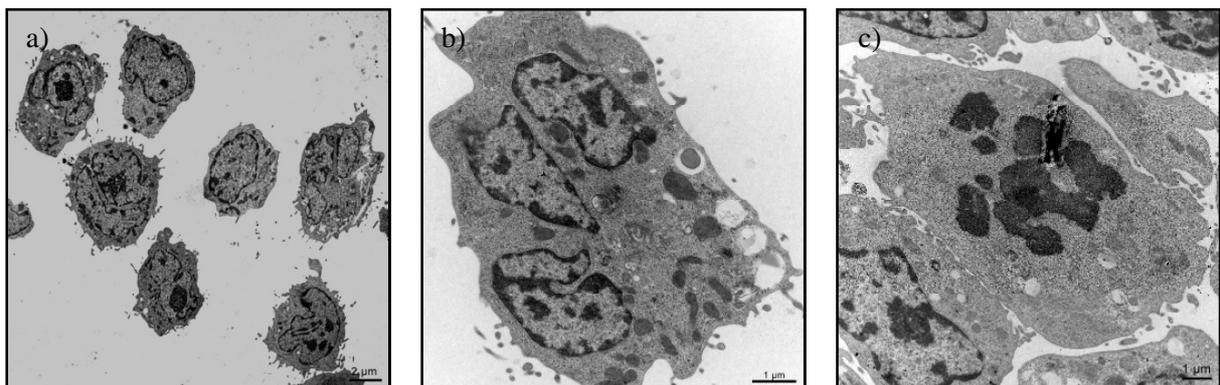
Abbildung 4a), b): S87-Zellen im Giemsa-gefärbten Zytospinpräparat; **c)** HE-gefärbten Schnitten aus FFPE-Material



4.1.1 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen erstellt. Die Bilder, die mit dem Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen wurden, spiegeln in weiten Teilen die Befunde der zytologischen Präparate wider. So konnte auch hier ein sehr enger Zell-zu-Zellkontakt festgestellt werden. Die Zellen lagen dicht aneinander, ohne dass jedoch eine direkte Verbindung zwischen den Zellen erkennbar war (Abbildung 5c). Form und Größe der Einzelzellen divergierten stark zwischen rund und oval, zum Teil konnten auch abgerundete oder längliche Zytoplasmaausläufer registriert werden, wie sie typisch für Lymphozyten sind. Einige Zellen wiesen in der Zellperipherie große, optische leere Vakuolen auf, die einen Durchmesser von bis zu 0,8 μm zeigten. In einigen Fällen ließ sich elektronenmikroskopisch ein sehr dichtes, homogenes Material in Hohlräumen erkennen, welches die intrazytoplasmatischen Granula darstellt, der die Zellen ihren Namen verdanken. Die Kerne waren bis zu 9 μm groß und lagen zumeist zentral, zum Teil auch exzentrisch. Das Zytoplasma enthielt eine mittlere Menge an Zellorganellen wie beispielsweise Mitochondrien, den Golgi-Apparat und das raue und glatte endoplasmatische Retikulum. Als sehr dichte, ungefähr 2-3 μm große Strukturen ließen sich die Chromosomen in der Metaphase identifizieren (Abbildung 5c). Viruspartikel konnten nicht detektiert werden.

Abbildung 5 a-c: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von S87 mit a) 3000facher b) 20000facher c) und 12000facher Vergrößerung bei 80 kv

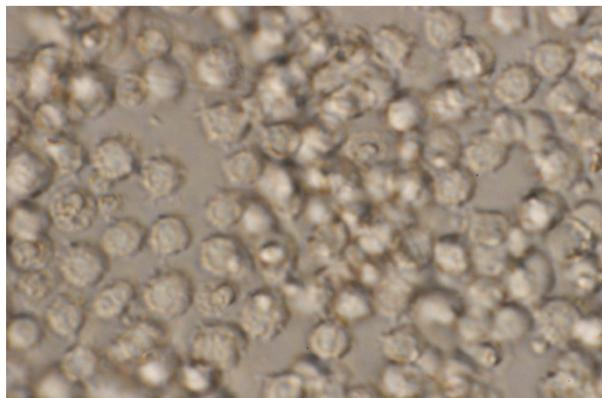


Mehrkernige Zellen, zum Teil Zellen mit fingerförmigen Zytoplasmaausläufern und Mitosefiguren

4.2 Eigenschaften der Zellen in Kultur

Die Zellen stellten sich in Kultur als nicht-adhärenente Suspensionszellen dar, die bei gutem Wachstum Zellhaufen (Cluster) von bis zu 60 Zellen bildeten. Der prozentuale Anteil der toten, mittels Trypanblauausschlussfärbung detektierten Zellen in der regelmäßig mit frischem Medium versorgten und einmal die Woche passagierten Kultur betrug ungefähr 15 %. Die Zellen wurden knapp zwei Jahre konstant in Kultur gehalten und befanden sich zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit in der 90. Passage. Mehrfach wurden eingefrorene Zellen verschiedener Passagen aufgetaut und erneut bis zu anderthalb Jahre in Kultur gehalten. Hierbei zeigte sich, dass es sich für das Zellwachstum am günstigsten gestaltet, wenn die Zellen zunächst mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in eine 24-well-Platte (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) ausgesät wurden und ihnen dadurch ein enger Zellkontakt ermöglicht wurde. Durch die Zugabe von Medium mit einem fetalem Kälberserum-Anteil von 20 % konnte das Wachstum zusätzlich angeregt werden. Erst wenn die Zellen die Dichte erreicht hatten, bei der sie optisch fast die gesamte Bodenfläche einer Vertiefung ausfüllten, wurden sie in eine 25 cm² Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) umgesetzt, in der sie dann nach dem üblichen Protokoll weiter passagiert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt werden mussten.

Abbildung 6: S87 in Kultur, 40fache Vergrößerung



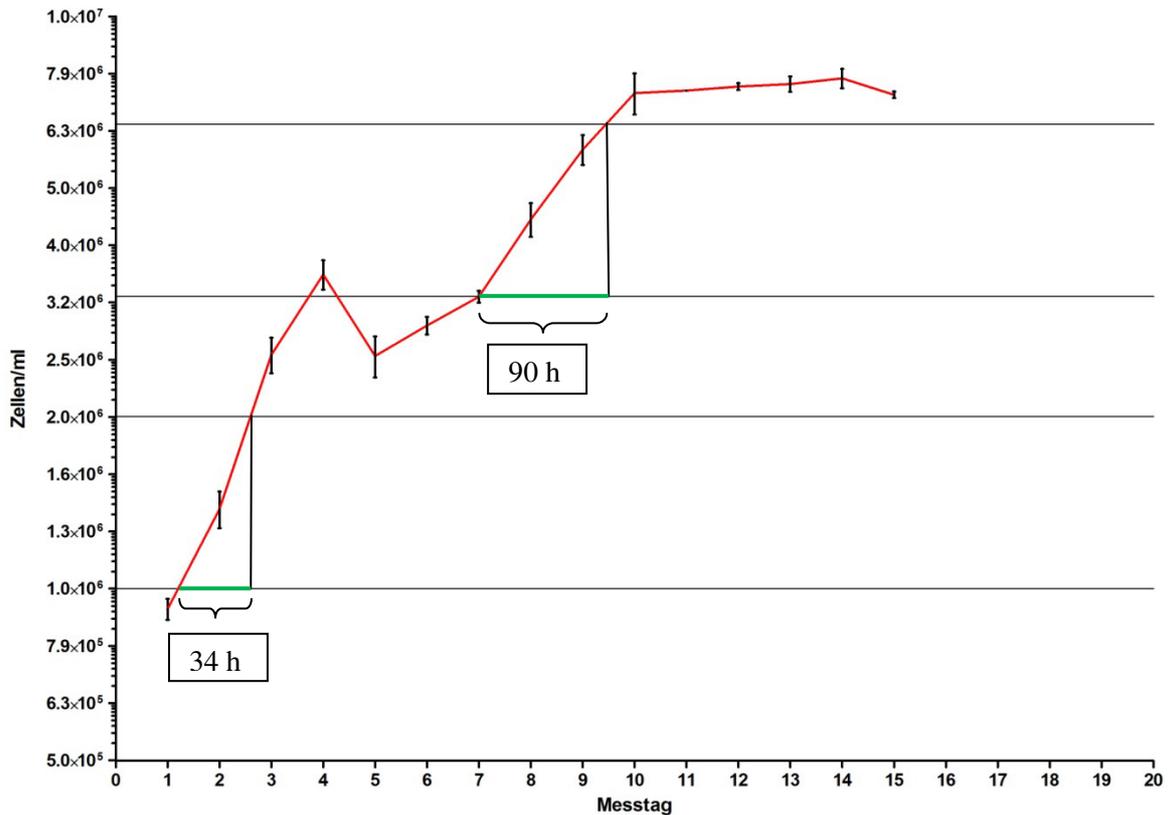
4.3 Wachstumscharakteristika

4.3.1 Wachstumskurve und Populationsverdopplungszeit

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurde die Zellsuspension zunächst verdünnt und die Anfangszellzahl bestimmt. Alle 24 Stunden wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer erneut gezählt und die Zahl notiert. In der halblogarithmischen Darstellung ergab sich aus diesen Werten die in Abbildung 7 dargestellte Kurve, die zunächst bis Tag vier

steil ansteigt und hier einen ersten Peak formt. Danach fallen die Werte wieder ab, sodass der am fünften Tag gemessene Wert nur knapp über dem des dritten lag. Auch die Werte des sechsten und siebten Messtages lagen noch unterhalb des am vierten Tag gemessenen Wertes, ab dem achten Messtag stieg die Kurve wieder steiler an, bis schlussendlich ab dem zehnten Tag eine Plateauphase erreicht wurde, ab der das Zellwachstum annähernd konstant blieb. Die aus der Wachstumskurve bestimmte Populationsverdopplungszeit betrug 34 Stunden. Die Populationsverdopplungszeit, die mit Hilfe der zweiten Steigung ermittelt wurde, betrug 90 Stunden.

Abbildung 7: Wachstumskurve von S87. Die Datenreihen wurden in Passage 40 und in Passage 67 bestimmt und mit Streuung angegeben. Die Populationsverdopplungszeit wurde sowohl in der ersten Phase des starken Wachstums als auch in der zweiten Phase berechnet.



4.4 Festlegung der Klonierungsgrenze

Die Untersuchungen zur Festlegung einer Klonierungsgrenze wurden mit verschiedenen Methoden durchgeführt, bei denen zu Beginn eine definierte Zellzahl eingesetzt und bestimmt wurde. Bei der täglichen optischen Kontrolle mit Hilfe des inversen Mikroskops musste darauf geachtet werden, ob durch Zellteilung eine Vermehrung der Zellen stattgefunden hatte. Der Nachteil dieser Methode bestand vor allem darin, dass die Zellen innerhalb der Vertiefung frei beweglich waren, sodass jede Vertiefung sehr genau untersucht werden musste, damit keine Zelle übersehen wurde. Zudem musste darauf geachtet werden, dass die Platte sehr ruhig gehalten wurde und das Medium nach Möglichkeit nicht in Bewegung geriet, da die Zellen sonst aufschwammen und nicht mehr in der Plattenboden-Ebene zu finden waren. Als weiterer Nachteil entpuppte sich die fehlende Möglichkeit, zwischen lebenden und toten Zellen zu differenzieren. Zwar gingen in die anfangs bestimmte Zellzahl für die Berechnung der Verdünnungen nur die lebenden Zellen ein, jedoch konnte nach Einsäen der Zellen nicht mehr nachgeprüft werden, wie groß der Anteil der lebenden Zellen in einer Vertiefung wirklich war.

4.4.1 Limited-Dilution-Klonierung

Bei den Versuchen eine Einzelzelle zu klonieren, konnte keine Zellvermehrung registriert werden. Obwohl rein rechnerisch durch die Verdünnung in jeder Vertiefung eine Zelle liegen sollte, waren die meisten Vertiefungen leer. In manchen Vertiefungen konnten zudem Zellen detektiert werden, die am Folgetag nicht mehr wiedergefunden werden konnten. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die Zellen durch zu viel Bewegung aufgewirbelt worden waren und nicht mehr in der Ebene der anderen Zellen lagen. Der Versuch wurde, wenn sich keine Zellvermehrung zeigte, nach vier Tagen zunächst abgebrochen, da bei einer Populationsverdopplungszeit von 34 Stunden in dieser Zeit eine Zellteilung hätte stattfinden müssen. Die Platten wurden weitere sechs Tage aufbewahrt und inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit wurde abschließend ein letztes Mal kontrolliert, ob eine Zellvermehrung stattgefunden hatte. Auch in den Ansätzen, in denen die Zellen mit Interleukin 2 oder konditioniertem Medium und 20 % FCS enthaltendem RPMI-Medium zusätzlich stimuliert wurden, konnte keine Zellteilung der Einzelzellen registriert werden. In einigen der Versuchsansätze mit Zellzahlen zwischen fünf und zehn konnte eine Steigerung der Zellzahlen um ein bis zwei Zellen registriert werden. Allerdings konnte im weiteren Versuchsverlauf keine weitere Zellvermehrung beobachtet werden.

Eine wiederholbare und über den gesamten Beobachtungszeitraum verfolgbare Vermehrung der Zellzahl konnte erst in Ansätzen mit mehr als 20 Zellen gesehen werden. Hierbei wurden nur Vertiefungen gewertet, deren Zellzahl am Ende des Beobachtungszeitraums deutlich erhöht vorlag. Das Wachstum der Zellen verlief dennoch deutlich langsamer, als es bei einer Populationsverdopplungszeit von 34 Stunden zu erwarten wäre.

4.4.2 Klonierung im Weichagar

Die Vorteile der geleeartigen Konsistenz des Weichagars wurde für verschiedene Versuchsansätze genutzt. Im ersten Versuch wurden für die zu klonierenden Zellen der S87-Zelllinie entweder feline Fibroblasten oder S87-Zellen selbst als „feeder cells“ in die Grundagarschicht eingegossen. Nachdem diese Schicht ausgehärtet war, konnte die verdünnte Zellsuspension in einer zweiten Weichagarschicht hinzugefügt werden. Bei ausreichender Zelldichte in der oberen Schicht (> 20 Zellen/well) konnten bereits nach einem Tag einzelne Zellklone beobachtet werden. Da sich jedoch der Weichagar bereits nach wenigen Stunden verflüssigte, war ein Picken und Übertragen der Zellen in eine neue Platte unmöglich. Entweder wurden die Zellen abgeschwemmt, blieben in der Pipette hängen oder die Klone durchmischten sich. Bei geringerer Zelldichte (< 20 Zellen) in der oberen Schicht konnte keine Proliferation registriert werden.

4.4.3 Klonierung mit Transwell®-Einsätzen

Einen ähnlichen Effekt wie durch die zwei Schichten beim zuvor beschriebenen Versuch mit Weichagar sollte durch das Zwei-Kompartimentensystem bei einer 96er-Platte mit Transwell®-Einsätzen (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, USA) erreicht werden. Auch hier bot sich durch das Zwei-Kompartimentensystem die Möglichkeit, „feeder cells“ zur Unterstützung der Proliferation einzusäen. Allerdings zeigte sich hierbei ein ähnlich zu beobachtendes Phänomen wie bei der Limited-Dilution-Klonierung in einer normalen Platte oder der Klonierung im Weichagar. Das Wachstum der S87-Zellen war nicht positiv durch die „feeder cells“ zu beeinflussen, sondern davon abhängig, wie dicht die Zellen im oberen Kompartiment ausgesät worden waren.

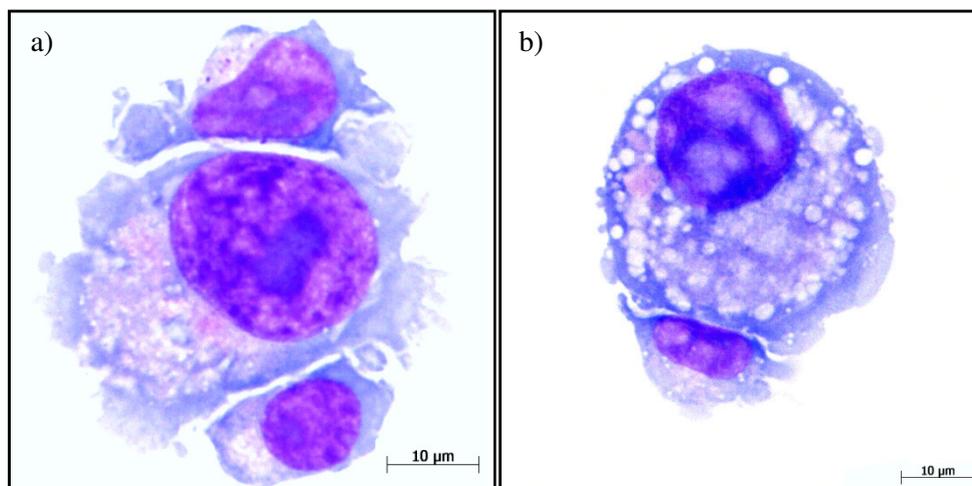
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zellen unabhängig von äußeren Bedingungen und verschiedenen Stimulantien kein Zellwachstum bei einer Ursprungszellzahl von unter 20 Zellen pro Vertiefung zeigten. Ab dieser Zellzahl kann es zu einer Proliferation kommen, die jedoch deutlich langsamer verläuft als bei höheren Zellzahlen.

4.5 Zytotoxische Aktivität

4.5.1 Rosettenformation

Im zytologischen Präparat konnte nach einer 14-stündigen Co-Inkubation von CTAC-Zellen und S87 in einem Verhältnis von 1:5 eine Anlagerung von jeweils einer oder mehreren S87-Zellen an die deutlich größere, einzelne CTAC-Zelle registriert werden (Abbildung 8). Um die Zellen besser voneinander differenzieren zu können, wurden Zytozentrifugenpräparate, die nur eine Zellart enthielten, zum Vergleich herangezogen.

Abbildung 8 a), b): Anlagerung der S87-Zellen an die CTAC-Zellen



4.6 Spontane zytotoxische Aktivität

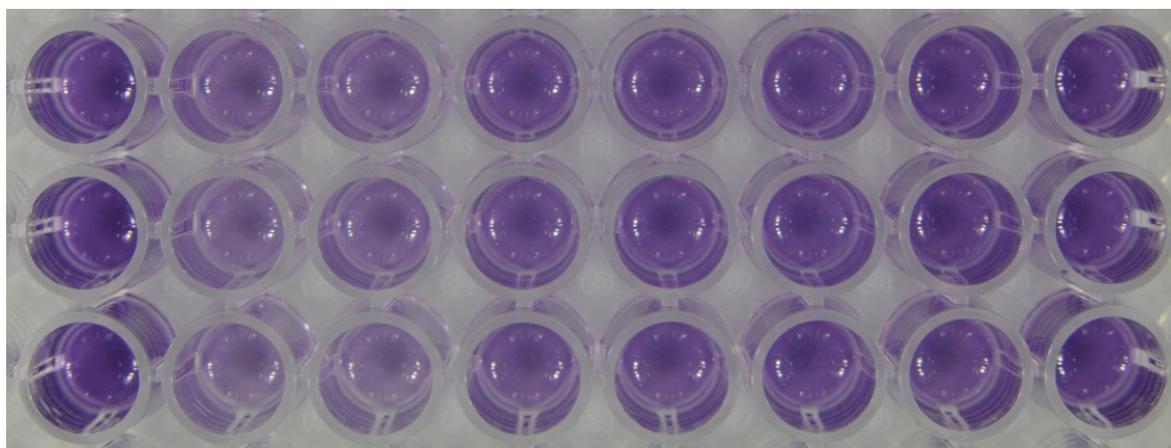
Für die Überprüfung der spontanen Zytotoxizität wurden zwei unterschiedliche Zielzelllinien (CTAC-Zellen und Vero-Zellen) und die Effektorzellen (S87) in verschiedenen Konzentrationen ausgesät. Als Kontrolle wurde der mittlere Wert der optischen Dichte der jeweils im gleichen Ansatz angesetzten und in gleicher Weise inkubierten Vertiefungen, denen lediglich die Zielzellen, nicht aber Effektorzellen hinzugegeben wurden, berechnet. Die optische Dichte wurde stets direkt im Anschluss an die Inkubation bestimmt. Da die optischen Dichten der Überstände zum Teil zwischen den Versuchsansätzen divergierten, wurden jeweils nur die im gleichen Versuchsansatz gemessenen Kontrollwerte mit der optischen Dichte der Versuchsansätze gegengerechnet. Bei Mehrfachansätzen wurde der Mittelwert bestimmt.

4.6.1 CTAC-Zellen

4.6.1.1 MTT-Test

Durch die Umsetzung des Farbstoffs durch die nicht-lysierten Zielzellen kann anhand der Intensität des umgesetzten Farbstoffs auf die zytotoxische Aktivität geschlossen werden. So waren die Vertiefungen, in denen am wenigsten Zellen lysiert wurden und somit die zytotoxische Aktivität am geringsten war, im MTT-Test am intensivsten violett gefärbt. Dies waren dementsprechend bei allen Versuchsansätzen die Überstände der Vertiefungen mit den Kontrollen. Im Ansatz mit verschiedenen Verdünnungen der Effektorzellen ließ sich eine kontinuierlich abnehmende Färbintensität erkennen, je mehr Effektorzellen hinzugegeben wurden (Abbildung 9). Die schwächste Färbung der Überstände ließ sich dementsprechend bei der Vertiefung dokumentieren, in der die Zielzellen und die Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:100 eingesät wurden. In dieser Vertiefung stellte sich die Farbe lediglich als ein sehr schwaches violett dar (Abbildung 9, Spalte 2).

Abbildung 9: Darstellung des Farbverlaufes des MTT-Tests mit verschiedenen Verdünnungsstufen (Z=Zielzellen, E=Effektorzellen)



Kontinuierliche Abnahme der Farbintensität der Überstände bei zunehmender S87-Zellkonzentration

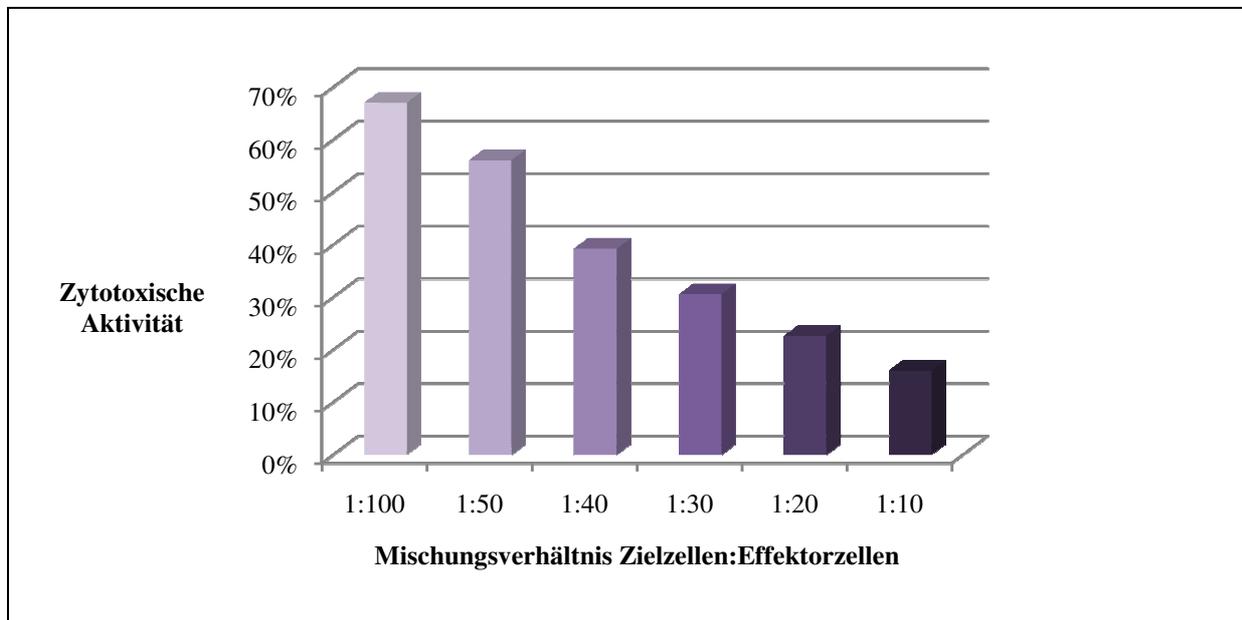
Spalte 1: Kontrolle, Spalte 2: Z/E: 1:100, Spalte 3: Z/E: 1:50, Spalte 4: Z/E: 1:40,

Spalte 5: Z/E: 1:30, Spalte 6: Z/E: 1:20, Spalte 7: Z/E: 1:10, Spalte 8: Kontrolle

Die spontane zytotoxische Aktivität ($100 - [\text{OD Testansatz} / \text{OD Kontrolle}] \times 100$) der S87-Zellen gegenüber den CTAC Zellen lag im MTT-Test bei einem Verhältnis der Zielzellen zu den Effektorzellen von 1:100 im Mittel bei 67 %. Bei einem Verhältnis von 1:50 verringerte sich die Aktivität um fast 10 Prozentpunkte auf 56 %. Je niedriger die Konzentration der

Effektorzellen gewählt worden war, desto niedriger war die zytotoxische Aktivität. Bei einem Verhältnis von 1:40 betrug sie im Durchschnitt bei 39 %, bei 1:30 lag sie bei 31 %, bei 1:20 bei 23 % und bei 1:10 bei 16 % (Abbildung 10).

Abbildung 10: Verlauf der zytotoxischen Aktivität



4.6.1.2 Rose-Bengal-Assay (RBA)

Bei einem Versuchsansatz mit einem Zielzell-/Effektorverhältnis von 1:50 ließ sich eine spontane zytotoxische Aktivität von 63 % verzeichnen. Auch hier ließ die Intensität der Färbung bereits vor der Bestimmung der optischen Dichte Rückschlüsse auf das Ergebnis zu, da sich die Vertiefungen mit den Kontrollansätzen deutlich intensiver rot gefärbt darstellten.

4.6.2 Vero-Zellen

Für die Bestimmung der spontanen zytotoxischen Aktivität mittels MTT-Test gegenüber Vero-Zellen wurden die Zielzellen und die Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:100 eingesetzt. Die Farbintensität der Vertiefungen mit Zugabe von Effektorzellen war im Gegensatz zu der Färbung der Kontrollvertiefungen, die ein intensives Violett aufwiesen, nur schwach violett. Rechnerisch ließ sich aus der gemessenen optischen Dichte eine spontane zytotoxische Aktivität der S87 gegenüber den Vero-Zellen von 71 % nachweisen, die damit sogar noch höher war, als die gegenüber den CTAC-Zellen.

4.6.3 Spontane zytotoxische Aktivität des Überstandes

Zur Überprüfung der Zytotoxizität des Überstandes wurden die Zielzellen anstatt mit den Effektorzellen mit dem zellfreien Überstand der vorher mit CTAC-Zellen co-inkubierten, abzentrifugierten S87 inkubiert und ein MTT-Test durchgeführt.

4.6.3.1 CTAC-Zellen

Die Vertiefungen, die mit dem Überstand inkubiert wurden, wiesen bereits makroskopisch eine intensivere violett-Färbung auf als die Kontrollvertiefungen. Rechnerisch ergab sich für die Vertiefungen, die mit dem zellfreien Überstand inkubiert wurden, bei der Berechnung der spontanen zytotoxischen Aktivität im Durchschnitt ein Wert von -7 %. Dies bedeutet, dass durch den Überstand keine Lyse der Zellen stattgefunden hatte, sondern die metabolische Aktivität gegenüber den Kontrollzellen gesteigert wurde.

4.6.3.2 Vero-Zellen

Die zytotoxische Aktivität betrug -6 %, auch hier wiesen die Vertiefungen, die mit dem Überstand inkubiert wurden, eine intensivere Färbung auf.

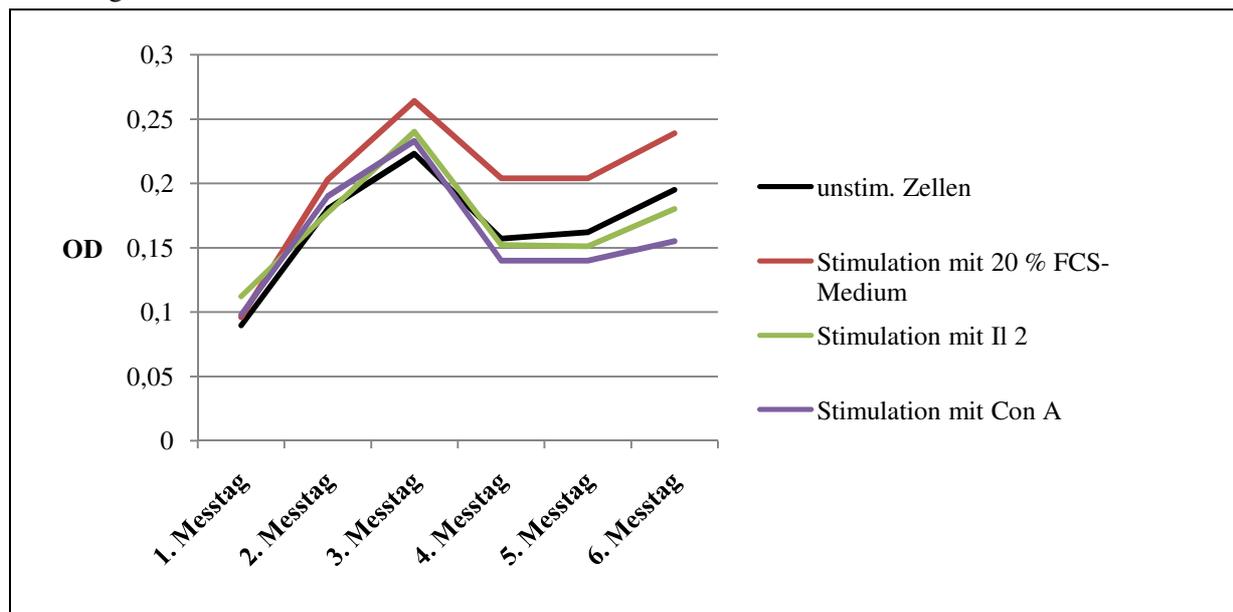
4.7 Stimulation der Zellen mit verschiedenen Mitogenen

Entsprechend der beschriebenen Versuchsanordnung (siehe Abbildung 1) wurden in einem Ansatz verschiedene Mitogene und deren Auswirkung auf die Zellen getestet. Der Nachweis einer gesteigerten metabolischen Aktivität, welche als erhöhte Proliferation interpretiert werden kann, erfolgte mittels MTT-Test. Als Kontrolle fungierten Zellen, die mit dem üblichen 10 % FCS (PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich) enthaltenden RPMI 1640 Medium (PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich, später Life Technologies GmbH, Darmstadt) versorgt wurden.

Wie sich in Abbildung 11 auch graphisch erkennen lässt, ist im beschriebenen Versuch bei allen Ansätzen der höchste Farbumsatz und damit der größte Wert der optischen Dichte am dritten Tag zu verzeichnen. Dabei ist der Wert der höchste, der bei den Zellen gemessen wurde, die aus dem zu gleichen Teilen bestehenden Medium aus konditioniertem Medium und 20 % FCS haltigem Medium inkubiert wurden. Danach folgten die Werte der Zellen, die mit Interleukin 2 und mit Concanavalin A inkubiert wurden. Den niedrigsten Wert zeigten die Zellen, die mit dem regulären Medium inkubiert wurden. Eine weitere Parallele zwischen den

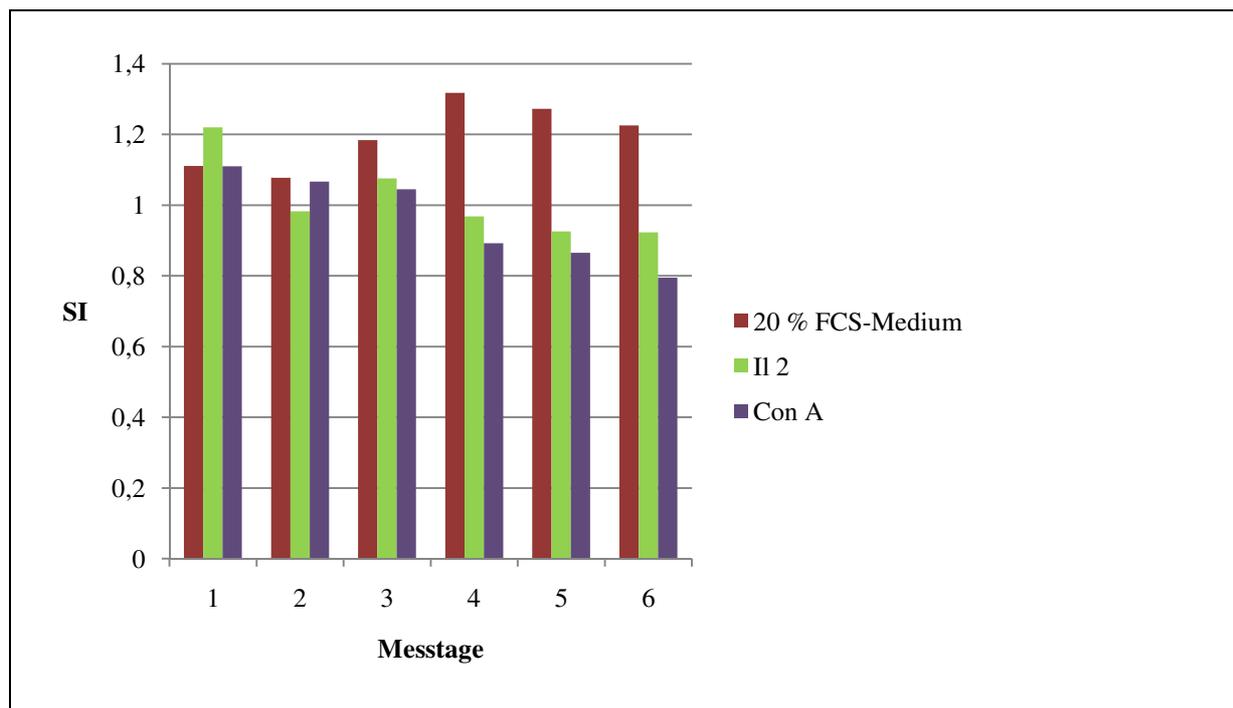
Messdaten stellt die verminderte Umsetzung des Farbstoffes ab dem vierten Messtag dar. Zudem wiederholt sich die Beobachtung, dass die Werte an Tag vier und fünf nahezu identisch waren. Bei allen Ansätzen zeigt sich zum Ende hin am letzten Tag nochmals eine größere optische Dichte als an den zwei Messtagen zuvor, jedoch überschritt keiner dieser Werte die Werte vom dritten Messtag.

Abbildung 11: Mittelwerte der optischen Dichten aus vier Vertiefungen an den verschiedenen Messtagen



4.7.1 Stimulationsindex

Für die Berechnung des Stimulationsindex (SI) wurde der Mittelwert der optischen Dichte der stimulierten Zellen durch den Mittelwert der optischen Dichte der unstimulierten Zellen geteilt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der höchste Stimulationsindex an allen Messtagen, außer dem ersten, durch die Stimulation mit dem Medium erreicht wurde, das sich zu gleichen Teilen aus 20 % FCS enthaltendem Mediums und konditioniertem Medium zusammensetzte. Der höchste Wert wurde am vierten Messtag erzielt und betrug 1,299, dicht gefolgt von dem am fünften Messtag mit einem Stimulationsindex von 1,259. Die niedrigsten SI-Werte wurden ab dem dritten Messtag für die Stimulation mit Concanavalin A registriert und betragen 1,045 am dritten, 0,892 am vierten, 0,864 am fünften und 0,795 am letzten Messtag.

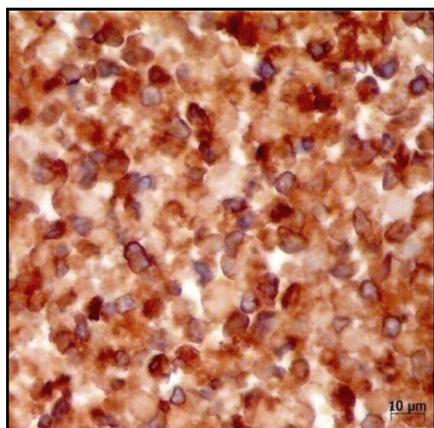
Abbildung 12: Stimulationsindices an den verschiedenen Messtagen

4.8 Immunphänotypische Charakterisierung

4.8.1 Zugehörigkeit zur T-Zelllinie

In der immunzytologischen Untersuchung zum Nachweis des CD3-Antigens konnte bei 95 % der Zellen ein deutlich braun gefärbtes, Membran-assoziiertes Signal registriert werden, welches in der entsprechenden Negativkontrolle nicht vorhanden war. Eine Expression des mit dem T-Zell-Rezeptor assoziierten CD3-Antigens wurde damit nachgewiesen.

Abbildung 13: Immunzytologischer Nachweis einer CD3-Expression im FFPE-Material. Die Membran-assoziierte, braune Färbung wurde als positives Signal gewertet.



4.8.1.1 Weitere Differenzierung der T-Zellen durch Untersuchungen zur Expression des CD4- und CD8-Antigens

4.8.1.1.1 Gefrierschnittmethode

Beim Nachweis des CD4- und CD8-Antigens an Gefrierschnitten konnte kein positives Signal detektiert werden. Die Positivkontrollen wiesen ein deutliches, braunes intrazelluläres Signal auf.

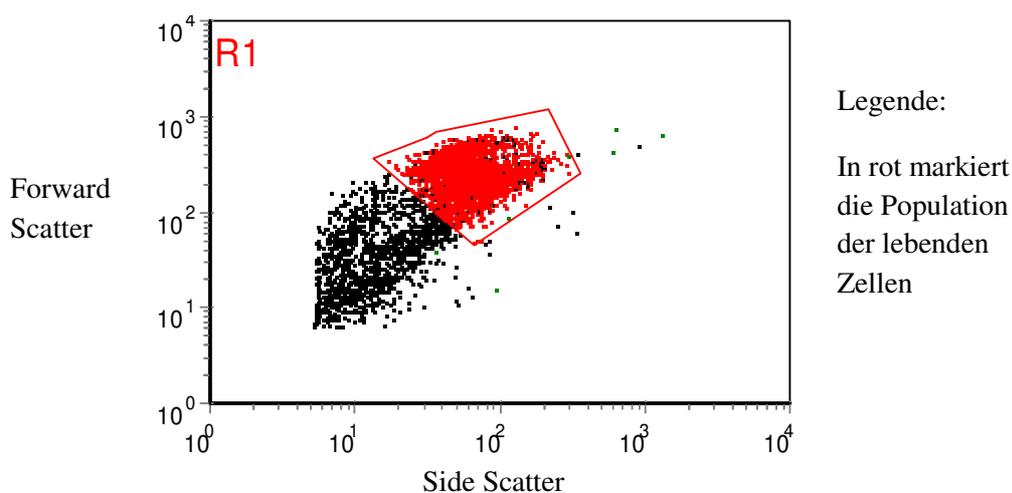
4.8.1.1.2 Lebendinkubation

Kein Signal konnte sowohl bei der Inkubation mit dem CD4- als auch mit dem CD8-Antikörper gefunden werden.

4.8.1.1.3 Durchflusszytometrie

Der erste Schritt zur Auswertung der Durchflusszytometriedaten ist die Festlegung der im Focus der Untersuchungen liegenden Zellpopulation. Dabei werden die entsprechenden Zellpopulationen in Auswertefenstern („Gates“) zusammengefasst. In Abbildung 14 stellt jeder Punkt eine einzelne Zelle dar. Anhand der Größe und der Granularität wurde der entsprechend zu untersuchende Bereich ausgewählt und im Auswertefenster zusammengefasst. In zuvor durchgeführten Vorversuchen wurden die Large Granular Lymphocytes auf ihre Eigenfluoreszenz hin untersucht. Da sie jedoch nur eine äußerst geringe Eigenfluoreszenz aufwiesen, konnte dieser Wert vernachlässigt werden.

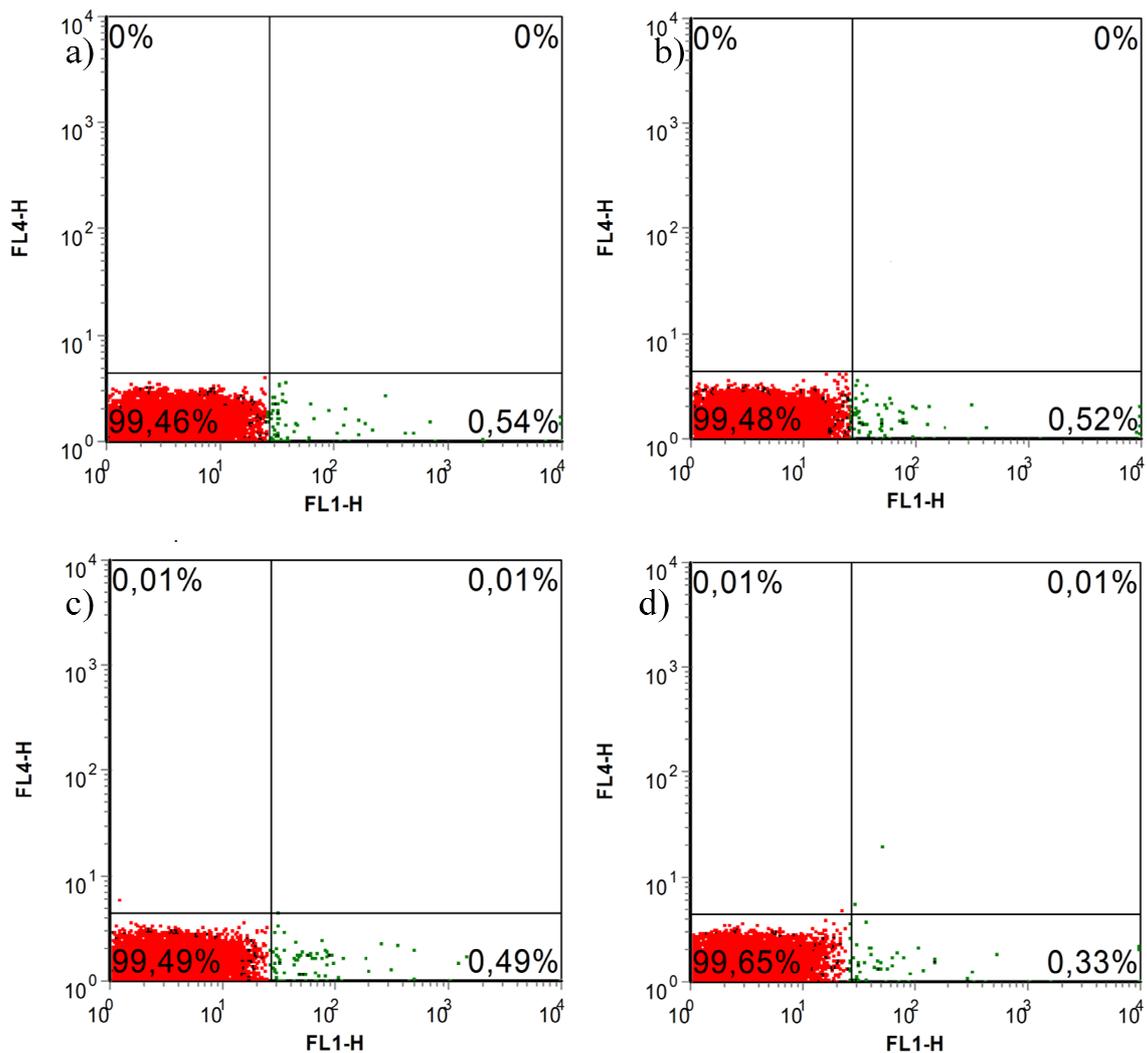
Abbildung 14: Darstellung der Zellpopulation im Durchflusszytometer



In der Durchflusszytometrie der Negativkontrolle (unmarkierte S87-Zellen) stellten sich zwei dominierende Zellpopulationen mit deutlichen Unterschieden in der Zellgröße dar. Die größeren Zellen konnten als die lebenden und damit als die im Focus liegende Zellpopulation

identifiziert werden. In dieser ausgewählten Population lagen die als einzelne Punkte dargestellten Zellen dicht beieinander. In der anderen Population sind die Signale deutlich breiter verteilt. Somit zeigen die Zellen deutlich diversierende Größe und Granularität. Als CD4-positiv zeigten sich lediglich 0,38 % bzw. 0,54 % bei der Wiederholung des Ansatzes der Zellen im Auswertefenster. Auch die Inkubation der zuvor mit Concanavalin A stimulierten Zellen zeigte keine Veränderungen im Expressionsmuster. Die CD4-Expression lag zwischen 0,36 % und 0,52 %, also annähernd im selben Bereich wie die Werte der unstimulierten Zellen. Auch die Untersuchungen zur Expression von CD8 ergaben ähnlich niedrige Werte. 0,37 % bis 0,49 % der Zellen zeigten eine CD8-Expression, bei den stimulierten Zellen waren es 0,24 % bis 0,33 %.

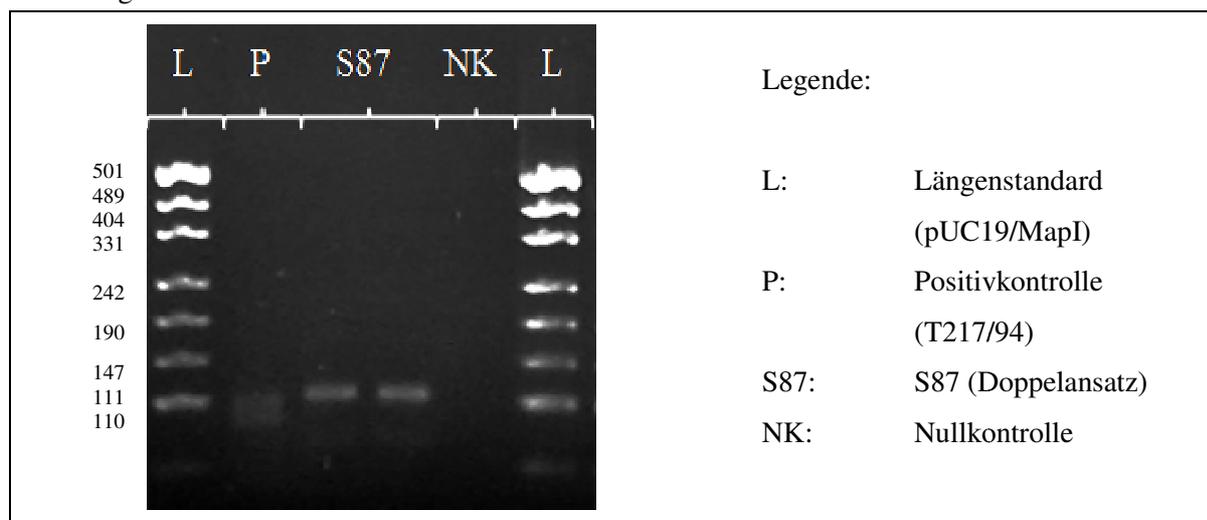
Abbildung 15a-d: **a:** CD4-Expression unstimulierter Zellen, **b:** CD4-Expression von Con A-stimulierten Zellen, **c:** CD8-Expression unstimulierter Zellen, **d:** CD8-Expression von Con A-stimulierten Zellen



4.8.1.2 Nachweis eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements

Eine reproduzierbare, gut abgrenzbare und deutliche Bande konnte dokumentiert werden (Abbildung 16). Daneben konnte eine weitere, gut abgrenzbare, jedoch deutlich schwächere Bande identifiziert werden. Die Positivkontrolle präsentierte sich in dieser Auswertung als biklonaler Tumor, wo hingegen er in einer anderen Arbeit als oligoklonaler Tumor definiert wurde (Fischer, 2013). Somit konnte ein T-Zell-Rezeptor-Rearrangement bestätigt werden.

Abbildung 16: Ergebnis des molekularbiologischen Nachweises eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements



4.8.2 Untersuchungen zur Expression von B-Zell-Markern

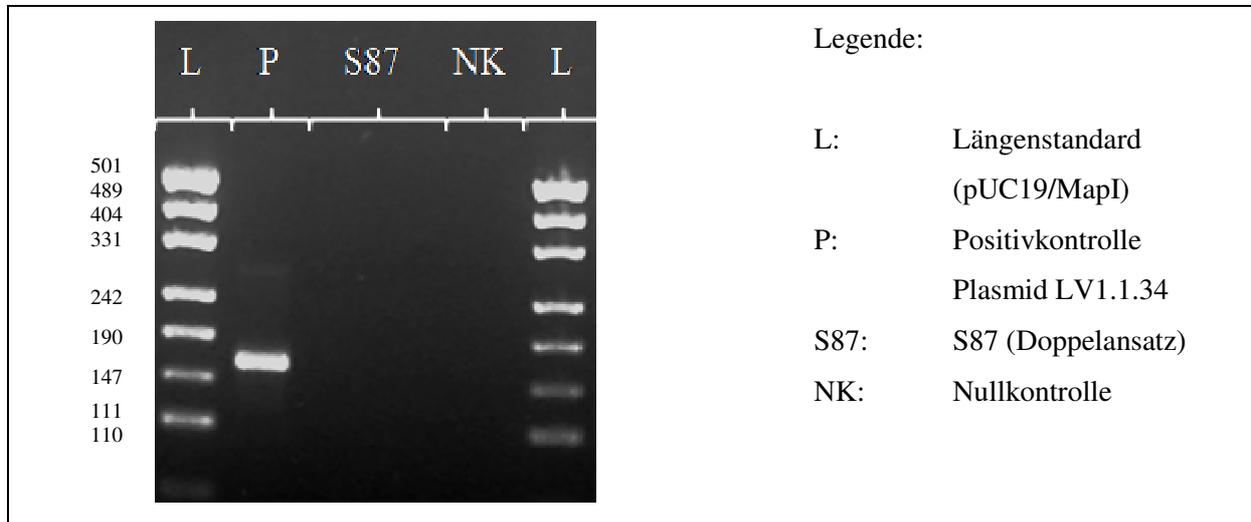
Zu den Large Granular Lymphocytes gehören zum einen die natürlichen Killerzellen und zum anderen die zytotoxischen T-Zellen, jedoch keine Zellen der B-Zellreihe. Dennoch zeigten ungefähr 60 % der S87-Zellen in der immunzytologischen Untersuchung ein braunes, zytoplasmatisches Signal bei der Detektion des CD45R-Antigens, welches häufig als B-Zell-Marker eingesetzt wird (Monteith et al., 1996). In der Negativkontrolle fehlte dieses Signal.

Aufgrund der positiven Ergebnisse der CD45R-Immunzytologie wurden zwei weitere B-Zell-Marker eingesetzt, um eine verbesserte Interpretierbarkeit der immunzytologischen Ergebnisse zu ermöglichen. Im Gegensatz zu der Positivkontrolle, die ein eindeutig positives Signal brachte, waren die S87 negativ für die Expression des BLA.36- und CD79 α -Antigens.

4.8.2.1 Untersuchung auf das Rearrangement der B-Zell-Rezeptorgene

Es konnte keine entsprechende Amplifikation nachgewiesen werden.

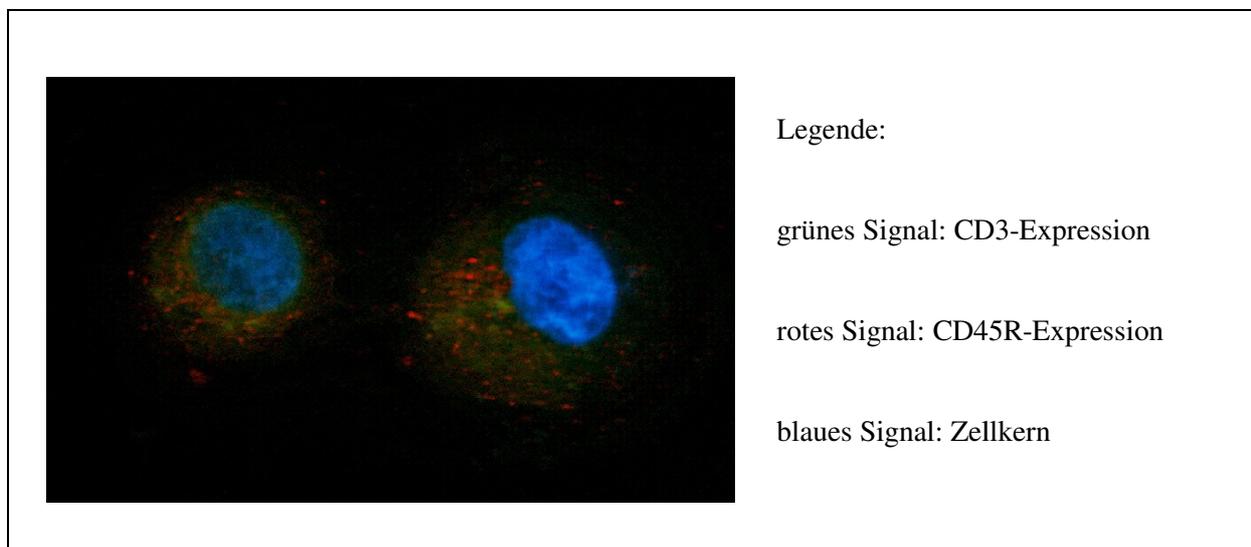
Abbildung 17: Ergebnis des molekularbiologischen Untersuchung eines B-Zell-Rezeptor-Rearrangements



4.8.3 Doppelmarkierung von CD3 und CD45R

Um eine gleichzeitige Expression des CD3- und des CD45R-Antigens darzustellen, wurde eine Doppelmarkierung durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Großteil der Zellen sowohl eine durch ein grünes Signal dargestellte CD3- als auch eine durch ein rotes Signal dargestellte CD45R-Expression zeigte. Wenige Zellen zeigten ausschließlich eine CD3-Expression. Eine reine CD45R-Expression konnte nicht registriert werden. In der Negativkontrolle konnte weder ein grünes noch ein rotes Signal dokumentiert werden.

Abbildung 18: Doppelmarkierung CD3 und CD45R



4.8.4 Untersuchungen zur Expression des CD56-Antigens (N-CAM) und von NK1

Ein positives Signal konnte in den S87-Schnitten nicht nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen zeigten hingegen das erwartete Signal.

4.8.5 Untersuchungen zur Expression des antiapoptotischen Bcl-2

Ein deutliches, intrazytoplasmatisches, fein granuläres Signal in nahezu 95 % aller S87-Zellen konnte detektiert werden, welches in der Negativkontrolle nicht vorhanden war (Abbildung 33j).

4.8.6 Nachweis von Proliferationsmarkern

4.8.6.1 PCNA

Bei fast 90 % der S87-Zellen konnte eine positive Reaktion im Zellkern registriert werden (Abbildung 33k).

4.8.6.2 Ki-67

Ungefähr 10 % der Einzelzellen zeigten ein positives braunes Signal im Zellkern (Abbildung 33l).

4.8.7 Untersuchungen zur Expression des Granzym B-Antigens

Ein positives Signal konnte weder bei den Schnitten von S87 noch bei der Positivkontrolle (felines Tonsillengewebe) detektiert werden. Eine positive Reaktion fand sich lediglich bei den Schnitten der humanen Tonsille, bei der Einzelzellen ein deutlich positives Signal zeigten.

4.8.8 Zusammenfassung der immunzytologischen Untersuchungen

Immunchemisch konnte eine Expression von CD3 nachgewiesen werden, welche ebenso wie durch den Nachweis des T-Zell-Rezeptor-Rearrangements eine Zuordnung zu den T-Zellen ermöglicht. Eine weitere Differenzierung durch die Expression von CD4 oder CD8 konnte nicht erfolgen. Zwar exprimieren die Zellen ebenfalls das CD45R-Antigen, eine Zugehörigkeit zu den B-Zellen konnte jedoch durch eine weitere immunzytologische Untersuchung auf zwei zusätzliche B-Zell-Marker und das Fehlen eines B-Zell-Rezeptor-Rearrangements nicht untermauert werden.

4.9 Untersuchungen zum FeLV-Status

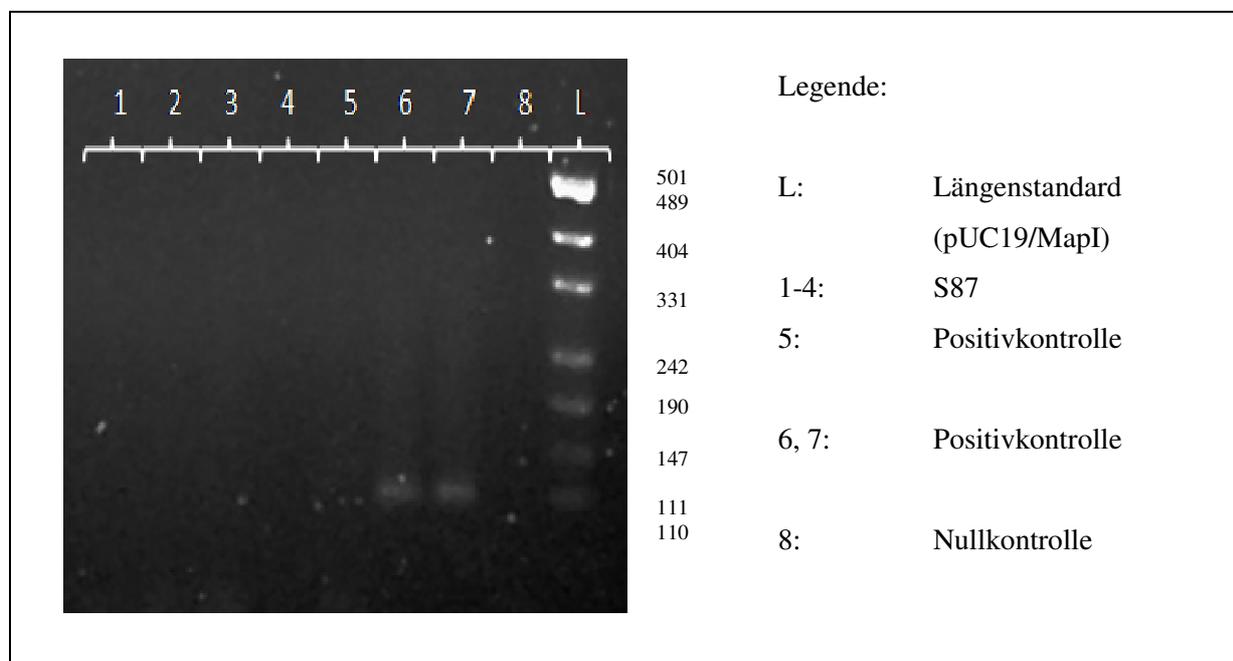
4.9.1 Untersuchungen zur Expression von FeLV-Antigenen

Immunchemisch wurde kein Hinweis auf eine Expression der untersuchten FeLV-Antigene gefunden. Bei der gleichermaßen inkubierten Positivkontrolle zeigte sich in einzelnen Zellen ein deutliches, dunkelbraunes Signal.

4.9.2 Untersuchungen zum Nachweis von FeLV-Provirus

Es konnte sowohl in der ersten, als auch in der zweiten Reaktion der semi-nested PCR keine Amplifikation auf der erwarteten Höhe von ca. 110 Basenpaaren dokumentiert werden und somit kein exogenes FeLV-Provirus in der zellulären DNS nachgewiesen werden.

Abbildung 19: Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung auf FeLV-Provirus



4.10 Zytogenetische Charakterisierung

Chromosomale Instabilität in Form von Aneuploidie ist ein häufiges Charakteristikum maligner Neoplasien. Da sich bei länger in Kultur gehaltenen Zelllinien der Karyotyp verändern kann (Chiba et al., 2000), wurden die Untersuchungen zur chromosomalen Instabilität zum einen in Passage 10, und zum anderen in Passage 80 vorgenommen, um mögliche, im Laufe der Kultivierung erworbenen Veränderungen des Karyotyps analysieren zu können.

4.10.1 Chromosomenanalyse der Passage 10

Bei 17 Metaphaseplatten (8,5 %) konnte ein hypodiploider Chromosomensatz mit 37 Chromosomen diagnostiziert werden, bei 90 Metaphaseplatten (45 %) ein euploider Chromosomensatz ($2n=38$). Eine Hyperdiploidie mit einem überschüssigen Chromosom wurde bei 39,5 % gefunden. Bei 3,5 % konnten 40, bei 2 % 41 und bei 0,5 % 42 Chromosomen ausgezählt werden. Zusammenfassend trat bei 55 % der untersuchten Metaphaseplatten eine Abweichung vom regulären diploiden Chromosomensatz auf.

Abbildung 20a, b: Darstellung einer Metaphaseplatte von Passage 10 mit a) 38 Chromosomen und b) 39 Chromosomen (Obj x 100)

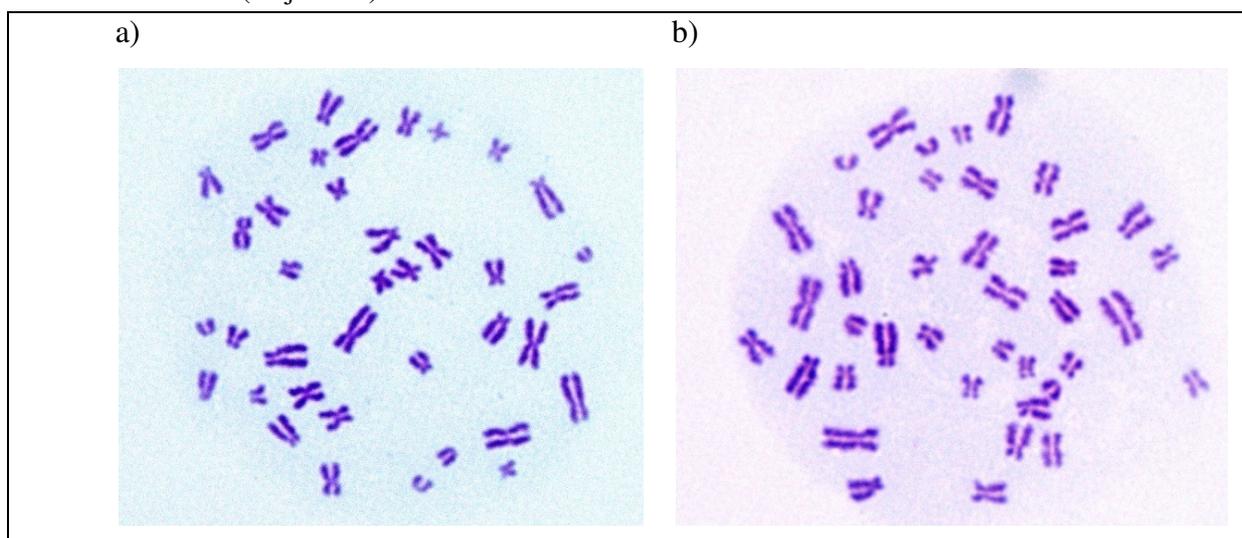
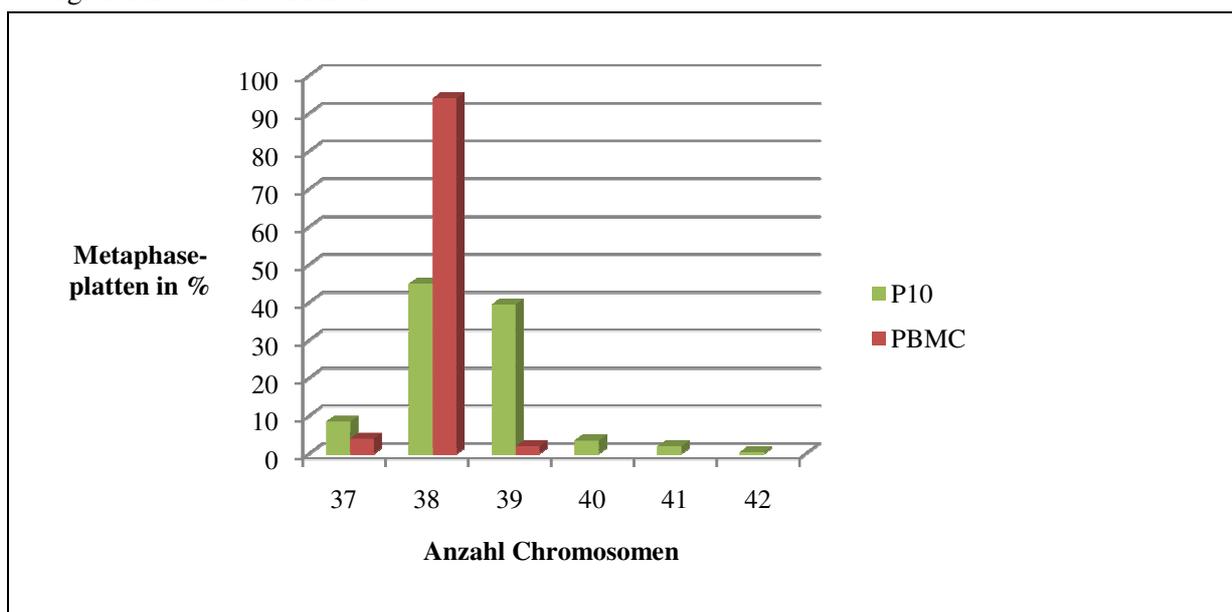


Abbildung 21: Verteilung des Karyotyps der ausgewerteten Metaphaseplatten aus Passage 10 im Vergleich zu denen der PBMC



4.10.2 Chromosomenanalyse der Passage 80

In Passage 80 zeigte sich eine größere Abweichung vom regulären Karyotyp als in Passage 10. Bei 1,5 % der Metaphaseplatten konnten lediglich 37 Chromosomen registriert werden, hingegen bestand bei einem deutlich größeren Anteil (32,5 %) der Chromosomensatz aus 39 Chromosomen. Den größten Anteil mit 42 % machten die Metaphaseplatten aus, bei denen 40 Chromosomen dokumentiert werden konnten. Bei 3,5 % der Metaphaseplatten wurden 41, bei 1,5 % 42 Chromosomen gezählt. Einen euploiden Chromosomensatz ($2n=38$) zeigten lediglich 19 % der untersuchten Metaphaseplatten.

Abbildung 22a, b: Darstellung einer Metaphaseplatte von Passage 80 mit a) 39 Chromosomen und b) 40 Chromosomen (Obj. x 100)

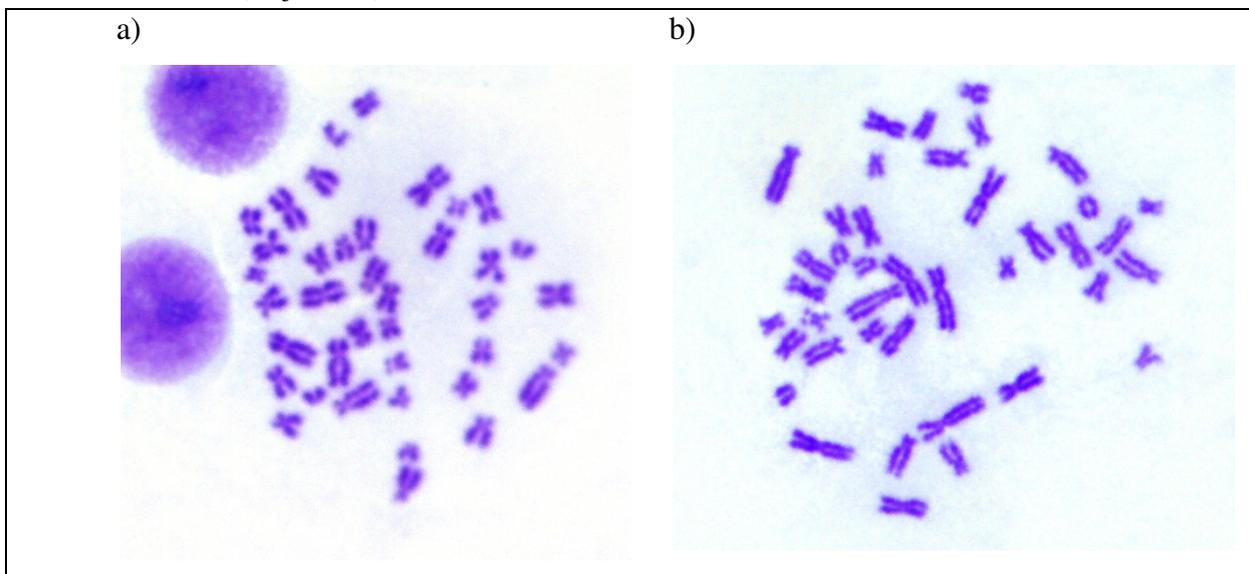
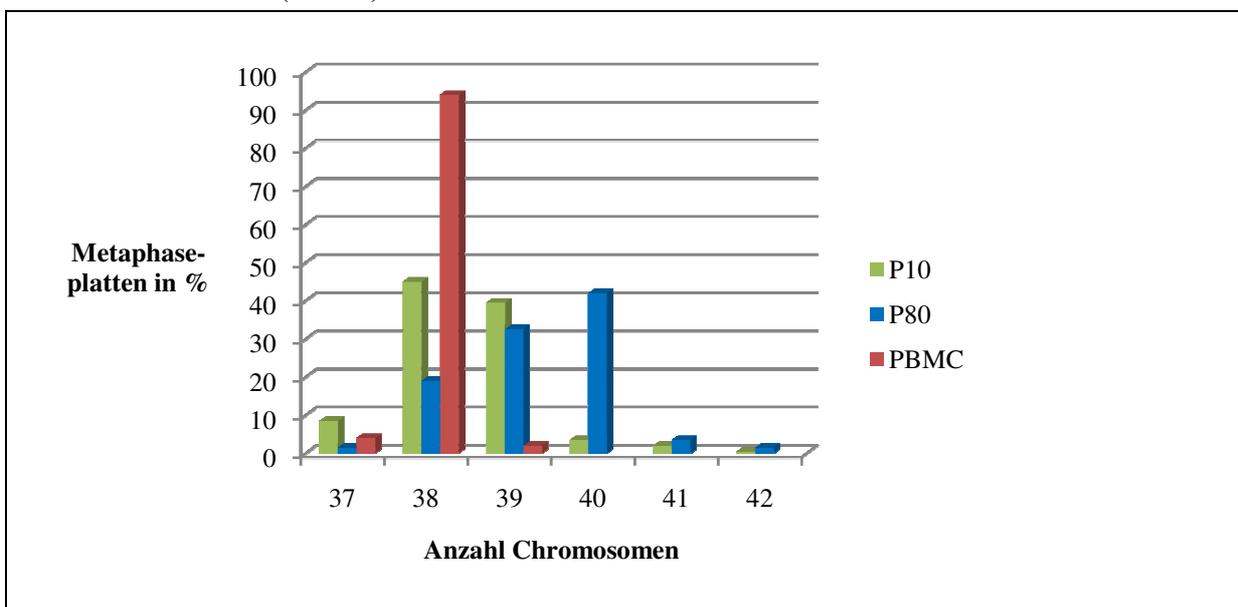


Abbildung 23: Anzahl der Chromosomen pro Metaphaseplatte aus Passage 10 und Passage 80 sowie in den Kontrollzellen (PMBC)



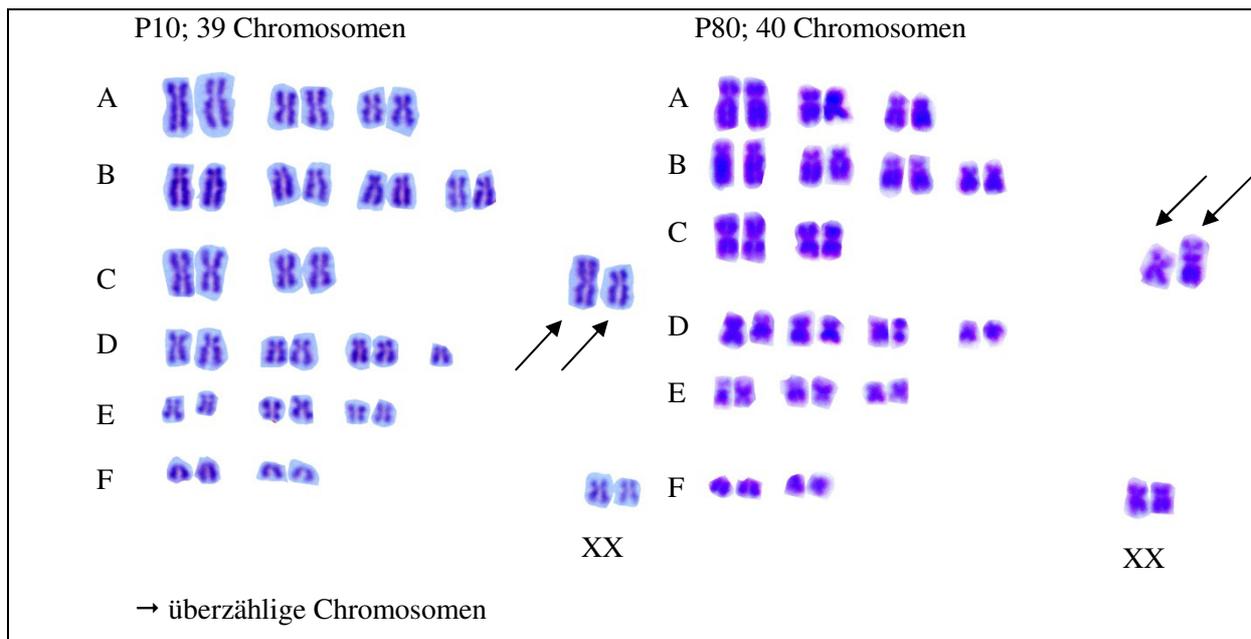
4.10.3 Statistische Auswertung

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Im Vergleich der absoluten Chromosomenzahlen war sowohl der Unterschied zwischen PBMC und P10 ($p < 0,001$), PBMC und P80 ($p < 0,001$) sowie P10 und P80 ($p < 0,001$) signifikant. Die Nullhypothese, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Passagen und den PBMC gibt, wurde damit abgelehnt. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für die Untersuchungen, bei denen die Chromosomen nicht als absolute Zahlen gegeneinander verrechnet wurden, sondern die Chromosomen in Kategorie 1 ($2n=38$) und in Kategorie 2 ($2n \neq 38$) eingeteilt wurden. Dabei konnte für PBMC und P10 ($p < 0,001$), PBMC und P80 ($p < 0,001$) sowie P10 und P80 ($p < 0,001$) jeweils ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.10.4 Ergebnisse der Karyogramme von Passage 10 und Passage 80

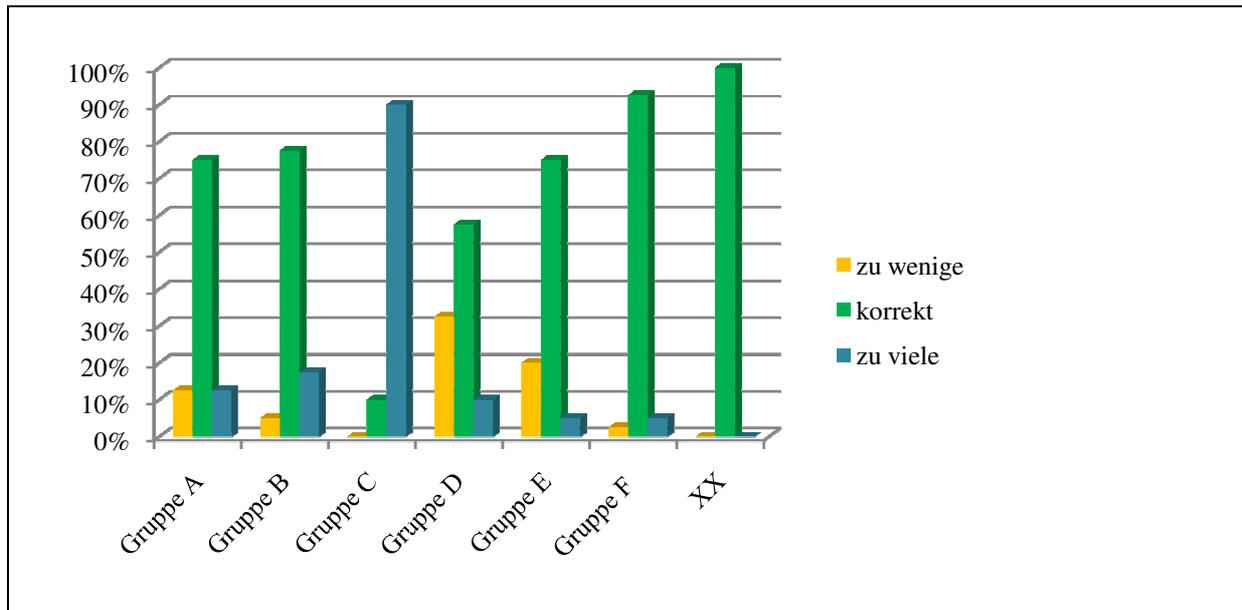
Um zu überprüfen, inwieweit die numerischen Chromosomenabweichungen einer Regularität und Kontinuität unterliegen, wurden von Passage 10 jeweils zehn Karyogramme von Metaphaseplatten mit 38 und mit 39 Chromosomen und von Passage 80 jeweils zehn Metaphaseplatten mit 39 und mit 40 Chromosomen angefertigt. Die fehlenden oder überschüssigen Chromosomen wurden entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit (A-F, XX), wie sie nach den Vorgaben der San Juan Conference (Jones, 1965) definiert sind, einsortiert und tabellarisch notiert.

In den Karyogrammen, die von den präparierten Vergleichschromosomen (PBMC) angefertigt wurden, konnte bei allen zehn Karyogrammen ein komplettes und korrektes Karyogramm erstellt werden.

Abbildung 24: Beispielkaryogramme P10 und P80

Im Zusammenhang betrachtet konnten bei den Karyogrammen beider Passagen kontinuierlich auftretende Veränderungen festgestellt werden (vgl. Abbildung 25). So sind bei allen Karyogrammen die deutlichsten Abweichungen in Gruppe C zu erkennen. Hier stimmte nur in 10 % der Karyogramme die Einteilung der Chromosomen mit der vorgegebenen Einteilung überein. In 90 % fand sich eine Abweichung dahingehend, dass bis zu drei Chromosomen mehr der Gruppe zugeteilt werden konnten, als es bei den Kontrollkaryogrammen der Fall war. Bei einigen der Chromosomen aus Gruppe C konnte zusätzlich eine deutliche Bänderung des überschüssigen Chromosoms registriert werden, die bei den anderen Chromosomen nicht auffiel. Ein nicht ganz so deutlicher Trend zeichnet sich in Gruppe D ab: In dieser Gruppe sind nach Gruppe C die häufigsten Veränderungen zu dokumentieren. So betrug der Anteil aller untersuchten Karyogramme der Zelllinie, die eine vollständige Gruppe D aufwiesen, nur knapp mehr als die Hälfte (57,5 %). Die Abweichungen in dieser Gruppe bestanden bei 32,5 % aus Verlusten und bei 10 % aus zusätzlichen Chromosomen.

Abbildung 25: Zusammenfassung der Abweichungen aller analysierten Karyogramme der S87-Zelllinie



4.10.5 Zentrosomenanalyse

Für die Zentrosomenanalyse wurden jeweils die Zentrosomen von 50 Zellen von Passage 10 und Passage 80 sowie den PBMC als Kontrollzellen ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Präparate, die mittels Zytozentrifuge hergestellt wurden, deutlich bessere Ergebnisse hervor brachten und auch leichter auszuwerten waren als die Präparate, die aus FFPE-Material hergestellt wurden. Bei den FFPE-Präparaten waren die Zellen durch die Schrumpfungartefakte deutlich kleiner und in ihrer Form sehr variabel, sodass Signale teilweise nicht sicher den Zellen zugeordnet werden konnten.

Abbildung 26: Darstellung der Zentrosomenverteilung in Passage 10 und Passage 80 sowie den Kontrollzellen (PBMC)

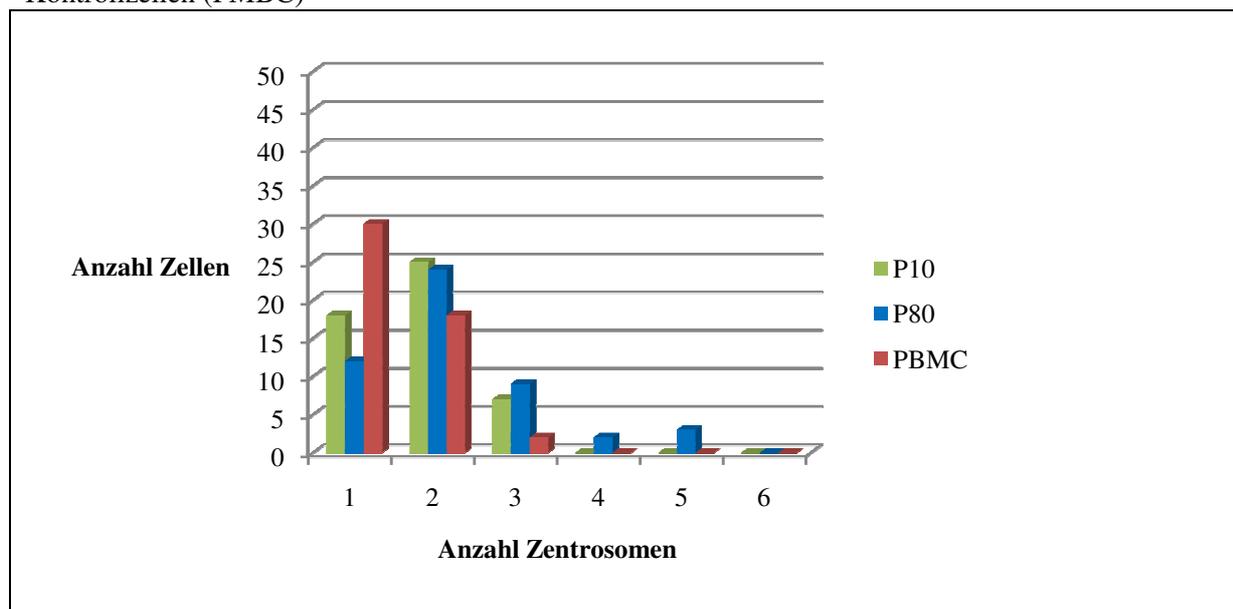
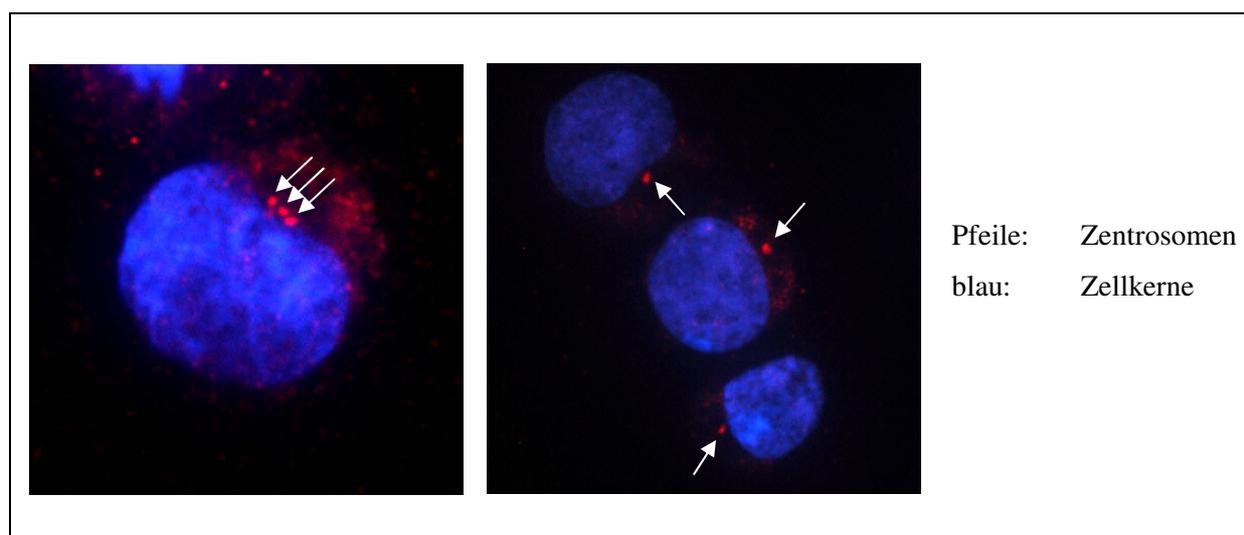


Abbildung 27: Detektion der Zentrosomen mittels Nachweis von γ -Tubulin (Obj. x 100)



4.10.6 Statistische Auswertung

Für die absolute Anzahl an Zentrosomen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Zentrosomenzahl von PBMC und P80 ($p < 0,001$) ebenso gesichert werden wie beim Vergleich zwischen PBMC und P10 ($p = 0,031$). Zwischen P10 und P80 ($p = 0,167$) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei Einteilung der Werte in zwei Kategorien (Kategorie 0/unphysiologisch: ≥ 3 ; Kategorie 1/physiologisch: ≤ 2) konnte für den Vergleich zwischen Zentrosomen der Passage 10 und den PBMC ($P = 0,081$) sowie im Vergleich der Zentrosomen von Passage 10 und Passage 80 ($p = 0,086$) kein signifikanter Unterschied

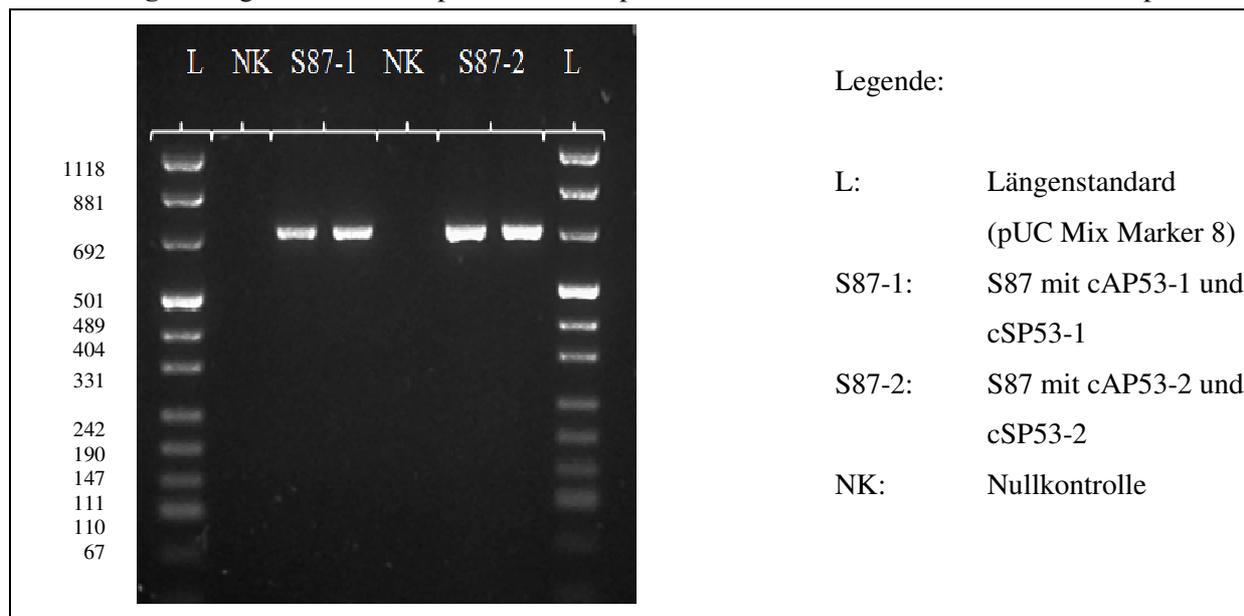
gefunden werden. Lediglich zwischen Passage 10 und Passage 80 konnte ein signifikanter Unterschied dokumentiert werden ($p=0,001$).

4.11 Untersuchungen zur p53-Sequenz

Für die Untersuchung auf etwaige p53-Mutationen wurden mehrere Sequenzbereiche zunächst amplifiziert und die DNS-Fragmente sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden anschließend mit der regulären feline Sequenz von p53 (GenBankID: D26608.1) verglichen und auf Abweichungen untersucht. Der abgelesene Bereich liegt zwischen dem Startcodon ATG (Nukleotide 127-129), welches für die Aminosäure Methionin codiert und dem ersten Stoppcodon mit der Triplettkombination TGA (Nukleotide 1285-1287). Der abgelesene Bereich beträgt dadurch 1161 Basenpaare und kodiert für 386 Aminosäuren und das Stoppcodon. Die Primer cAP53-1, cAP53-2, cSP53-3 und cSP53-4 liegen innerhalb dieses Bereiches, cSP53-1 liegt davor, cAP53-2 und cAP53-3 sind dahinter platziert.

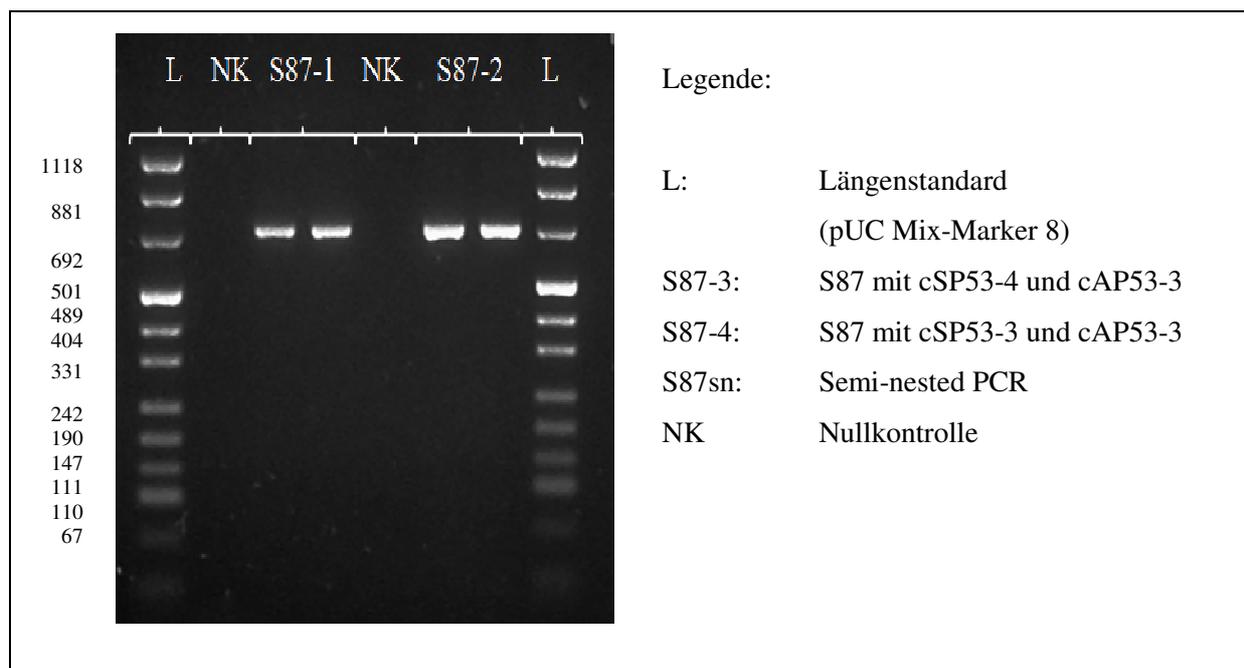
Für die Reaktion mit dem ersten Primerpaar (cSP53-1 und cAP53-1) ergab sich ein Amplifikat mit 677 Basenpaaren. Das Amplifikat des zweiten Primerpaares (cSP53-2 und cAP53-2) betrug 681 Basenpaare. Die beiden DNS-Fragmente hatten eine sich überschneidende Sequenz von 61 Basenpaaren. Auf dem Gel stellten sich die Amplifikate beider Primerpaare als distinkte Bande dar.

Abbildung 28: Ergebnisse der Amplifikation von p53 mit dem ersten und dem zweiten Primerpaar



Bei der Amplifikation mit dem zweiten Primerpaar fielen ab einer Sequenz mit einer Aneinanderreihung von Cytosin (Poly-C-Stretch) übereinandergelagerte Sequenzierungskurven auf, was auf ein fehlerhaftes Ablesen des Poly-C-Sequenz durch die Polymerase zurück geführt wurde. Mit drei weiteren Primern wurde versucht, diese Poly-C-Sequenz besser zu flankieren und so ein fehlerhaftes Ablesen zu vermeiden. Dabei wurden der cSP53-4 und der cAP53-3 so gewählt, dass sie die problematische Stelle so nah wie möglich flankierten. Die Größe des daraus entstandenen Amplifikats lag bei 359 Basenpaaren. Der cSP53-3 lag innerhalb des von dem cSP53-4 und cAP53-3 begrenzten Bereichs und wurde zum einen mit dem cAP53-3 kombiniert (Sequenzlänge: 315 Basenpaare) und zum anderen für die zweite Reaktion in einer semi-nested PCR mit dem Amplifikat aus der ersten Reaktion mit dem cSP53-4 und dem cAP53-3 verwendet. Auch mit diesen Primern konnte die problembehaftete Sequenz nicht korrekt abgelesen und sequenziert werden. Auf dem Gel präsentierten sich alle Ansätze der verschiedenen Primer als distinkte Bande.

Abbildung 29: Ergebnisse der Amplifikation von p53 mit dem dritten Primerpaar, cAP53-3 und cSP53-4 und der semi-nested PCR



In der Zelllinie konnte eine Abweichung an Position 591 (homozygot) registriert werden. Hier wurde Cytosin durch Thymin ersetzt. Da jedoch sowohl die Basensequenz TAC als auch TAT für die Aminosäure Tyrosin kodieren, hat dies keine Veränderung des Leserasters zur Folge.

Eine weitere Änderung konnte auf Höhe des 1444sten Nukleotids registriert werden. Hier wurde Adenin durch Thymin ersetzt. Diese Änderung liegt jedoch ähnlich wie die Poly-C-Sequenz nach dem Stoppcodon, sodass sie nicht abgelesen wird.

Abbildung 30a, b: Vergleich eines Abschnitts von p53 der amplifizierten Sequenzen mit der Referenzsequenz mit Darstellung der abweichenden Position (591)

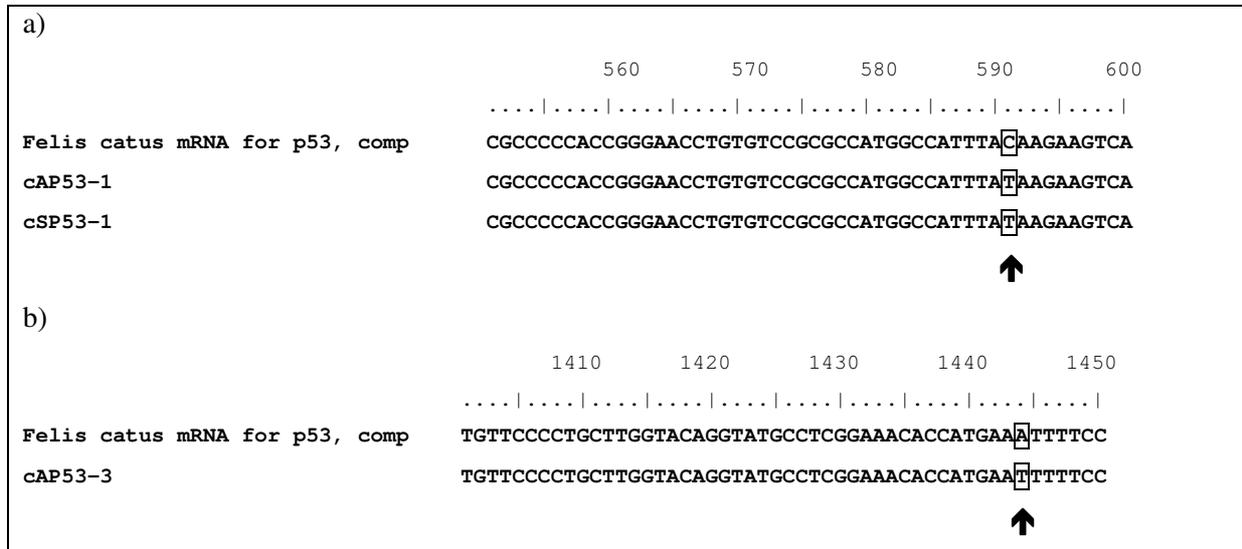


Abbildung 31: Homozygote p53-Gensequenz an Position 591(Primer cSP53-1)

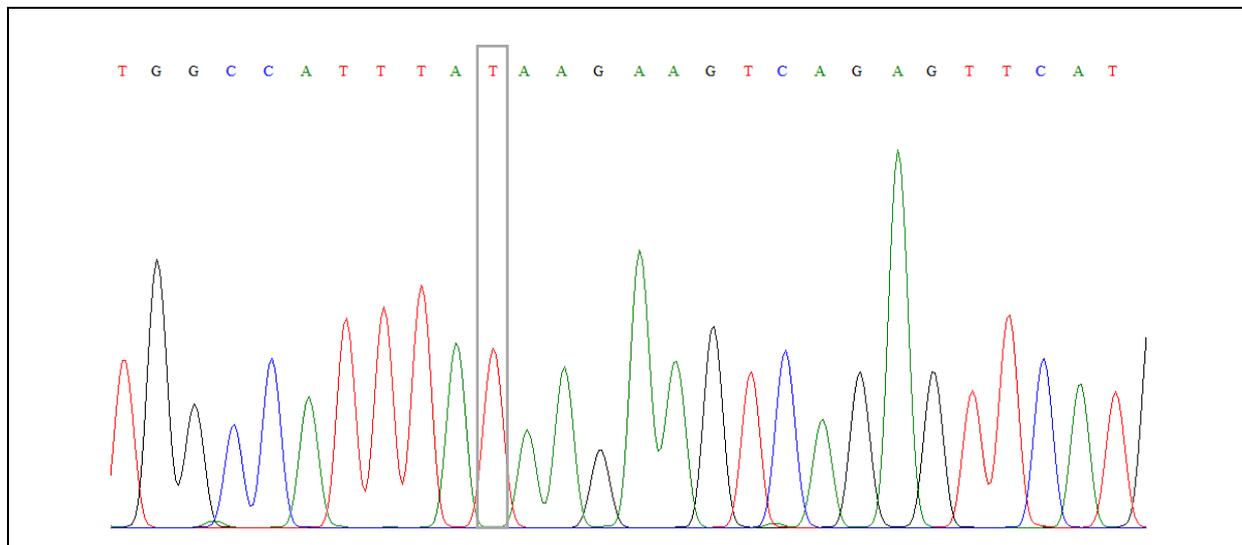


Abbildung 32: Vergleich der Aminosäuresequenz mit der Referenzsequenz mit Darstellung der veränderten Basensequenz

	560	570	580	590	600
				
Felis catus mRNA for p53, comp	CGCCCCACCGGGAACCTGTGTCCGCGCCATGGCCATT	TAC	AAGAAGTCA		
	ProProProProGlyThrCysValArgAlaMetAlaIle	Lys	LysLysSer		
cAP53-1	CGCCCCACCGGGAACCTGTGTCCGCGCCATGGCCATT	TAT	AAGAAGTCA		
	ProProProProGlyThrCysValArgAlaMetAlaIle	Lys	LysLysSer		
cSP53-1	CGCCCCACCGGGAACCTGTGTCCGCGCCATGGCCATT	TAT	AAGAAGTCA		
	ProProProProGlyThrCysValArgAlaMetAlaIle	Lys	LysLysSer		
				↑	

5 Diskussion

Durch die heutzutage mehr und mehr in den Focus der Aufmerksamkeit gerückte Kritik an Tierversuchen wurde in den letzten Jahren vermehrt nach Alternativen gesucht, welche die Möglichkeit bieten, diese zu ersetzen. Bereits Ende der 1950er Jahre wurde von britischen Wissenschaftlern das 3R-Prinzip formuliert, welches unter anderem die Idee verfolgt, die Tierversuche durch andere Methoden zu ersetzen (Russell und Burch, 1959). Eine Option, die in-vivo-Verhältnisse zumindest teilweise widerspiegeln zu können, ist durch die Etablierung von Zelllinien mit den unterschiedlichsten Eigenschaften gelungen. Sowohl bedeutende Schritte der Tumorgenese, als auch grundlegende Abläufe und Zellfunktionen konnten durch die Untersuchungen an Zelllinien verstanden werden. Einen nicht unerheblichen Anteil macht zudem die Erforschung neuer Chemotherapeutika für verschiedenste Tumorarten anhand von Tumor-Zelllinien aus. Entscheidend dafür ist die genaue Kenntnis über die verschiedenen Eigenschaften und deren Bedeutung der entsprechenden Zelllinien. Daher ist eine genaue Charakterisierung einer neu etablierten Zelllinie, wie der aus einem Large Granular Lymphocyte-Lymphom isolierten Zelllinie S87, eine wichtige Grundvoraussetzung für weitere Untersuchungen und Verwendungen.

Die Katze, aus deren Aszites die Large Granular Lymphocyte-Zelllinie isoliert wurde, zeigte die für LGL-Lymphome häufig beschriebenen, jedoch relativ unspezifischen Symptome wie Anorexie, Apathie und Inappetenz (Endo et al., 1998; Franks et al., 1986; Goitsuka et al., 1988; Kariya et al., 1997; Roccabianca et al., 2006; Wellman et al., 1992). Das Alter der Katze (12 Jahre) passte ebenfalls in die von verschiedenen Autoren berichtete medianen Altersgruppe von 8-13 Jahren und bestätigte damit, genau wie die Lokalisation in der Leber, die bereits beschriebenen Charakteristika der Large Granular Lymphocyte-Lymphome der Katze (Cheney et al., 1990; Darbes et al., 1998; Endo et al., 1998; Franks et al., 1986; Krick et al., 2008; Roccabianca et al., 2006; Wellman et al., 1992). In der Literatur wird zwar davon ausgegangen, dass die LGL-Lymphome bei der Katze keiner Geschlechtsdisposition unterliegen, allerdings handelt es sich auch bei diesem Tier um eine weibliche, kastrierte Katze, so wie es in 66 % der beschriebenen LGL-Lymphome der Fall ist (Cheney et al., 1990; Darbes et al., 1998; Endo et al., 1998; Franks et al., 1986; Goitsuka et al., 1988; Järplid und Feldman, 1993; Roccabianca et al., 2006; Tsuboi et al., 2010; Wellman et al., 1992).

Large Granular Lymphocyte-Lymphome sind bei der Katze selten diagnostizierte Lymphome. Ihr prozentualer Anteil an den als Lymphomen klassifizierten Neoplasien betrug in einer

Studie mit 594 Lymphomen lediglich 7,2 % (Krick et al., 2008). Erschwerend für die Diagnose von LGL-Lymphomen ist, dass ihr typisches Charakteristikum, die großen azurophilen Granula, in dem zur Routinediagnostik in Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten und HE-gefärbten Material häufig nicht oder nur schwer zu identifizieren sind. Auch andere Autoren konnten bereits feststellen, dass LGL-Lymphome im routinemäßig eingebetteten Material häufig nicht auf Anhieb korrekt diagnostiziert wurden, dadurch unterrepräsentiert sind und somit ihre Häufigkeit vielleicht höher liegt, als es bis jetzt angenommen wird (Darbes et al., 1998). So konnte auch bei den S87-Zellen die Diagnose eines Large Granular Lymphocyte-Lymphoms nur eindeutig durch das zytologische Präparat gestellt werden, im HE-gefärbtem FFPE-Material jedoch keine direkte Zuordnung der Zellen zu den Large Granular Lymphocytes erfolgen.

Für die Large Granular Lymphocytes der Katze gibt es keine speziellen, diagnostischen Immunmarker. Granzym B, welches für Large Granular Lymphocytes als potenzieller Marker in Frage käme, ohne dass dadurch eine Ausdifferenzierung zwischen natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen erfolgt, konnte bei der Katze trotz gegenteiliger Beschreibung in der Literatur in dieser Arbeit nicht als Marker bestätigt werden, da unter Verwendung des veröffentlichten Originalprotokolls sowie verschiedenen Varianten davon und mit dem gleichen Antikörper keine Reaktion mit Katzengewebe erfolgte (Tsuboi et al., 2010).

5.1 Zelllinien

Es sind bereits zahlreiche Lymphomzelllinien des Menschen mit den unterschiedlichsten Eigenschaften etabliert (Drexler und Macleod, 2010). Hingegen gibt es nur wenige feline Lymphomzelllinien, wobei die meisten im Rahmen der Forschung zum Thema des Felinen Leukämievirus (FeLV) entstanden. Nur wenige Zelllinien sind daher FeLV-negativ (Cheney et al., 1990; Mochizuki et al., 2011). Da heutzutage FeLV-induzierte Lymphome einen deutlich geringeren Anteil ausmachen als es noch Anfang der 80er Jahre der Fall war, ist gerechtfertigt, auch FeLV-negative Zelllinien in den Fokus der Forschung zu rücken (Hardy et al., 1981; Louwerens et al., 2005; Vail et al., 1998). Die LGL-Lymphome sind nur selten mit einer FeLV-Infektion assoziiert (Cheney et al., 1990; Franks et al., 1986; Järplid und Feldman, 1993; Kariya et al., 1997; Krick et al., 2008; Roccabianca et al., 2006; Wellman et al., 1992), dennoch sind Retrovirus-assoziierte Einzelfälle dokumentiert (Endo et al., 1998; Goitsuka et al., 1988; Roccabianca et al., 2006). Zudem ist eine der beiden bis heute

beschriebenen feline Large Granular Lymphocyte-Lymphomzelllinien FeLV-positiv (Goitsuka et al., 1993).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Zelllinie konnte als FeLV-negativ eingestuft werden, da sich weder FeLV-Antigene, noch molekularbiologisch FeLV-Provirus, noch Viruspartikel in der elektronenmikroskopischen Untersuchung darstellen ließen. Dies macht diese feline Zelllinie zu einer der wenigen FeLV-negativen feline Lymphomzelllinien, sowohl was die Produktion von FeLV-Partikeln als auch eine latente, horizontale FeLV-Infektion angeht.

5.2 Einordnung von S87

Durch ihr morphologisches Charakteristikum, die großen intrazytoplasmatischen azurophilen Granula, gelang die Zuordnung von S87 zu den Large Granular Lymphocytes im zytologischen Präparat. Im zytologischen Präparat stellte sich eine deutliche Anisozytose und Anisokaryose dar. Häufig waren zwei- oder sogar dreikernige Zellen sowie eine hohe Mitoserate zu beobachten. Diese Eigenschaften würden bei einem Tumor in vivo als Malignitätskriterien gewertet werden, in der Zellkultur kann jedoch, ebenso wie durch den Nachweis der Proliferationsmarker (PCNA, Ki-67), lediglich auf eine hohe Proliferationsrate geschlossen werden.

Das Fehlen der metachromatischen Effekte, wie sie bei Mastzellen auftreten, bestätigte weiterhin die Zuordnung zu den LGL und die Abgrenzung von den Mastzelltumoren.

Zur näheren Klassifizierung der S87-Zellen wurden verschiedene Methoden angewandt, die eine Zuteilung zu einer Ursprungszelle ermöglichen sollten. Durch den molekularbiologischen Nachweis eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements, in Kombination mit dem immunzytologischen Nachweis des mit dem T-Zell-Rezeptor assoziierten Oberflächenantigens CD3, konnten die Zellen als T-Zellen identifiziert werden (Chan et al., 1986; Lanier et al., 1986a). Die im Gel zu beobachtende zweite, deutlich schwächere Bande lässt sich durch ein biallelisches Rearrangement mit schlechter Primerbindung im anderen Allel erklären, wodurch es zu einer schwächeren Amplifikation kommen kann.

Den Nachweis des CD8-Antigens, ein Kriterium, das Chan et al. (1986) bei ihrer Einteilung und Differenzierung zwischen den beiden Subtypen der Large Granular Lymphocytes, den zytotoxischen T-Zellen und den natürlichen Killerzellen anführen, konnte bei den S87-Zellen

durch die üblicherweise gebrauchten diagnostischen Methoden nicht bestätigt werden. Generell muss eine Zuordnung allein anhand der CD8-Expression in jedem Fall kritisch betrachtet werden, da das CD8-Antigen auch auf 10 % der felines CD3-negativen, natürlichen Killerzellen nachgewiesen werden konnte (Vermeulen et al., 2012). In der Gefrierschnitttechnik konnte, wie auch bei der gekühlten Inkubation der Zellen für die Durchflusszytometrie, bei der durch das Herabkühlen mit Eis versucht wird, ein Internalisierung oder ein Abwerfen (Shedding) des gebundenen Primärantikörpers zu verhindern, keinerlei positives Signal detektiert werden. Auch nach Stimulation mit Concanavalin A zeigten die Zellen in der Durchflusszytometrie keine Expression von CD8. CD4- und CD8-negative und CD3-positive Large Granular Lymphocytes-Lymphome sind selten, machten jedoch in einer Studie von 2006, bei der 21 Katzen mit einem Large Granular Lymphocyte-Lymphom auf ihren immunzytologischen Phänotyp hin untersucht wurden, 14 % aus (Roccabianca et al., 2006). Im Rahmen eines weiteren Forschungsprojektes mit der Zelllinie S87 konnten jedoch mit Hilfe der Massenspektrometrie zwei Proteine, die zur CD8 α -Kette gehören, identifiziert werden (Henrich et al., 2014). Inwieweit dieses Ergebnis hinsichtlich der Einordnung zu einem Zelltyp der Large Granular Lymphocytes hilft, ist fraglich, da diese Methode bei der Charakterisierung feline Lymphozyten erstmalig angewendet wurde und nicht bekannt ist, inwieweit bei anderen, mit Hilfe der üblichen Methoden zunächst als CD8-negativ eingestuften Zellen, durch diese Untersuchungen ebenfalls Anteile des CD8-Proteins nachgewiesen werden könnten. Eine Erklärung dafür, warum die üblichen Methoden CD8 nicht detektierten, wäre eine Änderung des Epitops, sodass der monoklonale Antikörper nicht binden kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Internalisation oder das Abwerfen (Shedding) des Proteins, so dass es nicht nachgewiesen werden kann. Dabei sollte jedoch zu mindestens bei ersterer Variante in Gefrierschnitten aufgrund der mechanischen Eröffnung von Zellen trotzdem ein Signal zu verzeichnen sein.

Die Einordnung von Large Granular Lymphocytes zu den natürlichen Killerzellen geschieht meist über den Ausschluss eines T-Zell-Rezeptor-Rearrangements oder über einen CD3-negativen immunologischen Phänotyp (Chan et al., 1986; Lanier et al., 1986a). Als Marker für natürliche Killerzellen werden verschiedene Antigene diskutiert. CD56, auch bekannt unter dem Namen Leu 19, NKH-1 oder neuronales Zelladhäsions-Molekül (N-CAM) (Lanier et al., 1986c), kann Hinweise auf die Zugehörigkeit zu den natürlichen Killerzellen geben und wird von einigen Autoren in Verbindung mit einer negativen CD3-Expression als potenter Marker für natürliche Killerzellen bei der Katze gewertet (Vermeulen et al., 2012). Zu beachten gilt es dabei jedoch, dass auch bei positivem Ergebnis, sowohl beim Menschen als

auch bei der Katze, keine endgültige Zuordnung zu den natürlichen Killerzellen vorgenommen werden sollte, da CD3-positive Zellen ebenfalls CD56 exprimieren können (Gentile et al., 1994; Kern et al., 1992; Shimojima et al., 2003). Vermeulen et al. (2012) ordnen einen CD56⁺/CD3⁺ Phänotyp bei der Katze den natürlichen Killer T-Zellen (NKT) zu und einen CD56⁺/CD3⁻ Phänotyp den natürlichen Killerzellen. Die Untersuchungen zur Expression von CD56 tragen somit zwar einen Teil zur Charakterisierung bei, sind in ihrer Aussagekraft jedoch mit Vorbehalt zu bewerten, da ohne weitere Untersuchungen bezüglich der Zellherkunft die Aussagekraft dieser Ergebnisse beschränkt ist. Ebenso verhält es sich mit einem weiteren Marker, dem NK1 oder auch CD57-like Antigen. Der Nachweis dieses Antigens ist ebenfalls nur im Zusammenhang mit weiteren immunzytologischen Ergebnissen zu werten, da es kein eindeutiger Marker ist, der eine genaue Zuordnung von Tumorzellen ermöglicht. So können feline CD3⁺ Zellen sowohl eine positive als auch eine negative Reaktion zeigen (Darbes et al., 1998). 50 % der CD3⁻ Large Granular Lymphocytes zeigten ebenfalls eine positive Reaktion mit dem NK1 (CD57-like)-Antikörper (Darbes et al., 1998). Dies widerspricht Beobachtungen beim Menschen, bei denen nur die CD3⁺/CD8⁺ Large Granular Lymphocytes eine positive Reaktion zeigten (Loughran, 1993). Daher sollte auch dieser Marker lediglich zur Charakterisierung beitragen und sein Nachweis nur unter Vorbehalt eine Zuordnung zu einer Zelllinie legitimieren (Darbes et al., 1998). Folglich lässt sich bei den S87-Zellen ein CD3⁺/CD56⁻/NK1⁻ Phänotyp festhalten. Dieser sichert eine Zuordnung zur T-Zelllinie und stellt, zumindest aufgrund des immunzytologischen Phänotyps, eine Zugehörigkeit zu den NKT-Zellen in Frage.

Zytotoxische T-Zellen unterliegen im Gegensatz zu den natürlichen Killerzellen einer MHC-Restriktion und sind daher zu einer spontanen zytotoxischen Aktivität ohne vorherige Antigen-Präsentation nicht befähigt (Zinkernagel, 1997). Diese grundsätzliche Einteilung kann so jedoch nicht ohne Einschränkungen übernommen und auf alle zytotoxischen T-Zellen übertragen werden. Zellen, die einen T-Zell-Phänotyp aufweisen und trotzdem Eigenschaften der natürlichen Killerzellen zeigen, wurden in den letzten Jahren unter verschiedenen Namen eingruppiert. In der Humanmedizin ist es bereits bestätigt, dass ein kleiner Teil der CD3-positiven Lymphozyten eines gesunden Menschen in der Lage ist, eine spontane zytotoxische Aktivität gegenüber K562 Zellen zu entwickeln und allem Anschein nach nicht der MHC-Restriktion unterliegt (Lanier et al., 1986c; Lanier und Phillips, 1986). Diese „non-MHC-restricted cytotoxicity“ ist somit nicht ausschließlich den natürlichen Killerzellen vorbehalten und prägte den Begriff der „non-MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes“ (Lanier und Phillips, 1986; Lanier et al., 1986d). Vermutet werden kann, dass dieser dort beschriebene

Zelltyp mit dem, der später unter dem Namen der NKT-Zellen bekannt gewordenen ist, weitestgehend übereinstimmt, da diese Zellen ebenfalls CD3⁺ und CD56⁺ waren (Lanier und Phillips, 1986).

Die NKT-Zellen, natürliche Killer T-Zellen zeigen einerseits die Merkmale der natürlichen Killerzellen, andererseits die der zytotoxischen T-Zellen (Makino et al., 1995). Laut der derzeitigen Definition zählen Zellen zu den natürlichen Killer T-Zellen, die NK-Zellmarker exprimieren (beispielsweise NK1.1; bei Mäusen nur eingeschränkt), einer CD1d-Restriktion unterliegen und einen α/β -T-Zell-Rezeptor rearrangieren (Bendelac et al., 2007). Neoplastische Veränderungen, die auf NKT-Zellen zurückgehen, sind selten und werden beim Menschen als sehr aggressiv eingestuft (Macon et al., 1996). Bei ihnen finden sich häufig chromosomale Abnormitäten, wie es auch bei der untersuchten Zelllinie der Fall war (Macon et al., 1996).

Bei der Katze konnte ein funktionelles CD1d-Gen sequenziert werden, daher kann auf ein funktionierendes NKT/CD1d-System rückgeschlossen werden. Jedoch ist die Existenz der NKT-Zellen entsprechend der genannten Definition, anders als beim Pferd oder beim Schwein, bis jetzt noch nicht eindeutig nachgewiesen (Looringh van Beeck et al., 2009) . Mit den genannten Erkenntnissen über die NKT-Zellen lassen sich Parallelen zwischen diesem Zelltyp und der untersuchten Zelllinie ziehen. So weisen die Zellen ein T-Zell-Rezeptor-Rearrangement sowie eine CD3-Expression auf, sind mittels der üblichen Methoden zum Nachweis von Antigenen CD4 und CD8 doppelt negativ und zur spontanen Zellyse befähigt. Mit der Einschränkung, dass Tumorzellen ihre Eigenschaften häufig verändern und Fähigkeiten und immunologische Charakteristika verlieren oder dazu gewinnen, kann bei der untersuchten Zelllinie auf Grund der spontanen zytotoxischen Aktivität, die für T-Zellen ungewöhnlich ist, eine Zugehörigkeit zu den NKT-Zellen vermutet werden. Was jedoch die Eingruppierung eher unwahrscheinlich macht, ist die Tatsache, dass die Zellen keinen natürlichen Killerzellen-Marker exprimieren (s.o.).

Abschließend lässt sich somit festhalten, dass es sich bei der S87-Zelllinie um Large Granular Lymphocytes handelt, die ein T-Zell-Rezeptor-Rearrangement und eine CD3-Expression zeigten und somit den T-Zellen zuzuordnen sind. Auffällig ist die Eigenschaft der spontanen zytotoxischen Aktivität der Zellen. Eine Zuordnung zu den NKT-Zellen nur aufgrund dieser Eigenschaft sollte jedoch nicht erfolgen, da es keine weiteren Hinweise, wie die Expression von für natürliche Killerzellen typischen Antigenen, gibt. Zusammenfassend handelt es sich

bei S87 somit um nicht MHC-restriktive zytotoxische T-Zellen mit der Fähigkeit zur spontanen Zelllyse.

Für die immunzytologische Detektion von B-Zellen bei der Katze finden sich in der Literatur, je nach Autor, verschiedene Angaben. Eine Option ist der gegen CD45R (B220) gerichtete Antikörper. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase, die auf verschiedenen Blutzellen exprimiert wird. Es gibt verschiedene Isoformen, die sich zumeist auf einen Zelltyp beschränken und deshalb als spezifische Antigene zum Nachweis eines Zelltyps verwendet werden. In der Routinediagnostik dient der monoklonale Antikörper gegen das CD45R-Antigen (B220) der Maus (Klon RA3-6B2) auch im FFPE-Material zur Differenzierung zwischen B- und T-Zellen (Coffman und Weissman, 1981a; Köhler, 2003; Monteith et al., 1996). Zwar gilt dieser Marker als sehr spezifisch für feline B-Zellen, dennoch konnten in einer vergleichenden Studie mit verschiedenen B-Zell-Markern festgestellt werden, dass ein geringer Anteil der T-Zellen (0,1 %) ebenfalls markiert wurde (Monteith et al., 1996). Da die untersuchten Zellen in der Immunzytologie positiv für diesen Marker waren, wurden zwei weitere B-Zell-Marker (BLA.36 und CD79 α) eingesetzt, um das positive CD45R-Signal weiter interpretieren zu können. BLA.36 ist ein Antikörper gegen das humane B-Lymphozyten-Antigen 36 und wird von vielen Autoren auch bei der Katze als nützlicher B-Zellmarker angesehen (Darbes et al., 1998; Day et al., 1999; Della Croce et al., 1991; Pohlman et al., 2009; Steele et al., 1997; Walton und Hendrick, 2001). Bei der immunzytologischen Untersuchung mit diesem Marker zeigte sich keinerlei Reaktion, ebenso wie bei dem dritten Marker CD79 α , der ebenfalls in einigen Studien als B-Zellmarker für die Katze verwendet wurde (Mochizuki et al., 2011; Valentine et al., 2000; Walton und Hendrick, 2001; Waly et al., 2005). Da die beiden anderen B-Zell-Marker negativ waren, molekularbiologisch kein B-Zell-Rezeptor-Rearrangement nachgewiesen werden konnte und auch das auffälligste morphologische Kriterium, die Granula, nicht zu Zellen der B-Zelllinie passten, wurden die Zellen weiterhin als T-Zellen eingestuft.

Eine CD45R (B220)-Expression von Large Granular Lymphocytes wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Sowohl NK1.1-positive Zellen (Ballas und Rasmussen, 1990), als auch T-Zellen sind in der Lage, beispielsweise nach Stimulation mit Interleukin 2, B220 zu exprimieren (Coffman und Weissman, 1981a; Cron et al., 1989; Koyasu, 1994; Zanker et al., 2013). Interessanterweise kam es bei sehr hohen Konzentrationen von Interleukin 2 zur Induktion der Apoptose dieser T-Zellen, welche dann eine Expression von B220 zeigten (Zanker et al., 2013). Die Expression von B220 bei T-Zellen gesunder Individuen konnte kurz

bevor die Zellen in Apoptose gingen beobachtet werden (Renno et al., 1998). Bereits 1982 wurde bei Mäusen mit gestörter Apoptosefunktion, die ein mutiertes *lpr* (lymphoproliferation) Gen hatten, welches für den Fas-Rezeptor (auch CD95 oder APO-1 genannt) kodiert, eine stark proliferierende T-Zellpopulation identifiziert, die sowohl T-Zell- als auch B-Zelloberflächenmarker exprimiert (Morse et al., 1982; Nagata, 1994). Durch die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor kommt es zur Induktion der Apoptose. Ist dieser Apoptoseweg gestört, zum Beispiel durch eine Mutation, kommt es zu einer Akkumulation von B220-positiven T-Zellen (Renno et al., 1998). Dies konnte sowohl bei Mäusen mit defekten Fas-Rezeptoren (*lpr*) als auch mit defekten Fas-Liganden (*gld*) nachgewiesen werden (Takahashi et al., 1994; Watanabe-Fukunaga et al., 1992).

In einer Studie an Menschen (Bleesing et al., 2003) befassten sich die Autoren mit der Expression eines Epitops, welches mit einem B220-spezifischen monoklonalen Antikörper auf T-Zellen von Patienten mit einer Large Granular Lymphocyte-Leukämie nachgewiesen werden konnte. Man stellte fest, dass im Median bei diesen Patienten 66,8 % der T-Zellen sowohl CD8 als auch B220 exprimierten (Bleesing et al., 2003). Eine gleichzeitige Expression von CD57 konnte zum Teil ebenfalls bei diesen Zellen beobachtet werden. Dabei nutzten die Autoren den gleichen Antikörperklon (RA3-6B2), der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Dieser bindet nicht an andere CD45-Isoformen (Bleesing et al., 2001).

Im Gegensatz dazu wurde in einer weiteren Studie nur bei 3,9 % der T-Zellen von gesunden Menschen eine B220-Expression bei gleichzeitiger CD8-Expression festgestellt (Bleesing et al., 2001). Interessant war zudem, dass eine B220-Expression bei CD8⁺-T-Zellen eng mit einer nicht der MHC-Restriktion unterliegenden Zytotoxizität in Zusammenhang stand (Ballas und Rasmussen, 1990). Dies bedeutet, dass eine Expression von B220 bei T-Zellen auf die Fähigkeit der spontanen Zytotoxizität ohne MHC-Restriktion hindeuten kann (Ballas und Rasmussen, 1990). Auffallend war der Anteil der B220-positiven T-Zellen, vor allem bei Menschen, die an einer T-Zell-Leukämie oder am sogenannten autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) erkrankt waren. Durch Untersuchungen an Patienten mit ALPS, bei denen durch einen Gendefekt der Fas-medierte Apoptoseweg beeinträchtigt ist, konnte festgestellt werden, dass bei diesen Menschen der Anteil an B220-exprimierenden T-Zellen deutlich erhöht war (Bleesing et al., 2001). Bei diesen Patienten stellte man einen vermehrten Anteil an CD4⁻/CD8⁻-T-Lymphozyten fest (10,4 %) (Bleesing et al., 2001). Im Gegensatz dazu betrug der Anteil der CD4⁻/CD8⁻-T-Lymphozyten bei gesunden Menschen

nur 0,7 %. Die doppelt negativen T-Zellen der ALPS-Patienten zeigten in 89 % ebenfalls eine B220 Expression. Bei den gesunden Kontrollpatienten waren es nur 22 %.

Zusammenfassend gab es bei dieser Erkrankungsform, die zwar nicht neoplastischer Genese ist, jedoch ebenfalls eine gesteigerte Anzahl an T-Zellen aufweist, einen deutlich vermehrten Anteil an $CD4^-/CD8^-/B220^+$ -T-Lymphozyten. Bringt man diese Forschungsergebnisse zusammen, so kann festgehalten werden, dass eine B220-Expression bei T-Zellen auftritt, kurz bevor sie in Apoptose gehen. Kommt es zu einer Störung der Apoptose, beispielsweise durch einen mutierten Fas-Rezeptor, gibt es eine deutliche Akkumulation von $B220^+$ -T-Zellen, die durch eine neoplastische Veränderung oder durch ein Krankheitsbild wie dem ALPS klinisch in Erscheinung treten können. Dass eine Mutation von Fas als eine Ursache für die Entstehung von NK/T-Zell- und Non-Hodgkin-Lymphomen in Frage kommt, wurde beim Menschen bereits nachgewiesen (Gronbaek et al., 1998; Takakuwa et al., 2002). Inwieweit die Expression von B220 bei den S87-Zellen auf eine eventuelle, den Apoptoseweg beeinflussende Mutation des Fas-Rezeptors hindeutet, liegt außerhalb des Rahmens dieser Arbeit, könnte jedoch Ziel weiterer Studien sein. Eine ungewöhnliche CD45R-Expression als Folge der chromosomalen Instabilität kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

5.3 Interpretation der Wachstumseigenschaften

Bei Betrachtung der Wachstumskurve fällt auf, dass diese bis zum vierten Tag eine deutliche Steigung zeigte, jedoch ab dem vierten Tag ein kurzfristiger Rückgang der Zellzahl zu registrieren war. Daran schloss sich ab dem achten Tag wieder eine Phase der deutlichen Steigerung des Wachstums an, welches ab dem zehnten Tag auf ein flacheres Niveau, in eine Plateauphase, überging. Dies ist ein eher untypischer Verlauf der Wachstumskurve von Tumorzellen, da diese sich zumeist in einer S-förmigen Form darstellen und die Wachstumskurve nicht abfällt, sondern nach einer Steigung direkt in eine Plateauphase übergeht, in der die Zellzahl relativ konstant bleibt. Allem Anschein nach zeigen die S87-Zellen im Wachstumsverlauf eine Art Krise, in der mehr Zellen absterben, als über Vermehrung nachgebildet werden. Der gleiche Wachstumsverlauf ließ sich auch bei den Studien zur Stimulation mit verschiedenen Mitogenen und dem Nachweis mit Hilfe des MTT-Tests bestätigen, wodurch ein zufälliges Auftreten dieses Phänomens eher unwahrscheinlich ist.

Die Kenntnis dieses „Wachstumstiefs“ ist essentiell, um bei Versuchen mit Berücksichtigung der Zellzahl keine Fehlinterpretationen zu riskieren. Daher wurden für Versuche, wie die zur Bestimmung der Zytotoxizität oder der Stimulation mit Mitogenen, stets frisch passagierte Zellen genutzt, die sich dementsprechend in der Phase des starken Wachstums am Anfang befanden. Ebenfalls wurde bei der Zelllinie darauf geachtet, dass auch beim Einfrieren nur Zellen aus dieser Wachstumsphase verwendet wurden. Vorteilhaft war dies auch bei der Präparation der Metaphaseplatten, da zu diesem Zeitpunkt aufgrund der hohen Teilungsaktivität der Zellen eine zahlenmäßig größere Ausbeute an brauchbaren Metaphaseplatten gefunden werden konnte.

5.4 Spontane zytotoxische Aktivität

Für die Untersuchungen zur spontanen zytotoxischen Aktivität wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um die Versuchsansätze zu optimieren. Bei den Folgeversuchen wurde der MTT-Test dem RBA vorgezogen, da beim RBA zwei Waschschriffe erfolgen müssen, während beim MTT-Test mit nur einem erforderlichen Waschschriff das Risiko, dass nicht-lysierte Zellen herausgespült werden, geringer ist.

Aufgrund der Beschreibung von Vero-Zellen als unsensible Zellen für die spontane zytotoxische Aktivität von NK-Zellen beim Hund fanden diese Anwendung als Negativkontrolle (Funk et al., 2003). Andere Autoren beschreiben jedoch, dass sie bei der Verwendung von Vero-Zellen als Negativkontrolle ebenfalls eine spontane zytotoxische Aktivität von über 10 % feststellen konnten (Gondolf, 1994; Schömig, 2008). Beim Menschen konnten sogar Werte über 20 % festgestellt werden (Nagy und Mandi, 1998). Schwierig ist der Vergleich mit den bei der Analyse der S87-Zellen gewonnenen Werten, da für die Katze keine Vergleichswerte zur Verfügung stehen. In den Untersuchungen zur zytotoxischen Aktivität der S87-Zellen gegenüber den Vero-Zellen konnten deutlich höhere Werte (70 %) bei der Bestimmung der spontanen zytotoxischen Aktivität dokumentiert werden, als dieses bei anderen Autoren und anderen Spezies der Fall war. Zudem lagen die Werte noch über denen, die bei der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber den CTAC-Zellen gemessen wurden. Bei den Versuchen mit CTAC-Zellen konnte festgestellt werden, dass sich das Zielzellen/Effektorzellenverhältnis umgekehrt proportional zur zytotoxischen Aktivität verhielt. Diese stieg parallel um rund zehn Prozentpunkte an, wenn das Verhältnis der Zielzellen zu Effektorzellen in Zehnerschritten abnahm. Dieses Phänomen ließ sich bis zu einem Verhältnis von 1:50 beobachten. Beim Verhältnis Zielzellen/Effektorzellenverhältnis

von 1:100 lag die zytotoxische Aktivität mit 67 % jedoch ebenfalls nur zehn Prozentpunkte höher als bei einem Verhältnis von 1:50. Dies könnte daran liegen, dass ab einem gewissen Verhältnis die Kultur mit Effektorzellen übersättigt war.

Im Gegensatz zum Einsatz der Zellen konnte bei den Versuchen, bei denen der zellfreie Überstand eingesetzt wurde, eine negative zytotoxische Aktivität registriert werden. Dies bedeutet, dass das Zellwachstum der Zielzellen, die mit dem Überstand inkubiert wurden, größer war als bei den Kontrollzellen. Durch den Überstand wurden somit keine Zellen lysiert, sondern es konnte eine gesteigerte Stoffwechselaktivität registriert werden. Dies kann zum einen als eine erhöhte Proliferation oder zum anderen als gesunkene Apoptoserate gedeutet werden. Dieses Ergebnis lässt sich dahingehend interpretieren, dass die spontane zytotoxische Aktivität tatsächlich von den Zellen selber ausgeht und durch den direkten Zell-zu-Zell-Kontakt entsteht und nicht durch möglicherweise in die Peripherie abgegebene Botenstoffe, wie es von Duke et al. (1986) postuliert wurde. Diese zur Zelllyse führenden Substanzen (NKCF) führten zur DNS-Fragmentation der Zielzellen. Solche Beobachtungen konnten bei kaninen natürlichen Killerzellen gemacht werden, deren Überstand zu einem zytotoxischen Effekt führte (Nakada et al., 1996). Zu berücksichtigen gilt hierbei jedoch, dass diese Stoffe erst nach Co-Inkubation mit den Zielzellen frei wurden und nicht per se im Überstand enthalten sein mussten (Nakada et al., 1996). Jedoch scheint es so zu sein, dass die Abgabe der NKCF nur einen geringen Anteil des Abwehrprogramms der natürlichen Killerzellen ausmacht (Herberman et al., 1986). In Versuchen mit NK-Zellen des Hundes konnte jedoch auch bei in anfänglicher Anwesenheit von Zielzellen inkubierten Effektorzellen beim zellfreien Überstand keine zytotoxische Aktivität registriert werden (Schömig, 2008). Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die bei der untersuchten S87-Zelllinie gemacht werden konnten. Vielmehr scheint die Ausbildung von Zellfortsätzen, die zu einem direkten Kontakt der Zielzellen mit den Effektorzellen führen, ein entscheidendes Kriterium darzustellen. So konnte in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von kaninen natürlichen Killerzellen die Ausbildung von Zellfortsätzen beobachtet werden, welche den direkten Kontakt der beiden Zellarten ermöglichten (Nariai Nakada et al., 1999; Schmitz, 2000). Hinweise auf diesen für die Zelllyse benötigten direkten Zell-zu-Zell-Kontakt lieferten auch die im Giemsa-gefärbten Zytopinpräparat zu beobachteten Anlagerungen der S87-Zellen an die CTAC-Zellen, was auch als Rosettenformation bezeichnet wird und bei kaninen natürlichen Killerzellen bereits beobachtet werden konnte (Knapp et al., 1993; Schmitz et al., 2003). Ein direkter Vergleich der angeführten bisherigen Forschungsergebnisse mit denen der S87-Zelllinie ist jedoch schwierig, da es einerseits wenige Daten über

Untersuchungen bei der Katze gibt und sich zum anderen die Untersuchungen hauptsächlich auf natürliche Killerzellen ohne CD3-Expressionsmuster beziehen. In einer neueren Studie konnte bei feline NKT-Zellen ($CD3^+/CD56^+$) ebenfalls eine Zytotoxizität gegenüber der Crandell feline kidney (CRFK) cell line registriert werden, welche jedoch mit anderen Methoden nachgewiesen wurde und daher einen direkten Vergleich nicht möglich macht (Vermeulen et al., 2012). Insgesamt konnte in dieser Studie bei der Katze jedoch festgestellt werden, dass die zytotoxische Aktivität von NKT-Zellen aus dem Blut und den Lymphknoten ($CD3^+/CD56^+$) in etwa derjenigen der NK-Zellen ($CD3^+/CD56^+$) entspricht (Vermeulen et al., 2012).

5.5 Eigenschaften in Kultur

Die untersuchte Zelllinie wurde fast zwei Jahre permanent in Kultur gehalten und über 90 mal passagiert. Damit sind die Kriterien für eine permanente Zelllinie erfüllt (Drexler und MacLeod, 2003). Die in der Zellkultur beobachtete Cluster-Bildung spiegelt das Bedürfnis der Zellen nach Zellkontakt zu anderen Zellen wider, was sowohl im Giemsa-gefärbten Präparat als auch bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen festgestellt wurde. Diese Eigenschaft könnte mit ein Grund dafür sein, dass sich die vereinzelt Zellen bzw. Gruppen von weniger als 20 Zellen trotz verschiedenster Versuchsansätze nicht vermehrten. Die ursprüngliche Hypothese, dass jede Zelle von Wachstumsstoffen anderer Zellen abhängig ist und sich deshalb bei Einzelzellen kein Wachstum beobachten lässt, konnte dagegen widerlegt werden. Denn obwohl die Verwendung eines Transwell[®]-Einsatzes einen Austausch von Wachstumsstoffen ermöglichte, führte dies trotzdem nicht zu einer Vermehrung der Einzelzellen. Dass die Klonierungseffizienz von Tumorzellen schlechter sein kann als die der nicht tumorös entarteten Vergleichszellen, wurde bei feline Fibrosarkomzellen bereits beschrieben (von Erichsen et al., 2012). Bei einigen Ansätzen konnte zunächst eine Vermehrung der Zellen registriert werden, auch wenn die Anfangszahl < 20 Zellen lag. Da diese sich jedoch nicht weiter vermehrten liegt der Schluss nahe, dass bei der Bestimmung der Anfangszellzahl eine zu niedrige Zellzahl gezählt worden war, da einzelne Zellen übereinander lagen oder sich in einer anderen Ebene befanden und die höhere Zellzahl keine Vermehrung sondern einen Fehler in der Auswertung darstellt.

Bei der Stimulation der Zellen mit verschiedenen Stoffen konnte ein ähnliches Wachstumsverhalten bei allen Versuchsansätzen registriert werden, sowohl bei denen der Kontrollen als auch bei denen mit stimulierten Zellen. Interleukin 2, welches zunächst als T-

Zell-Wachstumsfaktor (T-Cell Growth Factor, TCGF) bekannt wurde und erst 1979 zu seinem heutigen Namen kam (Arden et al., 1979), wird von T-Zellen nach Stimulation mit Mitogenen, wie zum Beispiel Concanavalin A, oder Antigenkontakt sowohl beim Menschen als auch bei der Katze gebildet (Morgan et al., 1976; Smith, 1980; Tompkins et al., 1987). Dabei stehen vor allem die T_H1-Zellen im Vordergrund, andere Zellen wie die zytotoxischen T-Zellen sind jedoch ebenfalls dazu in der Lage, nach Stimulation Interleukin 2 freizusetzen (Mosmann et al., 1986). Interleukin 2 fördert sowohl die Proliferation von T-Lymphozyten (Ruscetti et al., 1977; Smith, 1980) als auch von natürlichen Killerzellen (London et al., 1986; Timonen et al., 1982; Trinchieri und Perussia, 1984). Auch die Proliferation von NKT-Zellen kann durch Interleukin 2 gefördert werden, wobei festgestellt werden konnte, dass die CD4⁺/CD8⁻-NKT-Zellen am besten, gefolgt von den CD4⁻/CD8⁻-NKT-Zellen auf die Stimulation ansprechen (Lin et al., 2004). Zusammenfassend sprechen somit alle zu den Large Granular Lymphocytes gehörenden Zellpopulationen auf die Stimulation mit Interleukin 2 an, was auch den Ergebnissen der Untersuchungen der S87-Zellen entsprach. Concanavalin A ist ein schon sehr lange bekanntes Mitogen, das in der Lage ist, die Proliferation von T-Lymphozyten zu steigern (Stobo et al., 1972). Es wurde unter anderem dafür verwendet, Zellen zu „aktivieren“, um entsprechende Reaktionen, wie sie beispielsweise bei einem Antigenkontakt entstehen, hervorrufen zu können (Smith, 1980). Dies ist auch der Grund, warum bei den S87-Zellen versucht wurde, mit Hilfe einer vorherigen Stimulation mit Concanavalin A eine Veränderung des immunologischen Phänotyps hinsichtlich der Expression von CD4 und CD8 hervorzurufen, was bei den Versuchen jedoch nicht bestätigt werden konnte. Auffallend ist, dass die beste Stimulation durch eine gleichteilige Mischung aus konditioniertem Medium und dem 20 % FCS enthaltenen Medium herbeigeführt werden konnte. Eine Erklärung dafür ist, dass die von den Zellen selbst produzierten Zytokine und Botenstoffe in dieser Kombination für die Zellen am besten wirken und künstliche Stimulantien nicht die optimale Förderung der Proliferation ermöglichen.

Dieser Effekt scheint sich jedoch nicht nur auf die LGL-Zellen selber auszuwirken, sondern durch den Überstand konnte bei den Versuchen zur Überprüfung der Zytotoxizität ein verbessertes Zellwachstum auch bei den CTAC-Zellen und bei den Vero-Zellen beobachtet werden. Dass konditioniertes Medium bei einer Vielzahl von Zellen das Wachstumsmuster positiv beeinflusst, ist schon seit vielen Jahren bekannt (Bradley und Sumner, 1968; Iscove et al., 1971)

5.6 Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität ist bei den verschiedensten neoplastischen Veränderungen zu beobachten und äußert sich häufig in numerischen Chromosomenaberrationen (siehe Literaturübersicht). Zur Diagnose von numerischen Aberrationen müssen die Metaphaseplatten so ausgewählt werden, dass sie möglichst gut gespreitet sind und sich die Chromosomen nicht gegenseitig überlagern oder von noch intakten Zellkernen überlagert werden. Da solche optimalen Metaphaseplatten eher selten sind, wurde die Chromosomenpräparation in der Phase des besten Wachstums (zumeist zwei Tage nach einer Passage) durchgeführt. Dadurch wurde eine bestmögliche Ausbeute gewährleistet.

5.6.1 Chromosomale Stabilität von PBMC

Bei 93 % der stimulierten Kontrollzellen (PBMC) konnte ein regulärer, euploider Chromosomensatz ($2n=38$) detektiert werden. 5 % der Zellen wiesen einen hypoploiden Chromosomensatz. Bei 2 % konnte ein hyperploider Chromosomensatz verzeichnet werden. Diese Beobachtungen sind wahrscheinlich durch Präparationsartefakte im letzten Schritt der Chromosomenpräparation zu erklären (Barch, 1991; Henegariu et al., 2001). Bei diesem Schritt werden die Zellen aus einiger Entfernung auf einen Objektträger aufgetropft, damit die Zellen aufplatzen und die Metaphaseplatten frei werden. Dabei kann es zum Abschwemmen von einzelnen Chromosomen oder sogar zum Zerreißen einer ganzen Metaphaseplatte kommen. Schwimmen nur einzelne Chromosomen ab, lässt sich dies nicht von einem hypoploiden Chromosomensatz unterscheiden. Falls diese abgeschwemmten Chromosomen in die Nähe einer anderen Metaphaseplatte gezogen werden, wird bei dieser ein pseudohyperploiden Chromosomensatz diagnostiziert werden. Insgesamt zeigten 7 % der PBMC einen aneuploiden Chromosomensatz. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde bei den Metaphaseplattenuntersuchungen von einem Präparationsartefakt von 7 % ausgegangen. Dies entspricht den Werten, die in der Literatur auch für andere feline Kontrollzellen angegeben werden (Grindem und Buoen, 1989; Miki et al., 2004; von Erichsen et al., 2012). Da deutlich mehr als 7 % der untersuchten Metaphaseplatten von S87 eine Aneuploidie aufwiesen, ist bei diesen Veränderungen jedoch von einer realen numerischen Chromosomenaberration auszugehen und nicht von einem Artefakt.

5.6.2 Chromosomale Instabilität von S87

Eine Zeitlang wurde ein direkter Zusammenhang zwischen einer FeLV-Infektion und einer Aneuploidie angenommen. So konnten in FeLV-positiven Katzen ohne neoplastische Veränderungen numerische Chromosomenaberrationen gefunden werden (Grindem und Buen, 1989). In späteren Studien war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen FeLV-induzierten und FeLV-negativen Lymphomen im Hinblick auf Aneuploidie nachweisbar (Gulino, 1992). Als pseudodiploid werden solche Metaphaseplatten bezeichnet, die zwar eine physiologische Chromosomenanzahl aufweisen, aber nicht diploid sind und deren Karyogramm somit nicht vollständig und korrekt ist. Diese Veränderung wird nur dann auffällig, wenn von den Chromosomen ein Karyogramm angefertigt wird. Ein pseudodiploider Chromosomensatz konnte bei den Zellen mit 38 Chromosomen aus Passage 10 in 100 % der Fälle diagnostiziert werden. Kein Karyogramm wies einen vollständigen und korrekten Chromosomensatz auf. Dass bei felines Lymphomzellen trotz korrekter Chromosomenanzahl Monosomien, Trisomien oder der Verlust von ganzen Chromosomenpaaren vorkommen kann, wurde auch schon bei anderen felines Lymphomzelllinien festgestellt (Gulino, 1992). Weiterhin auffällig ist, dass sich der Karyotyp der S87-Zellen von Passage 10 zu Passage 80 hin veränderte und signifikante Unterschiede aufwies. Zwar war den Zellen in beiden Passagen gemeinsam, dass signifikante Unterschiede in ihrer Chromosomenzahl gegenüber der Chromosomenanzahl der Kontrollzellen auftraten, allerdings waren die Zellen der frühen Passage häufig pseudodiploid oder wiesen lediglich ein Chromosom zu viel auf. In der späteren Passage veränderten sich die Ergebnisse dahingehend, dass deutlich mehr Chromosomensätze mit 40 Chromosomen auftraten und weniger diploide bzw. pseudodiploide festgestellt wurden.

Als Ursache für den unsteten Karyotyp der untersuchten Zelllinie können verschiedene Hypothesen diskutiert werden. So ist eine Erklärung, dass die Tumorzelllinie nicht auf eine einzelne Zelle zurück geht, sondern auf mehrere, genetisch unterschiedliche Zellen. Wenn jede dieser „Ursprungszellen“ ihre eigene genetische Information an die Tochterzelle weitergäbe, könnte dies eine Erklärung für die heterogene Chromosomenverteilung sein. Dies widerspricht jedoch der allgemeingültigen somatischen Mutationstheorie, die besagt, dass alle Tumorzellen Nachkommen einer Ursprungstumorzelle sind, in der eine oder mehrere irreversible somatische Mutationen stattgefunden haben, was letztendlich zu einer klonalen Tumorzellpopulation führt (Knudson, 1985). Durch die Etablierung einer monoklonalen Zelllinie ließe sich diese Hypothese verifizieren. Das ist jedoch nicht möglich, da die Zellen trotz verschiedenster Versuchsansätze keine Vermehrung nach Vereinzelung zeigten. Als

unwahrscheinlich erscheint die Verifizierung der Hypothese auch dadurch, dass sich keine eindeutigen, voneinander abtrennbare Karyotypen zeigten, die auf eine definierte Gruppe an Ursprungszellen zurückzuführen wären. Zwar divergierten die Karyotypen sowohl innerhalb der einzelnen Zellpassagen als auch zwischen den Passagen, jedoch gab es auch einige Gemeinsamkeiten: Kein Karyogramm wies eine Veränderung der Gonosomen auf. Zudem war bei 90 % der Karyogramme beider Passagen eine Häufung an Veränderungen in Gruppe C zu verzeichnen, die sich zumeist durch ein oder zwei zusätzliche Chromosomen auszeichnete. Diese wiesen häufig eine gut erkennbare Bänderung auf. Diese Abweichung kam deutlich häufiger vor, als es in den anderen Gruppen der Fall war. Die wahrscheinliche Erklärung dieser chromosomalen Heterogenität ist, dass die feline Large Granular Lymphocyte-Lymphomzelllinie ein instabiles Genom aufweist und dass durch Fehlverteilung der Chromosomen bei der Zellteilung ständig voneinander divergierende Chromosomensätze entstehen. Dies wiederum könnte ein weiterer Faktor für die fehlende Proliferation der Einzelzellen sein, da je nach genetischer Ausstattung nicht jede Zelle in der Lage ist, sich teilen zu können und zu proliferieren. Zudem kann je nach Weitergabe der genetischen Eigenschaften der Mutterzelle an eine Tochterzelle diese nicht mehr zur Proliferation und Vermehrung in der Lage sein. Als weiterer Hinweis auf eine monoklonale Zellpopulation kann das molekularbiologisch nachgewiesene einheitliche T-Zell-Rezeptor-Rearrangement gewertet werden.

Da der Anteil der hypodiploiden Karyogramme in Passage 10 mit 8,5 % jedoch relativ dicht an dem der Werte für die Präparationsartefakte lag, ist in diesem Fall eher davon auszugehen, dass es sich bei den hypodiploiden Chromosomensätzen um einen Artefakt handelt. Da bei den Karyogrammen in Passage 80 auffallend wenige hypodiploide Chromosomensätze auftraten, kann vermutet werden, dass bei der Fehlerquote von ungefähr 7 % der Karyotypen ein hyperploider Chromosomensatz vorlag und dieser durch Abschwemmen von einzelnen Chromosomen zu einem pseudodiploiden wurde.

Dass die Chromosomenanzahl innerhalb einer Passage divergiert, ist bei mehreren feline Zelllinien beschrieben. So kann die Chromosomenanzahl innerhalb einer Fibrosarkom-Zelllinie und einer Passage um bis zu 120 Chromosomen variieren (von Erichsen et al., 2012), bei den Lymphomzelllinien liegt die Spanne zumeist jedoch ähnlich wie bei S87 in einem deutlich kleineren Bereich (Miki et al., 2004). Feline Lymphomzelllinien zeigen häufig hypoploide, pseudodiploide und hyperploide Chromosomensätze (Gulino, 1992; Miki et al., 2004). Dabei traten besonders häufig Monosomien und Trisomien in Gruppe B und Gruppe E

auf, was sich nur teilweise mit den bei S87 festgestellten Veränderungen vereinbaren lässt (Gulino, 1992). Selten fanden sich dagegen bei den anderen untersuchten Zelllinien Veränderungen in Gruppe C (Gulino, 1992). Abweichend davon waren jedoch in dieser Gruppe C bei S87 die meisten Auffälligkeiten zu verzeichnen. Aufgrund der geringen Anzahl an karyotypisierten feline Lymphomzelllinien ist es jedoch schwierig, eine einheitliche Linie zu erkennen und diese zu interpretieren.

5.7 Zentrosomenhyperamplifikation

Mittlerweile ist es 100 Jahre her, seit Boveri (1914) einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der Zentrosomen und der Entstehung von Tumoren erkannte. Zentrosomen spielen als Mikrotubuli-organisierende Zentren eine bedeutende Rolle im Aufbau des Spindelapparates und können daher eine Schlüsselrolle in der Multi-Step-Tumorgenese darstellen. Zentrosomenhyperamplifikationen sind in physiologischem Gewebe nicht zu beobachten und der Grad der Zentrosomendefekte bzw. -aberrationen korreliert signifikant mit der chromosomalen Instabilität der Tumorzellen (Lingle et al., 2002; Pihan et al., 1998). Sowohl bei Menschen als auch bei Hunden konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl oder strukturellen Veränderungen der Zentrosomen und der Entstehung von Neoplasien nachgewiesen werden (Lingle et al., 2002; Lingle et al., 1998; Nigg, 2002; Pihan et al., 1998; Setoguchi et al., 2001a). Bei der Untersuchung von fünf feline Lymphomzelllinien hinsichtlich ihrer Zentrosomenausstattung wurde eine Korrelation zwischen der Zentrosomenamplifikation und der chromosomalen Instabilität festgestellt (Miki et al., 2004). Aufgrund dessen wurde von den Autoren postuliert, dass der methodisch einfachere Nachweis einer Zentrosomenhyperamplifikation eine vorteilhafte Alternative zur aufwändigen Chromosomenpräparation darstellt (Miki et al., 2004). Andere Studien an feline Fibrosarkomzelllinien, die eine deutliche chromosomale Instabilität aufwiesen, konnten diese Hypothese jedoch widerlegen, da keine Korrelation zwischen einer Zentrosomenhyperamplifikation und einer chromosomalen Instabilität festgestellt werden konnte (von Erichsen et al., 2012). Bei der Untersuchung der Zentrosomenausstattung von S87 konnte die von Chiba et al. (2000) postulierte Hypothese, dass sich eine zu Anfang zu beobachtende Zentrosomenhyperamplifikation im Laufe der Zeit durch negative Selektion in den Bereich einer physiologischen Zentrosomenanzahl verschiebt, nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, betrug zu Anfang der Anteil der Zellen, die eine unphysiologische Zentrosomenanzahl (≥ 3) zeigten, lediglich 14 %. Bei den nicht neoplastischen Kontrollzellen

(PMBC) ergab sich eine Zentrosomenhyperamplifikation nur in 4 % der Zellen, also muss zusätzlich noch von dieser Prozentzahl als Artefakt ausgegangen werden. Bei der späteren Passage (80) konnte eine Zentrosomenhyperamplifikation in 30 % der S87-Zellen registriert werden. Dies ist mehr als doppelt so viel wie in Passage 10. Infolgedessen war der Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den S87-Zellen aus Passage 10 signifikant, der Unterschied zwischen PBMC und den Zellen aus Passage 80 ebenfalls. Daher deutet die höhere Anzahl von Zellen mit Zentrosomenhyperamplifikation darauf hin, dass im Falle von S87 keine negative Selektion hinsichtlich zu hoher Zentrosomenzahl in diesen Zellen erfolgte.

Auffallend ist, dass der Anteil der Zellen mit nur einem Zentrosom bei den S87-Zellen deutlich unter dem der Kontrollzellen lag. Da zwei Zentrosomen nur während der Mitose auftreten, lässt sich daraus auf eine hohe Mitose- und Proliferationsrate rückschließen. Passend dazu war auch der immunzytologische Nachweis von PCNA und Ki-67, beides Proliferationsmarker, die ebenfalls Hinweise auf eine deutlich verstärkte Proliferation der S87-Zellen lieferten.

Die Untersuchungen von S87 konnten die von Miki et al. (2004) beschriebenen Ergebnisse dahin gehend bestätigen, dass eine Assoziation zwischen einer chromosomalen Instabilität und einer Zentrosomenhyperamplifikation vorliegt. Jedoch ist die in der Studie hervorgehobene Praktikabilität des Nachweises der Zentrosomenhyperamplifikation gegenüber der Auswertung von Metaphaseplatten kritisch zu sehen, da für die beschriebene Methode frisches Zellmaterial gebraucht wird, welches in der Routinediagnostik häufig nicht zu Verfügung steht. Andere Autoren nutzten bei Untersuchungen zur Zentrosomenhyperamplifikation beim Hund zum einen Gefriermaterial und zum anderen Paraffin-eingebettetes Material (Kaneko et al., 2005; Setoguchi et al., 2001a). In den eigenen Untersuchungen brachten die Untersuchungen an Zytozentrifugenpräparaten aufgrund der besseren Detailerkennbarkeit und des Fehlens der durch die Herstellung von FFPE-Material bedingten Schrumpfungartefakte besser auszuwertende Ergebnisse. Dennoch stellt FFPE-Material eine Alternative zur Zellkultur dar, wenn frische Zellen nicht zur Verfügung stehen.

5.8 p53-Mutationen

Aberrationen des p53-Gens sind die am häufigsten bei Mensch und Hund gefundenen Genmutationen in tumorös veränderten Geweben (siehe Literaturübersicht). Ist der „Hüter des Genoms“ defekt, kann es zur unkontrollierten Vermehrung von Zellen kommen, wodurch ein wichtiger Punkt in der Multi-Step-Tumorgenese erfüllt wird (Lane, 1992). Die p53-Sequenz der Katze weist in großen Teilen Aminosäuresequenzhomologien zum Menschen (82,1 %), zur Ratte (75,5 %) und zur Maus (74,9 %) auf (Okuda et al., 1993). Die Sequenzen, die für einige der sogenannten „mutational hot spots“ bei humanen Tumoren (Kodon 167, 241 und 266 im feline Gen entsprechen diesen) kodieren, sind identisch zu denen der Katze (Okuda et al., 1993). Keine der in den Studien und bei den Untersuchungen der S87-Zelllinie gefundenen Mutationen befand sich jedoch an einer dieser, sich durch häufige Mutationen definierten Stelle. Auffällig war allerdings, dass sowohl bei der S87-Zelllinie, als auch bei der R96-, der FT-1-, der 3201-, der MS4- und der FL74-Zelllinie an der gleichen Stelle auf Höhe des 591sten Nukleotids die identische stille Änderung der Nukleotidsequenz, einen Austausch von Cystein zu Thymin, gefunden werden konnte (Miki et al., 2004; Mochizuki et al., 2012). Dies bedeutet, dass bei 60 % der auf p53-Mutationen untersuchten feline Lymphomzelllinien an dieser Stelle eine veränderte Nukleotidsequenz gefunden werden konnte. Diese Veränderung wurde von Miki et al. (2004) als stille Mutation interpretiert. Stille Mutationen führen zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz und haben daher keine soweit reichenden Folgen, wie es beispielsweise eine Missense-Mutation oder eine Nonsense-Mutation hätte, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz bzw. zu einem vorschnellen Stoppcodon und somit zur Beendigung der Ablesung führen würde. Eine ähnliche Häufung zeigte sich im Bereich des 231sten Nukleotids, wo bei der 3201-, der KO-1-, der FL74- und der MS4-Zelllinie ein Austausch von Adenin zu Guanin ebenfalls eine stille Mutation darstellt (Miki et al., 2004; Mochizuki et al., 2012). An dieser Stelle konnte bei der S87-Zelllinie ähnlich wie bei der FT-1-, der FT-G-, der R96- und der T17-Zelllinie keine Veränderung der Nukleotidsequenz gefunden werden. In verschiedenen Studien wurde die Häufigkeit von stillen Mutationen des humanen p53 in den Fokus gerückt. In Untersuchungen lag die Inzidenz der stillen Mutationen zwischen 4 und 5 % (Lamolle et al., 2006; Strauss, 2000). Im Vergleich dazu liegt sie bei normalem Gewebe bei 0,04 % (Strauss, 1998b). Dies bedeutet, dass das Vorkommen von stillen Mutationen der p53-Sequenz bis zu 100fach höher ist als es in normalem, nicht neoplastisch veränderten Gewebe zu erwarten wäre (Strauss, 1997, 1998a). Daher kann vermutet werden, dass stille Mutationen nicht als so folgenlos zu werten sind wie es bisher der Fall war, sondern dass sie sich nicht zufällig in neoplastischen Zellen

finden und dort erhalten. Entsprechend wurden verschiedene Ursachen für die Häufung von stillen Mutationen diskutiert. Eine Theorie ist die der sogenannte „Hypermutableity“ von Tumoren, durch die es ganz allgemein durch genetische Unstabilität zu einer erhöhten Mutationsrate im Tumorgewebe kommen kann (Loeb, 1998). Jedoch konnten bei anderen Genen, wie zum Beispiel dem BRCA-1 (breast cancer type-1), keine stillen Mutationen nachgewiesen werden, was die Hypothese der „Hypermutableity“ zumindest als allgemeingültig widerlegt (Hussain und Harris, 1998). Allerdings treten stille Mutationen vermehrt in Tumorzellen auf, die bereits eine oder mehrere Mutationen aufweisen, von denen die meisten Missense-, Nonsense-Mutationen oder Deletionen darstellen, was wiederum die Annahme der „Hypermutableity“ unterstützt (Lamolle et al., 2006). Allerdings kommen stille Mutationen auch als sogenannte „singlets“, als einzige Mutation, vor (Lamolle et al., 2006). Insgesamt waren in einer Studie 80 % der im p53-Gen nachgewiesenen stillen Mutationen zufällig verteilt (Strauss, 2000). Entsprechend ordneten die Autoren diese als „neutral“ ein, ohne ihnen eine größere Bedeutung zuzumessen. Bei den restlichen 20 % in dieser Studie konnte das vermehrte Auftreten von stillen Mutationen in sogenannten „hot spots“ dokumentiert werden (Strauss, 2000). Dies untermauert die Hypothese der selektiven Mutationen, die nicht zufällig verteilt sind. Der Begriff der „hot spots“ wird allerdings je nach Autor anders definiert. So beschreibt er zum einen mehr als 100 Mutationen pro Codon (Strauss, 2000) oder aber Codons, die prozentual gesehen einen höheren Anteil an Mutationen aufweisen, als ein gegebener Schwellenwert zwischen 1 % und 2 % (Lamolle et al., 2006).

Auffällig ist, dass stille Mutationen bei Tumoren in manchen Lokalisationen (Prostata, Knochen) häufiger vorkommen als in anderen (Ösophagus, Niere) (Strauss, 2000). Dies widerlegt ebenfalls die Vorstellung, dass durch eine „Hypermutableity“ oder durch Zufall ein solches Verteilungsmuster der stillen Mutationen entsteht.

Inwieweit diese verschiedenen Hypothesen für die Katze anwendbar sind und wie viel Bedeutung der stillen Mutation zugestanden werden muss, ist schwierig abzuschätzen, da die p53-Mutationsrate bei der Katze deutlich geringer ist als bei andern Tieren und dem Menschen und dementsprechend auch ein Mangel an Vergleichswerten herrscht. Auffällig ist zumindest, dass bei den bisher untersuchten Zelllinien insgesamt über 80 % der Mutationen stille Mutationen waren. Festzuhalten ist außerdem, dass selbst bei den wenigen Vergleichswerten bei allen untersuchten feline Lymphomzelllinien eine Häufung einer stillen Mutation des 231sten Nukleotids und insbesondere des 591sten Nukleotids zu verzeichnen war (Miki et al., 2004; Mochizuki et al., 2012). Andere Autoren postulieren einen

Polymorphismus an dieser Stelle, der sowohl bei gesunden, als auch bei erkrankten Tieren auftritt, wobei in einer Studie der häufigste Genotyp TAT/TAT (Mayr et al., 1995b) und in einer anderen TAC/TAC (Nambiar et al., 2000) war. Letzter ist der Genotyp, der auch in der publizierten cDNS-Sequenz für Tyrosin kodiert (Okuda et al., 1993). Eine direkte Bedeutung für die Proteinsynthese liegt dadurch nicht vor, da beide Kodons für die gleiche Aminosäure kodieren. Fraglich ist jedoch, ob die unterschiedlichen Nukleotide hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften eine Rolle spielen. Da jedoch die TAC/TAC und TAT/TAT sowie die heterozygote Variante TAT/TAC in gesundem und neoplastisch verändertem Gewebe auftreten, ist eine Bedeutung für die Tumorgenese eher nicht anzunehmen (Mayr et al., 1995b).

Bei der zweiten Mutation handelt es sich um eine Nukleotidsequenzänderung im nicht-abgelesenen Bereich, eine Bedeutung für die Tumorgenese ist also eher unwahrscheinlich. Da andere Autoren diesen Bereich der Sequenz nicht untersuchten, kann hier kein Vergleich gezogen werden bzw. auch kein „hot spot“ vermutet werden. Als problematisch in der Auswertung entpuppte sich eine Poly-C Sequenz ab Höhe des 1306ten Nukleotids. Trotz verschiedener Primer, die diesen Bereich möglichst eng umschlossen, konnte keine zufriedenstellende Sequenz amplifiziert werden. Fraglich bleibt, ob diese Sequenz auch in-vitro zu Ablesefehlern führen würde. Da sie jedoch dicht hinter dem Stoppcodon liegt und somit nicht mehr abgelesen wird, kann auch hier eine Schwachstelle, die zur Mutation und zur Entwicklung von Tumoren führt, als unwahrscheinlich angesehen werden.

Feline Lymphome und auch LGL-Lymphome gehen zumeist mit einer schlechten Prognose und nur mangelhaftem Ansprechen auf Chemotherapeutika einher (Franks et al., 1986; Goitsuka et al., 1988; Krick et al., 2008; Valli et al., 2002; Wellman et al., 1992). Daher wird ständig versucht, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln. Dafür können Zelllinien zum Einsatz kommen, anhand derer durch in-vitro-Studien versucht wird, die in-vivo-Verhältnisse bestmöglich nachzustellen und somit die Zahl von Versuchstieren möglichst gering zu halten. Auch anhand der feline Lymphomzelllinien wurden neue Therapeutika getestet (Mochizuki et al., 2012). Anhand von fünf feline Lymphomzelllinien und einer nicht-neoplastischen feline Nierenzelllinie wurde die Wirkung von Nutlin-3, welches die P53-MDM2-Interaktion inhibiert und dadurch p53 stabilisiert, getestet (Mochizuki et al., 2012). Das Ergebnis ist insofern interessant, als dass das Zellwachstum nur bei den Zelllinien beeinflusst wurde, die sich durch keine oder stille p53-Mutationen charakterisierten. Bei den beiden Zelllinien, die eine Missensemutation aufwiesen (3201 und MCC), konnte keine Wirkung registriert werden.

Daher ist eine Sequenzanalyse von p53 bei Lymphomen der Katze dahingehend sinnvoll, dass sich je nach genetischer Ausstattung bzw. Mutationstyp von p53 unterschiedliche therapeutische Ansätze ergeben. So sollte bei S87 Nutlin-3 als potenziell wirksames Chemotherapeutikum einsetzbar sein, da S87 im abgelesenen Raster lediglich eine stille Mutation aufwies und daher dem p53-Wildtyp, bei dem Nutlin-3 Wirkung zeigt, entspricht.

6 Zusammenfassung

1. Ziel dieser Arbeit war es, eine neu etablierte feline Large Granular Lymphocyte (LGL)-Zelllinie (S87) zu charakterisieren.
2. In der Literaturübersicht wird zunächst allgemein auf die Large Granular Lymphocytes und deren Eigenschaften eingegangen. Bisher etablierte feline Lymphomzelllinien sowie deren Hauptcharakteristika werden vorgestellt. Zudem wird ein Überblick über Aspekte der genetischen Instabilität unter Berücksichtigung von Aneuploidie, Zentrosomenhyperamplifikationen sowie über p53-Mutationen und deren Bedeutung für die Tumorgenese gegeben.
3. Die S87-Zellen wurden zytologisch, elektronenmikroskopisch, sowie immunzytologisch untersucht. Ebenfalls erfolgte eine Analyse der Wachstumscharakteristika. Die zytotoxische Aktivität wurde zum einen morphologisch mittels Rosettenformation dargestellt und zum anderen mit Hilfe des MTT-Tests berechnet.
4. Molekularbiologische Untersuchungen erfolgten hinsichtlich des Rearrangements eines B-Zell- und T-Zell-Rezeptors, zum Nachweis eines FeLV-Provirus sowie für die Untersuchung auf p53-Mutationen.
5. Zur Bewertung der chromosomalen Instabilität erfolgten zytogenetische Untersuchungen der Metaphaseplatten sowie von Karyogrammen. Zentrosomenhyperamplifikationen konnten mittels Immunfluoreszenz durch den Nachweis von γ -Tubulin nachgewiesen werden.
6. Mittels der beschriebenen Methoden konnte eine Zuordnung der S87-Zellen zu den zytotoxischen T-Zellen, welche sich durch eine spontane zytotoxische Aktivität auszeichnen, erfolgen. Eine deutliche Anisozytose, Anisokaryose sowie hohe Mitoserate sind hinweisend für einen hohen Malignitätsgrad des Originaltumors. S87 weist eine chromosomale Instabilität auf, welche mit einer Zentrosomenhyperamplifikation einhergeht. In Passage 10 zeigten 55 % der Zellen eine signifikante Abweichung von der euploiden feline Chromosomenzahl ($2n=38$), in Passage 80 sogar 81 %. Bei der Erstellung der Karyogramme zeigte sich in beiden Passagen, dass sich nicht nur bei den Chromosomensätzen mit $2n \neq 38$, sondern auch bei den Chromosomensätzen mit 38 Chromosomen kein korrektes Karyogramm zusammensetzen lies. Bedingt war dies durch Chromosomenverluste und Duplikationen, mit dem Ergebnis

verschiedenster Monosomien sowie Trisomien. Dabei zeigte sich eine Häufung der numerischen Aberrationen in der Gruppe C der feline Chromosomen. Eine stille p53-Mutation konnte im kodierenden und eine weitere im nicht abgelesenen Bereich nachgewiesen werden.

7. Mit S87 konnte erstmals eine FeLV-negative LGL-Zelllinie etabliert und charakterisiert werden, bei der eine Zuordnung zu den zytotoxischen T-Zellen erfolgen konnte. Die Zelllinie kann somit Grundlage für weitere Forschungsprojekte sein, wie zum Beispiel die Untersuchung potenzieller Chemotherapeutika zur Behandlung dieser aggressiven Tumorform.

Summary

1. The aim of this study was to characterize a newly established feline large granular lymphocyte (LGL) cell line (S87).
2. In a review of the literature large granular lymphocytes and their characteristics are described. Furthermore an overview of the established feline lymphoma cell lines is given. Genetic instability, most notably aneuploidy and centrosome hyperamplification, as well as p53 mutations are reviewed in the context of their relevance for tumorigenesis.
3. Cytology, electron microscopy, and immunocytochemistry were used to characterize S87 cells. Additionally, analysis of the growth characteristics of this cell line was performed. Spontaneous cytotoxic activity was assessed using MTT assay and rosette formation.
4. Rearrangement of B cell and T cell receptors, existence of FeLV provirus, and p53 mutations were analyzed by molecular techniques.
5. To assess chromosomal instability, cytogenetic analysis of metaphase plates and the karyotype of the S87 cells was carried out. Centrosome hyperamplification was analyzed by detection of γ -tubulin using immunofluorescence.
6. S87 cells could be classified as cytotoxic T cells with spontaneous cytotoxic activity. Anisocytosis, anisokaryosis and a high mitotic index may indicate a high degree of malignancy of the original tumor. Fiftyfive percent of the cells in passage 10 and 81% of the cells in passage 80 showed a significant aberration from the normal, euploide feline chromosome number ($2n = 38$). Karyotype analysis revealed that not only chromosome sets with $2n \neq 38$, but also sets with $2n = 38$ showed an irregular karyotype. That was due to losses and duplications of chromosomes leading to various monosomies and trisomies. Abberations were most frequently detectable in the chromosomes of group C. Chromosomal instability was associated with a centrosome hyperamplification. A silent mutation and an additional mutation in the non-coding region of p53 was detected.
7. With S87 the first FeLV-negative LGL cell line derived from cytotoxic T cells could be established and characterized. This gives the possibility to use the cell line for further investigations and examinations, e.g. to investigate chemotherapeutic agents for the treatment of this aggressive tumor type.

7 Literaturverzeichnis

- Aichel, O.R.W., 1911. Über Zellverschmelzung mit Qualitativ abnormer Chromosomenverteilung: als Ursache der Geschwulstbildung. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Arden, L.A., Brunner, T.K., Carottini, J.C., J.M., D., A.L., d.W., Dinarello, C.A., Di Sabato, G., Farrar, J.F., Gery, I., Gillis, S., Handschumacher, R.E., Henney, C.S., Hoffmann, M.K., Koopman, W.J., Krane, S.M., Lachman, L.B., Lefkowitz, I., Mishell, R.I., Mizel, S.B., Oppenheim, J.J., Paetkau, V., Plate, J., Rölinghoff, M., Rosenstreich, D., Rosenthal, A.S., Rosenwasser, L.J., Schimpl, A., Shin, H.S., Simon, P.L., Smith, K.A., Wagner, H., Watson, J.D., Wecker, E., Wood, D.D., 1979. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. *J Immunol* 123, 2928-2929.
- Atkinson, E.A., Barry, M., Darmon, A.J., Shostak, I., Turner, P.C., Moyer, R.W., Bleackley, R.C., 1998. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J Biol Chem* 273, 21261-21266.
- Aubin, J.E., Osborn, M., Weber, K., 1980. Variations in the distribution and migration of centriole duplexes in mitotic PtK2 cells studied by immunofluorescence microscopy. *J Cell Sci* 43, 177-194.
- Balczon, R., Bao, L., Zimmer, W.E., Brown, K., Zinkowski, R.P., Brinkley, B.R., 1995. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* 130, 105-115.
- Ballas, Z.K., Rasmussen, W., 1990. Lymphokine-activated killer (LAK) cells. IV. Characterization of murine LAK effector subpopulations. *J Immunol* 144, 386-395.
- Barch, M.J., 1991. The ACT cytogenetics laboratory manual. New York: Raven Press, 17-30.
- Bartek, J., Lukas, C., Lukas, J., 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 792-804.
- Beebe, A.M., Dua, N., Faith, T.G., Moore, P.F., Pedersen, N.C., Dandekar, S., 1994. Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J Virol* 68, 3080-3091.
- Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L., 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25, 297-336.
- Berry, B.T., Ghosh, A.K., Kumar, D.V., Spodick, D.A., Roy-Burman, P., 1988. Structure and function of endogenous feline leukemia virus long terminal repeats and adjoining regions. *J Virol* 62, 3631-3641.
- Biron, C.A., Byron, K.S., Sullivan, J.L., 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320, 1731-1735.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C.S., Novotny, M., Slamon, D.J., Plowman, G.D., 1998. A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17, 3052-3065.
- Bix, M., Locksley, R.M., 1995. Natural T cells. Cells that co-express NKRP-1 and TCR. *J Immunol* 155, 1020-1022.
- Blaschitz, A., Gauster, M., Dohr, G., 2008. Application of cryo-compatible antibodies to human placenta paraffin sections. *Histochem Cell Biol* 130, 595-599.
- Bleesing, J.J., Brown, M.R., Dale, J.K., Straus, S.E., Lenardo, M.J., Puck, J.M., Atkinson, T.P., Fleisher, T.A., 2001. TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clin Immunol* 100, 314-324.
- Bleesing, J.J., Janik, J.E., Fleisher, T.A., 2003. Common expression of an unusual CD45 isoform on T cells from patients with large granular lymphocyte leukaemia and autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br J Haematol* 120, 93-96.

- Boleti, H., Karsenti, E., Vernos, I., 1996. Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis. *Cell* 84, 49-59.
- Boveri, T., 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. A. Stuber.
- Boveri, T., 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. G. Fischer.
- Bradley, T.R., Sumner, M.A., 1968. Stimulation of mouse bone marrow colony growth in vitro by conditioned medium. *Aust J Exp Biol Med Sci* 46, 607-618.
- Brenner, M.B., McLean, J., Dialynas, D.P., Strominger, J.L., Smith, J.A., Owen, F.L., Seidman, J.G., Ip, S., Rosen, F., Krangel, M.S., 1986. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322, 145-149.
- Brinkley, B.R., Goepfert, T.M., 1998. Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell Motil Cytoskeleton* 41, 281-288.
- Brown, C.R., Doxsey, S.J., White, E., Welch, W.J., 1994. Both viral (adenovirus E1B) and cellular (hsp 70, p53) components interact with centrosomes. *J Cell Physiol* 160, 47-60.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K.V., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300-303.
- Carroll, P.E., Okuda, M., Horn, H.F., Biddinger, P., Stambrook, P.J., Gleich, L.L., Li, Y.Q., Tarapore, P., Fukasawa, K., 1999. Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18, 1935-1944.
- Casey, J.W., Roach, A., Mullins, J.I., Burck, K.B., Nicolson, M.O., Gardner, M.B., Davidson, N., 1981. The U3 portion of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7778-7782.
- Chan, W.C., Link, S., Mawle, A., Check, I., Brynes, R.K., Winton, E.F., 1986. Heterogeneity of large granular lymphocyte proliferations: delineation of two major subtypes. *Blood* 68, 1142-1153.
- Chanvitan, A., Puttawibul, P., Casson, A.G., 1997. Flow cytometry in squamous cell esophageal cancer and precancerous lesions. *Dis Esophagus* 10, 206-210.
- Chen, Y.H., Chiu, N.M., Mandal, M., Wang, N., Wang, C.R., 1997. Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 6, 459-467.
- Cheney, C.M., Rojko, J.L., Kociba, G.J., Wellman, M.L., Di Bartola, S.P., Rezanka, L.J., Forman, L., Mathes, L.E., 1990. A feline large granular lymphoma and its derived cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 455-463.
- Chiba, S., Okuda, M., Mussman, J.G., Fukasawa, K., 2000. Genomic convergence and suppression of centrosome hyperamplification in primary p53^{-/-} cells in prolonged culture. *Exp Cell Res* 258, 310-321.
- Cockerell, G.L., Krakowka, S., Hoover, E.A., Olsen, R.G., Yohn, D.S., 1976. Characterization of feline T- and B-lymphocytes and identification of an experimentally induced T-cell neoplasm in the cat. *J Natl Cancer Inst* 57, 907-913.
- Coffman, R.L., Weissman, I.L., 1981a. B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* 289, 681-683.
- Coffman, R.L., Weissman, I.L., 1981b. A monoclonal antibody that recognizes B cells and B cell precursors in mice. *J Exp Med* 153, 269-279.
- Cron, R.Q., Gajewski, T.F., Sharrow, S.O., Fitch, F.W., Matis, L.A., Bluestone, J.A., 1989. Phenotypic and functional analysis of murine CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻ TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells. *J Immunol* 142, 3754-3762.
- Darbes, J., Majzoub, M., Breuer, W., Hermanns, W., 1998. Large granular lymphocyte leukemia/lymphoma in six cats. *Vet Pathol* 35, 370-379.
- Day, M.J., Kyaw-Tanner, M., Silkstone, M.A., Lucke, V.M., Robinson, W.F., 1999. T-cell-rich B-cell lymphoma in the cat. *J Comp Pathol* 120, 155-167.
- Della Croce, D.R., Imam, A., Brynes, R.K., Nathwani, B.N., Taylor, C.R., 1991. Anti-BLA.36 monoclonal antibody shows reactivity with Hodgkin's cells and B lymphocytes in frozen and paraffin-embedded tissues. *Hematol Oncol* 9, 103-114.

- Dhodapkar, M.V., Li, C.Y., Lust, J.A., Tefferi, A., Philyky, R.L., 1994. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood* 84, 1620-1627.
- Dourmashkin, R.R., Deteix, P., Simone, C.B., Henkart, P., 1980. Electron microscopic demonstration of lesions in target cell membranes associated with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 42, 554-560.
- Doxsey, S.J., Stein, P., Evans, L., Calarco, P.D., Kirschner, M., 1994. Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* 76, 639-650.
- Drexler, H.G., MacLeod, R.A., 2003. Leukemia-lymphoma cell lines as model systems for hematopoietic research. *Ann Med* 35, 404-412.
- Drexler, H.G., MacLeod, R.A., 2010. History of leukemia-lymphoma cell lines. *Hum Cell* 23, 75-82.
- Duesberg, P., Rasnick, D., Li, R., Winters, L., Rausch, C., Hehlmann, R., 1999. How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res* 19, 4887-4906.
- Duesberg, P., Rausch, C., Rasnick, D., Hehlmann, R., 1998. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13692-13697.
- Duke, R.C., Cohen, J.J., Chervenak, R., 1986. Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *J Immunol* 137, 1442-1447.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Endo, Y., Cho, K.W., Nishigaki, K., Momoi, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Goto, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1998. Clinicopathological and immunological characteristics of six cats with granular lymphocyte tumors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 21, 27-42.
- Engelman, R.W., Machida, K., Longley, R.E., Liu, W.T., Trang, L.Q., Good, R.A., Day, N.K., 1986. Characterization of a newly established feline lymphoma-derived cell line (BKD) lacking T and B cell surface markers. *In Vitro Cell Dev Biol* 22, 273-279.
- Euteneuer, U., McIntosh, J.R., 1981. Structural polarity of kinetochore microtubules in PtK1 cells. *J Cell Biol* 89, 338-345.
- Finn, J.P., Schwartz, L.W., 1972. A neoplasm of globule leucocytes in the intestine of a cat. *J Comp Pathol* 82, 323-326.
- Fischer, U.R., 2013. Analyse der Rekombination des felinen T-Zellrezeptor-Gamma-Gens bei T-Zell-Lymphosarkomen der Katze. *Diss Vet Med. Gießen*.
- Flemming, W., 1882. *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. Vogel.
- Franks, P.T., Harvey, J.W., Mays, M.C., Senior, D.F., Bowen, D.J., Hall, B.J., 1986. Feline large granular lymphoma. *Vet Pathol* 23, 200-202.
- Fry, A.M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y.D., Tanaka, K., Nigg, E.A., 1998. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol* 141, 1563-1574.
- Fujino, Y., Ma, Z., Satoh, H., Mizuno, T., Hisasue, M., Baba, K., Masuda, K., Ohno, K., Onishi, T., Tsujimoto, H., 2004. Characterization of a newly established nonproducer lymphoma cell line for feline leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 429-439.
- Fukasawa, K., 2007. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer* 7, 911-924.
- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., Vande Woude, G.F., 1996. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271, 1744-1747.
- Fukasawa, K., Wiener, F., Vande Woude, G.F., Mai, S., 1997. Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* 15, 1295-1302.
- Fulton, R., Forrest, D., McFarlane, R., Onions, D., Neil, J.C., 1987. Retroviral transduction of T-cell antigen receptor beta-chain and myc genes. *Nature* 326, 190-194.
- Funk, J., Schmitz, G., Bach, U., Failing, K., Burkhardt, E., 2003. Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in

- isolated blood lymphocytes from 110 dogs with tumours. *Research in veterinary science* 74, 129-135.
- Gentile, T.C., Uner, A.H., Hutchison, R.E., Wright, J., Ben-Ezra, J., Russell, E.C., Loughran, T.P., Jr., 1994. CD3+, CD56+ aggressive variant of large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 84, 2315-2321.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H., 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-1715.
- Gey, G.O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T., 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12, 264-265.
- Ghadimi, B.M., Sackett, D.L., Difilippantonio, M.J., Schrock, E., Neumann, T., Jauho, A., Auer, G., Ried, T., 2000. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 183-190.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., Parry, H., 1995. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95-105.
- Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Van Kaer, L., 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4, 231-237.
- Goitsuka, R., Ohno, K., Matsumoto, Y., Hayashi, N., Momoi, Y., Okamoto, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1993. Establishment and characterization of a feline large granular lymphoma cell line expressing interleukin 2 receptor alpha-chain. *J Vet Med Sci* 55, 863-865.
- Goitsuka, R., Tsuji, M., Matsumoto, Y., Onda, C., Matsuoka, K., Yokomori, K., Yasuda, K., Hirota, Y., Ono, K., Hayashi, T., 1988. A case of feline large granular lymphoma. *Nihon Juigaku Zasshi* 50, 593-595.
- Gondolf, C., 1994. Untersuchungen zur Zytotoxizität von Natural Killer (NK)- und Lymphokin-aktivierten Killer (LAK)-Zellen aus dem peripheren Blut des Hundes *Diss Vet Med. Gießen*.
- Gondolf, C., Burkhardt, E., Failing, K., Stitz, L., 1996. A new colorimetric method for measuring cell-mediated cytotoxicity in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 55, 11-22.
- Greeley, E.H., Kealy, R.D., Ballam, J.M., Lawler, D.F., Segre, M., 1996. The influence of age on the canine immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 55, 1-10.
- Grindem, C.B., Buoen, L.C., 1989. Cytogenetic analysis in nine leukaemic cats. *J Comp Pathol* 101, 21-30.
- Gronbaek, K., Straten, P.T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M.K., Hansen, N.E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K., Guldborg, P., 1998. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 92, 3018-3024.
- Grossi, C.E., Cadoni, A., Zicca, A., Leprini, A., Ferrarini, M., 1982. Large granular lymphocytes in human peripheral blood: ultrastructural and cytochemical characterization of the granules. *Blood* 59, 277-283.
- Gulino, S.E., 1992. Chromosome abnormalities and oncogenesis in cat leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 64, 149-157.
- Hameed, A., Truong, L.D., Price, V., Kruhenbuhl, O., Tschopp, J., 1991. Immunohistochemical localization of granzyme B antigen in cytotoxic cells in human tissues. *Am J Pathol* 138, 1069-1075.
- Hanlon, M.A., Marr, J.M., Hayes, K.A., Mathes, L.E., Stromberg, P.C., Ringler, S., Krakowka, S., Lafrado, L.J., 1993. Loss of neutrophil and natural killer cell function following feline immunodeficiency virus infection. *Viral Immunol* 6, 119-124.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A., Oegema, K., 2001. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 155, 1109-1116.
- Hansemann, D., 1890. Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 119, 299-326.

- Hardy, W.D., Jr., McClelland, A.J., Zuckerman, E.E., Snyder, H.W., Jr., MacEwen, E.G., Francis, D., Essex, M., 1980. Development of virus non-producer lymphosarcomas in pet cats exposed to FeLV. *Nature* 288, 90-92.
- Hardy, W.D., Jr., McClelland, A.J., Zuckerman, E.E., Snyder, H.W., Jr., MacEwen, E.G., Francis, D., Essex, M., 1981. Feline leukemia virus nonproducer lymphosarcomas of cats as a model for the etiology of human leukemias. *Haematol Blood Transfus* 26, 492-494.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J., 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., Karsenti, E., 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 382, 420-425.
- Heibein, J.A., Barry, M., Motyka, B., Bleackley, R.C., 1999. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cytochrome c release are caspase independent. *J Immunol* 163, 4683-4693.
- Helgason, C.D., Prendergast, J.A., Berke, G., Bleackley, R.C., 1992. Peritoneal exudate lymphocyte and mixed lymphocyte culture hybridomas are cytolytic in the absence of cytotoxic cell proteinases and perforin. *Eur J Immunol* 22, 3187-3190.
- Helton, E.S., Chen, X., 2007. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100, 883-896.
- Heneen, W.K., 1975. Kinetochores and microtubules in multipolar mitosis and chromosome orientation. *Exp Cell Res* 91, 57-62.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Lowe Wright, L., Bray-Ward, P., Ward, D.C., Vance, G.H., 2001. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry* 43, 101-109.
- Henkart, M.P., Henkart, P.A., 1982. Lymphocyte mediated cytolysis as a secretory phenomenon. *Adv Exp Med Biol* 146, 227-247.
- Henkart, P.A., 1985. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 3, 31-58.
- Henrich, M., Hecht, W., Weiss, A.T., Reinacher, M., 2009. A new subgroup of immunoglobulin heavy chain variable region genes for the assessment of clonality in feline B-cell lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol* 130, 59-69.
- Henrich, M., Huber, K., Rydzewski, L., Kirsten, S., Spengler, B., Rompp, A., Reinacher, M., 2014. Identification of T cell receptor signaling pathway proteins in a feline large granular lymphoma cell line by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Vet Immunol Immunopathol.* 161, 116-121
- Henrich, M.A., 2008. Entwicklung einer PCR-gestützten Klonalitätsdiagnostik bei B-Zell-Lymphomen der Katze. *Diss Vet Med. Gießen.*
- Herberman, R.B., Reynolds, C.W., Ortaldo, J.R., 1986. Mechanism of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Annu Rev Immunol* 4, 651-680.
- Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L., Sluder, G., 1999. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 283, 851-854.
- Hinchcliffe, E.H., Sluder, G., 2001. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev* 15, 1167-1181.
- Hirschberger, J., 1987. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes. *Diss Vet Med. Gießen.*
- Hisasue, M., Nishigaki, K., Katae, H., Yuri, K., Mizuno, T., Fujino, Y., Setoguchi, A., Hasegawa, A., Watari, T., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2000. Clonality analysis of various hematopoietic disorders in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Vet Med Sci* 62, 1059-1065.
- Hofstadter, F., Delgado, R., Jakse, G., Judmaier, W., 1986. Urothelial dysplasia and carcinoma in situ of the bladder. *Cancer* 57, 356-361.

- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Howard, A., Pelc, S.R., 1951. Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature* 167, 599-600.
- Howard, K.E., Reckling, S.K., Egan, E.A., Dean, G.A., 2010. Acute mucosal pathogenesis of feline immunodeficiency virus is independent of viral dose in vaginally infected cats. *Retrovirology* 7, 2.
- Hu, T., Miller, C.M., Ridder, G.M., Aardema, M.J., 1999. Characterization of p53 in Chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL, and CHL: implications for genotoxicity testing. *Mutat Res* 426, 51-62.
- Hussain, S.P., Harris, C.C., 1998. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 58, 4023-4037.
- Hussain, S.P., Harris, C.C., 1999. p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutat Res* 428, 23-32.
- Iscove, N.N., Senn, J.S., Till, J.E., McCulloch, E.A., 1971. Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood* 37, 1-5.
- Jackson, M.L., Haines, D.M., Meric, S.M., Misra, V., 1993. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can J Vet Res* 57, 269-276.
- Järplid, B., Feldman, B.F., 1993. Large granular lymphoma with toxoplasmosis in a cat. *Comp Haematol Int* 3, 241-243.
- Jones, T.C., 1965. San Juan Conference on karyotype of Felidae: Special report. *Mammalian Chromosomal Newsletter* 15, 121-122.
- Joyce, S., Negishi, I., Boesteanu, A., DeSilva, A.D., Sharma, P., Chorney, M.J., Loh, D.Y., Van Kaer, L., 1996. Expansion of natural (NK1+) T cells that express alpha beta T cell receptors in transporters associated with antigen presentation-1 null and thymus leukemia antigen positive mice. *J Exp Med* 184, 1579-1584.
- Kandli, M., Feige, E., Chen, A., Kilfin, G., Motro, B., 2000. Isolation and characterization of two evolutionarily conserved murine kinases (Nek6 and nek7) related to the fungal mitotic regulator, NIMA. *Genomics* 68, 187-196.
- Kaneko, N., Okuda, M., Toyama, N., Oikawa, T., Watanabe, M., Kanaya, N., Yazawa, M., Hasegawa, K., Morimoto, M., Hayashi, T., Une, S., Nakaichi, M., Taura, Y., Tsujimoto, H., Inokuma, H., 2005. Detection of centrosome amplification as a surrogate marker of dysfunction in the p53 pathway -p53 gene mutation or MDM2 overexpression. *Vet Comp Oncol* 3, 203-210.
- Kariya, K., Konno, A., Ishida, T., 1997. Perforin-like immunoreactivity in four cases of lymphoma of large granular lymphocytes in the cat. *Vet Pathol* 34, 156-159.
- Kärre, K., 1985. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity. A reevaluation and a hypothesis. Academic Press, Orlando, 81-91.
- Kasza, L., 1964. Establishment and Characterization of Canine Thyroid Adenocarcinoma and Canine Melanoma Cell Lines. *Am J Vet Res* 25, 1178-1185.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M., 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.
- Ke, Y.W., Dou, Z., Zhang, J., Yao, X.B., 2003. Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. *Cell Res* 13, 69-81.
- Kellogg, D.R., Field, C.M., Alberts, B.M., 1989. Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome, spindle, and kinetochore of the early *Drosophila* embryo. *J Cell Biol* 109, 2977-2991.
- Kern, W.F., Spier, C.M., Hanneman, E.H., Miller, T.P., Matzner, M., Grogan, T.M., 1992. Neural cell adhesion molecule-positive peripheral T-cell lymphoma: a rare variant with a propensity for unusual sites of involvement. *Blood* 79, 2432-2437.

- Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R., Rieder, C.L., 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol* 10, 59-67.
- Knapp, D.W., Leibnitz, R.R., DeNicola, D.B., Turek, J.J., Teclaw, R., Shaffer, L., Chan, T.C., 1993. Measurement of NK activity in effector cells purified from canine peripheral lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 35, 239-251.
- Knudson, A.G., Jr., 1985. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45, 1437-1443.
- Kochanski, R.S., Borisy, G.G., 1990. Mode of centriole duplication and distribution. *J Cell Biol* 110, 1599-1605.
- Köhler, K., 2003. Untersuchungen zur Klassifikation maligner Lymphome sowie zur differentiellen Expression von Virusproteinen bei FeLV-positiven malignen Lymphomen der Katze. Diss Vet Med. Gießen.
- Koyasu, S., 1994. CD3+CD16+NK1.1+B220+ large granular lymphocytes arise from both alpha-beta TCR+CD4-CD8- and gamma-delta TCR+CD4-CD8- cells. *J Exp Med* 179, 1957-1972.
- Krakowka, S., 1983. Natural killer cell activity in adult gnotobiotic dogs. *Am J Vet Res* 44, 635-638.
- Kramer, A., Schweizer, S., Neben, K., Giesecke, C., Kalla, J., Katzenberger, T., Benner, A., Muller-Hermelink, H.K., Ho, A.D., Ott, G., 2003. Centrosome aberrations as a possible mechanism for chromosomal instability in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 17, 2207-2213.
- Krick, E.L., Little, L., Patel, R., Shofer, F.S., Sorenmo, K., Clifford, C.A., Baez, J.L., 2008. Description of clinical and pathological findings, treatment and outcome of feline large granular lymphocyte lymphoma (1996-2004). *Vet Comp Oncol* 6, 102-110.
- Kumar, D.V., Berry, B.T., Roy-Burman, P., 1989. Nucleotide sequence and distinctive characteristics of the env gene of endogenous feline leukemia provirus. *J Virol* 63, 2379-2384.
- Kunder, S., Calzada-Wack, J., Holzlwimmer, G., Muller, J., Kloss, C., Howat, W., Schmidt, J., Hofler, H., Warren, M., Quintanilla-Martinez, L., 2007. A comprehensive antibody panel for immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded hematopoietic neoplasms of mice: analysis of mouse specific and human antibodies cross-reactive with murine tissue. *Toxicol Pathol* 35, 366-375.
- Kuriyama, R., Borisy, G.G., 1981. Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J Cell Biol* 91, 814-821.
- Kuylenskierna, C., Bjorkstrom, N.K., Andersson, S.K., Sahlstrom, P., Bosnjak, L., Paquin-Proulx, D., Malmberg, K.J., Ljunggren, H.G., Moll, M., Sandberg, J.K., 2011. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol* 41, 1913-1923.
- Lacey, K.R., Jackson, P.K., Stearns, T., 1999. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2817-2822.
- Lamolle, G., Marin, M., Alvarez-Valin, F., 2006. Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers. *Mutat Res* 600, 102-112.
- Lane, D.P., 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lange, B.M., Gull, K., 1995. A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J Cell Biol* 130, 919-927.
- Lanier, L.L., Cwirla, S., Federspiel, N., Phillips, J.H., 1986a. Human natural killer cells isolated from peripheral blood do not rearrange T cell antigen receptor beta chain genes. *J Exp Med* 163, 209-214.
- Lanier, L.L., Cwirla, S., Phillips, J.H., 1986b. Genomic organization of T cell gamma genes in human peripheral blood natural killer cells. *J Immunol* 137, 3375-3377.
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., Phillips, J.H., 1986c. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136, 4480-4486.
- Lanier, L.L., Phillips, J.H., 1986. Human thymic and peripheral blood non-MHC-restricted cytotoxic lymphocytes. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 3, 247-254.

- Lanier, L.L., Phillips, J.H., Hackett, J., Jr., Tutt, M., Kumar, V., 1986d. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 137, 2735-2739.
- Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J., Phillips, J.H., 1989. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169, 2233-2238.
- Lee, H., Larner, J.M., Hamlin, J.L., 1997. A p53-independent damage-sensing mechanism that functions as a checkpoint at the G1/S transition in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 526-531.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-627.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Levan, A., 1956. Chromosomes in cancer tissue. *Ann N Y Acad Sci* 63, 774-792.
- Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A., 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.
- Lichtenheld, M.G., Olsen, K.J., Lu, P., Lowrey, D.M., Hameed, A., Hengartner, H., Podack, E.R., 1988. Structure and function of human perforin. *Nature* 335, 448-451.
- Lin, H., Nieda, M., Nicol, A.J., 2004. Differential proliferative response of NKT cell subpopulations to in vitro stimulation in presence of different cytokines. *Eur J Immunol* 34, 2664-2671.
- Lingle, W.L., Barrett, S.L., Negron, V.C., D'Assoro, A.B., Boeneman, K., Liu, W., Whitehead, C.M., Reynolds, C., Salisbury, J.L., 2002. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1978-1983.
- Lingle, W.L., Lutz, W.H., Ingle, J.N., Maihle, N.J., Salisbury, J.L., 1998. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2950-2955.
- Liu, G., Parant, J.M., Lang, G., Chau, P., Chavez-Reyes, A., El-Naggar, A.K., Multani, A., Chang, S., Lozano, G., 2004a. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat Genet* 36, 63-68.
- Liu, X., Yue, P., Khuri, F.R., Sun, S.Y., 2004b. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 64, 5078-5083.
- Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., Tlsty, T.D., 1992. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70, 923-935.
- Ljunggren, H.G., Karre, K., 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244.
- Loeb, L.A., 1998. Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res* 72, 25-56.
- London, L., Perussia, B., Trinchieri, G., 1986. Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. *J Immunol* 137, 3845-3854.
- Looringh van Beeck, F.A., Reinink, P., Hermsen, R., Zajonc, D.M., Laven, M.J., Fun, A., Troskie, M., Schoemaker, N.J., Morar, D., Lenstra, J.A., Vervelde, L., Rutten, V.P.M.G., van Eden, W., Van Rhijn, I., 2009. Functional CD1d and/or NKT cell invariant chain transcript in horse, pig, African elephant and guinea pig, but not in ruminants. *Mol Immunol.* 46, 1424-1431.
- Loughran, T.P., Jr., 1993. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 82, 1-14.
- Loughran, T.P., Jr., Starkebaum, G., 1987. Large granular lymphocyte leukemia. Report of 38 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 66, 397-405.
- Louwerens, M., London, C.A., Pedersen, N.C., Lyons, L.A., 2005. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med* 19, 329-335.
- Lowrey, D.M., Hameed, A., Lichtenheld, M., Podack, E.R., 1988. Isolation and characterization of cytotoxic granules from human lymphokine (interleukin 2) activated killer cells. *Cancer Res* 48, 4681-4688.
- MacDonald, G., Shi, L., Vande Velde, C., Lieberman, J., Greenberg, A.H., 1999. Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *J Exp Med* 189, 131-144.

- Macon, W.R., Williams, M.E., Greer, J.P., Hammer, R.D., Glick, A.D., Collins, R.D., Cousar, J.B., 1996. Natural killer-like T-cell lymphomas: aggressive lymphomas of T-large granular lymphocytes. *Blood* 87, 1474-1483.
- Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K., Taniguchi, M., 1995. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *Int Immunol* 7, 1157-1161.
- Mayor, T., Stierhof, Y.D., Tanaka, K., Fry, A.M., Nigg, E.A., 2000. The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J Cell Biol* 151, 837-846.
- Mayr, B., Blauensteiner, J., Edlinger, A., Reifinger, M., Alton, K., Schaffner, G., Brem, G., 2000. Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Research in veterinary science* 68, 63-70.
- Mayr, B., Heczko, U., Schellander, K., Schleger, W., Reifinger, M., 1993. Sequence of an exon of the feline p53 gene-mutation in a lymphosarcoma. *Br Vet J* 149, 387-390.
- Mayr, B., Reifinger, M., Alton, K., Schaffner, G., 1998. Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Vet Res Commun* 22, 249-255.
- Mayr, B., Schaffner, G., Kurzbauer, R., Reifinger, M., Schellander, K., 1995a. Sequence of an exon of tumour suppressor p53 gene--a comparative study in domestic animals: mutation in a feline solid mammary carcinoma. *Br Vet J* 151, 325-329.
- Mayr, B., Schaffner, G., Kurzbauer, R., Schneider, A., Reifinger, M., Loupal, G., 1995b. Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *Br Vet J* 151, 707-713.
- Mazia, D., 1987. The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Int Rev Cytol* 100, 49-92.
- McIntosh, J.R., Koonce, M.P., 1989. Mitosis. *Science* 246, 622-628.
- MedDennert, G., Podack, E.R., 1983. Cytolysis by H-2-specific T killer cells. Assembly of tubular complexes on target membranes. *J Exp Med* 157, 1483-1495.
- Medema, J.P., Toes, R.E., Scaffidi, C., Zheng, T.S., Flavell, R.A., Melief, C.J., Peter, M.E., Offringa, R., Krammer, P.H., 1997. Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 27, 3492-3498.
- Miki, R., Okuda, M., Oikawa, T., Watanabe, M., Ma, Z., Matsumoto, K., Iwata, H., Inokuma, H., 2004. Centrosome amplification and chromosomal instability in feline lymphoma cell lines. *J Vet Med Sci* 66, 797-805.
- Miura, T., Tsujimoto, H., Fukasawa, M., Kodama, T., Shibuya, M., Hasegawa, A., Hayami, M., 1987. Structural abnormality and over-expression of the myc gene in feline leukemias. *Int J Cancer* 40, 564-569.
- Miyachi, K., Fritzler, M.J., Tan, E.M., 1978. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121, 2228-2234.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C., 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- Mochizuki, H., Goto-Koshino, Y., Sato, M., Fujino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2012. Comparison of the antitumor effects of an MDM2 inhibitor, nutlin-3, in feline lymphoma cell lines with or without p53 mutation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 147, 187-194.
- Mochizuki, H., Takahashi, M., Nishigaki, K., Ide, T., Goto-Koshino, Y., Watanabe, S., Sato, H., Sato, M., Kotera, Y., Fujino, Y., Ohno, K., Uchida, K., Tsujimoto, H., 2011. Establishment of a novel feline leukemia virus (FeLV)-negative B-cell cell line from a cat with B-cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 140, 307-311.
- Monteith, C.E., Chelack, B.J., Davis, W.C., Haines, D.M., 1996. Identification of monoclonal antibodies for immunohistochemical staining of feline B lymphocytes in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Can J Vet Res* 60, 193-198.
- Moore, P.F., Woo, J.C., Vernau, W., Kosten, S., Graham, P.S., 2005. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 167-178.

- Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., Gallo, R., 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-1008.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B., Agard, D.A., 1995. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378, 638-640.
- Moritz, M., Zheng, Y., Alberts, B.M., Oegema, K., 1998. Recruitment of the gamma-tubulin ring complex to *Drosophila* salt-stripped centrosome scaffolds. *J Cell Biol* 142, 775-786.
- Moro, F., Ottaggio, L., Bonatti, S., Simili, M., Miele, M., Bozzo, S., Abbondandolo, A., 1995. p53 expression in normal versus transformed mammalian cells. *Carcinogenesis* 16, 2435-2440.
- Morse, H.C., 3rd, Davidson, W.F., Yetter, R.A., Murphy, E.D., Roths, J.B., Coffman, R.L., 1982. Abnormalities induced by the mutant gene *lpr*: expansion of a unique lymphocyte subset. *J Immunol* 129, 2612-2615.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Munson, A.E., Phillips, K.E., 2000. Natural killer cells and immunotoxicology. *Methods Mol Biol* 121, 359-365.
- Nagata, S., 1994. Mutations in the Fas antigen gene in *lpr* mice. *Semin Immunol* 6, 3-8.
- Nagy, Z., Mandi, Y., 1998. Natural killer cell mediated cytotoxicity against VERO target cells; the suppressive effect of pentoxifylline. *Immunol Lett* 63, 121-123.
- Nakada, Y., Soga, M., Kosaka, T., Tsukatani, Y., Miyamori, M., Kuwabara, M., Tanaka, S., Koide, F., Fujiwara, K., 1996. Characterization of natural killer cytotoxic factor (NKCF) from canine NK cells. *Vet Immunol Immunopathol* 49, 283-293.
- Nakajima, H., Park, H.L., Henkart, P.A., 1995. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med* 181, 1037-1046.
- Nakano, K., Vousden, K.H., 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.
- Nambiar, P.R., Haines, D.M., Ellis, J.A., Kidney, B.A., Jackson, M.L., 2000. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 61, 1277-1281.
- Nariai Nakada, Y., Nariai, K., Kosaka, T., Kuwabara, M., Kiuchi, Y., 1999. Morphological observation of canine natural killer cells mediated cytotoxicity. *J Vet Med Sci* 61, 835-838.
- Neben, K., Giesecke, C., Schweizer, S., Ho, A.D., Kramer, A., 2003. Centrosome aberrations in acute myeloid leukemia are correlated with cytogenetic risk profile. *Blood* 101, 289-291.
- Neighbors, B.W., Williams, R.C., Jr., McIntosh, J.R., 1988. Localization of kinesin in cultured cells. *J Cell Biol* 106, 1193-1204.
- Nigg, E.A., 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.
- Nigg, E.A., 2002. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2, 815-825.
- Nowell, P.C., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Oakley, B.R., 1992. gamma-tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol* 2, 1-5.
- Oakley, B.R., 2000. gamma-Tubulin. *Curr Top Dev Biol* 49, 27-54.
- Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y., Jung, M.K., 1990. Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61, 1289-1301.
- Oakley, C.E., Oakley, B.R., 1989. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338, 662-664.

- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N., 2000a. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., Taya, Y., 2000b. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.
- Okabe, H., DuBuy, J., Gilden, R.V., Gardner, M.B., 1978. A portion of the feline leukaemia virus genome is not endogenous in cat cells. *Int J Cancer* 22, 70-78.
- Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E., Fukasawa, K., 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127-140.
- Okuda, M., Umeda, A., Matsumoto, Y., Momoi, Y., Watari, T., Goitsuka, R., O'Brien, S.J., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1993. Molecular cloning and chromosomal mapping of feline p53 tumor suppressor gene. *J Vet Med Sci* 55, 801-805.
- Okuda, M., Umeda, A., Sakai, T., Ohashi, T., Momoi, Y., Youn, H.Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1994. Cloning of feline p53 tumor-suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors. *Int J Cancer* 58, 602-607.
- Orange, J.S., 2002. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect* 4, 1545-1558.
- Orr-Weaver, T.L., Weinberg, R.A., 1998. A checkpoint on the road to cancer. *Nature* 392, 223-224.
- Ostergaard, H.L., Kane, K.P., Mescher, M.F., Clark, W.R., 1987. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. *Nature* 330, 71-72.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E., 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15, 3032-3040.
- Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H., Bornens, M., 1992. Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol* 108, 107-128.
- Pardoll, D.M., Fowlkes, B.J., Bluestone, J.A., Kruisbeek, A., Maloy, W.L., Coligan, J.E., Schwartz, R.H., 1987. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 326, 79-81.
- Pihan, G.A., Doxsey, S.J., 1999. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* 9, 289-302.
- Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P., Doxsey, S.J., 1998. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 58, 3974-3985.
- Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Malhotra, R., Liotta, L., Doxsey, S.J., 2001. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res* 61, 2212-2219.
- Pohlman, L.M., Higginbotham, M.L., Welles, E.G., Johnson, C.M., 2009. Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol* 46, 259-268.
- Preis, S.S., 2008. Herstellung von kaninem Interleukin-2 (cIL-2) nach stabiler Transfektion der mesenchymalen BHK-Zelllinie mit Hilfe des Tet-on-Expressionssystems zur Erzeugung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) für eine adoptive Tumormimmuntherapie beim Hund. *Diss Vet Med. Gießen*.
- Pulvertaft, J.V., 1964. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 1, 238-240.
- Raulet, D.H., Garman, R.D., Saito, H., Tonegawa, S., 1985. Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314, 103-107.
- Reinacher, M., Theilen, G., 1987. Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am J Vet Res* 48, 939-945.
- Renno, T., Attinger, A., Rimoldi, D., Hahne, M., Tschopp, J., MacDonald, H.R., 1998. Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Euro J Immunol* 28, 540-547.

- Ribeiro-Dias, F., Marzagao Barbuto, J.A., Tsujita, M., Jancar, S., 2000. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE(2) and EDTA. *J Immunol Methods* 241, 121-129.
- Rieder, C.L., 1990. Formation of the astral mitotic spindle: ultrastructural basis for the centrosome-kinetochore interaction. *Electron Microsc Rev* 3, 269-300.
- Ring, D., Hubble, R., Kirschner, M., 1982. Mitosis in a cell with multiple centrioles. *J Cell Biol* 94, 549-556.
- Ritz, J., Schmidt, R.E., Michon, J., Hercend, T., Schlossman, S.F., 1988. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 42, 181-211.
- Robertson, M.J., Ritz, J., 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-2438.
- Roccabianca, P., Vernau, W., Caniatti, M., Moore, P.F., 2006. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8(alpha)(alpha) phenotype. *Vet Pathol* 43, 15-28.
- Rohaly, G., Chemnitz, J., Dehde, S., Nunez, A.M., Heukeshoven, J., Deppert, W., Dornreiter, I., 2005. A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* 122, 21-32.
- Rola-Pleszczynski, M., Lieu, H., Sullivan, A.K., Girard, M., 1985. Membrane markers, target cell specificity, and sensitivity to biological response modifiers distinguish human natural cytotoxic from human natural killer cells. *J Clin Invest* 76, 1927-1931.
- Rouvier, E., Luciani, M.F., Golstein, P., 1993. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 177, 195-200.
- Ruscetti, F.W., Morgan, D.A., Gallo, R.C., 1977. Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *J Immunol* 119, 131-138.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen.
- Ryder, J., Wang, X., Bao, L., Gross, S.A., Hua, F., Irons, R.D., 2007. Aggressive natural killer cell leukemia: report of a Chinese series and review of the literature. *Int J Hematol* 85, 18-25.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Schinz, H.R., 1928. Karzinomentstehung durch Mutation. Gebr. Fretz A.-G.
- Schmidt, R.E., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F., Ritz, J., 1986. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med* 164, 351-356.
- Schmitz, G., 2000. Qualitative und quantitative Untersuchungen der zytotoxischen Aktivität aus Hundeblood isolierter Leukozyten gegenüber verschiedenen kaninen Tumorzelllinien. Diss Vet Med. Gießen.
- Schmitz, G., Armien, A.G., Fonfara, S., Teifke, J.P., Burkhardt, E., 2003. Induction of apoptosis by canine natural killer cells. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50, 156-159.
- Schmitz, S., 2011. Der Experimentator: Zellkultur Spektrum Akademischer Verlag, pp. 205-222.
- Schnackenberg, B.J., Palazzo, R.E., 1999. Identification and function of the centrosome centromatrix. *Biol Cell* 91, 429-438.
- Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-322.
- Schömig, S., 2008. Einfluss verschiedener Leukozyten und von Zellkulturüberständen auf die zytotoxische Aktivität von aus Hundeblood isolierten Effektorzellen. Diss Vet Med. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Schwartz, D., Kipar, A., Köhler, K., Jarrett, O., Reinacher, M., 2001. Demonstration of provirus, transcription and translation of exogenous FeLV sequences by PCR and immunohistology. 19th ESVP Meeting, Thessaloniki-Greece, 155.
- Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y., Hammond, D., 1985. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313, 1111-1116.

- Setoguchi, A., Okuda, M., Nishida, E., Yazawa, M., Ishizaka, T., Hong, S.H., Hisasue, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Yoshikawa, Y., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2001a. Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. *Am J Vet Res* 62, 1134-1141.
- Setoguchi, A., Sakai, T., Okuda, M., Minehata, K., Yazawa, M., Ishizaka, T., Watari, T., Nishimura, R., Sasaki, N., Hasegawa, A., Tsujimoto, H., 2001b. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. *Am J Vet Res* 62, 433-439.
- Shimajima, M., Nishimura, Y., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., Akashi, H., 2003. CD56 expression in feline lymphoid cells. *J Vet Med Sci* 65, 769-773.
- Sluder, G., Thompson, E.A., Miller, F.J., Hayes, J., Rieder, C.L., 1997. The checkpoint control for anaphase onset does not monitor excess numbers of spindle poles or bipolar spindle symmetry. *J Cell Sci* 110 (Pt 4), 421-429.
- Smith, K.A., 1980. T-cell growth factor. *Immunol Rev* 51, 337-357.
- Smits, V.A., Klompaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T.P., Medema, R.H., 2000. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* 275, 30638-30643.
- Snyder, H.W., Jr., Hardy, W.D., Jr., Zuckerman, E.E., Fleissner, E., 1978. Characterisation of a tumour-specific antigen on the surface of feline lymphosarcoma cells. *Nature* 275, 656-658.
- Song, S.Y., Kim, W.S., Ko, Y.H., Kim, K., Lee, M.H., Park, K., 2002. Aggressive natural killer cell leukemia: clinical features and treatment outcome. *Haematologica* 87, 1343-1345.
- Spiegelman, S., Watson, K.F., Kacian, D.L., 1971. Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2843-2845.
- Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., 1986. Human natural cytotoxic cells: distinctive membrane markers and patterns of reactivity. *Immunol Res* 5, 33-39.
- Stearns, T., Evans, L., Kirschner, M., 1991. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65, 825-836.
- Steele, K.E., Saunders, G.K., Coleman, G.D., 1997. T-cell-rich B-cell lymphoma in a cat. *Vet Pathol* 34, 47-49.
- Steinbeck, R.G., 1997. Proliferation and DNA aneuploidy in mild dysplasia imply early steps of cervical carcinogenesis. *Acta Oncol* 36, 3-12.
- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G.M., 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-761.
- Stobo, J.D., Rosenthal, A.S., Paul, W.E., 1972. Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. I. Responsiveness to and surface binding of concanavalin A and phytohemagglutinin. *J Immunol* 108, 1-17.
- Strauss, B.S., 1997. Silent and multiple mutations in p53 and the question of the hypermutability of tumors. *Carcinogenesis* 18, 1445-1452.
- Strauss, B.S., 1998a. Hypermutability and silent mutations in human carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 8, 431-438.
- Strauss, B.S., 1998b. Hypermutability in carcinogenesis. *Genetics* 148, 1619-1626.
- Strauss, B.S., 2000. Role in tumorigenesis of silent mutations in the TP53 gene. *Mutat Res* 457, 93-104.
- Suntz, M., 2007. Untersuchung zu Vorkommen und Bedeutung latenter Infektionen mit dem Felinen Leukämievirus (FeLV) bei Sektionskatzen. *Diss Vet Med. Gießen*.
- Suntz, M., Failing, K., Hecht, W., Schwartz, D., Reinacher, M., 2010. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. *Vet Immunol Immunopathol* 136, 71-80.
- Suzuki, R., Suzumiya, J., Nakamura, S., Aoki, S., Notoya, A., Ozaki, S., Gondo, H., Hino, N., Mori, H., Sugimori, H., Kawa, K., Oshimi, K., 2004. Aggressive natural killer-cell leukemia revisited: large granular lymphocyte leukemia of cytotoxic NK cells. *Leukemia* 18, 763-770.
- Swerdlow, S.H., Cancer, I.A.f.R.o., Organization, W.H., 2008. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *IARC*.

- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T., Nagata, S., 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76, 969-976.
- Takakuwa, T., Dong, Z.M., Nakatsuka, S., Kojka, S., Harabuchi, Y., Yang, W.I., Nagata, S., Aozasa, K., 2002. Frequent mutations of Fas gene in nasal NK/T cell lymphoma. *Oncogene* 21, 4702-4705.
- Tarapore, P., Fukasawa, K., 2002. Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene* 21, 6234-6240.
- Tarapore, P., Horn, H.F., Tokuyama, Y., Fukasawa, K., 2001. Direct regulation of the centrosome duplication cycle by the p53-p21Waf1/Cip1 pathway. *Oncogene* 20, 3173-3184.
- Theilen, G.H., Kawakami, T.G., Rush, J.D., Munn, R.J., 1969. Replication of cat leukemia virus in cell suspension cultures. *Nature* 222, 589-590.
- Theodorou, I., Raphael, M., Bigorgne, C., Fourcade, C., Lahet, C., Cochet, G., Lefranc, M.P., Gaulard, P., Farcet, J.P., 1994. Recombination pattern of the TCR gamma locus in human peripheral T-cell lymphomas. *J Pathol* 174, 233-242.
- Timonen, T., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B., 1981. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 153, 569-582.
- Timonen, T., Ortaldo, J.R., Stadler, B.M., Bonnard, G.D., Sharrow, S.O., Herberman, R.B., 1982. Cultures of purified human natural killer cells: growth in the presence of interleukin 2. *Cell Immunol* 72, 178-185.
- Timonen, T., Saksela, E., 1980. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods* 36, 285-291.
- Tompkins, M.B., Gebhard, D.H., Bingham, H.R., Hamilton, M.J., Davis, W.C., Tompkins, W.A., 1990. Characterization of monoclonal antibodies to feline T lymphocytes and their use in the analysis of lymphocyte tissue distribution in the cat. *Vet Immunol Immunopathol* 26, 305-317.
- Tompkins, M.B., Huber, K., Tompkins, W.A., 1983. Natural cell-mediated cytotoxicity in the domestic cat: properties and specificity of effector cells. *Am J Vet Res* 44, 1525-1529.
- Tompkins, M.B., Ogilvie, G.K., Franklin, R.A., Kelley, K.W., Tompkins, W.A., 1987. Induction of IL-2 and lymphokine activated killer cells in the cat. *Vet Immunol Immunopathol* 16, 1-10.
- Tompkins, M.B., Pang, V.F., Michaely, P.A., Feinmehl, R.I., Basgall, E.J., Baszler, T.V., Zachary, J.F., Tompkins, W.A., 1989. Feline cytotoxic large granular lymphocytes induced by recombinant human IL-2. *J Immunol* 143, 749-754.
- Tompkins, M.B., Tompkins, W.A., 1985. Stimulation of a cell-mediated cytotoxic response to FeLV-induced T cell lymphomas in the cat. *J Immunol* 135, 2817-2823.
- Trinchieri, G., Perussia, B., 1984. Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects. *Lab Invest* 50, 489-513.
- Tsuboi, M., Uchida, K., Park, E.S., Kotera, Y., Seki, T., Takahashi, M., Nakayama, H., 2010. Systemic T cell large granular lymphocyte lymphoma with multifocal white matter degeneration in the brain of a Japanese domestic cat. *J Vet Med Sci* 72, 795-799.
- Vail, D.M., Moore, A.S., Ogilvie, G.K., Volk, L.M., 1998. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med* 12, 349-354.
- Valentine, B.A., Blue, J.T., Zimmer, J.F., Yeager, A.E., McDonough, S.P., 2000. Pulmonary lymphomatoid granulomatosis in a cat. *J Vet Diagn Invest* 12, 465-467.
- Valli, V.E., Jacobs, R.M., Parodi, A.L., Vernau, W., Moore, P.F., 2002. World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals: Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals., Vol VIII. Armed Force Institut of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, DC.
- Van Rhijn, I., Koets, A.P., Im, J.S., Piebes, D., Reddington, F., Besra, G.S., Porcelli, S.A., van Eden, W., Rutten, V.P., 2006. The bovine CD1 family contains group 1 CD1 proteins, but no functional CD1d. *J Immunol* 176, 4888-4893.

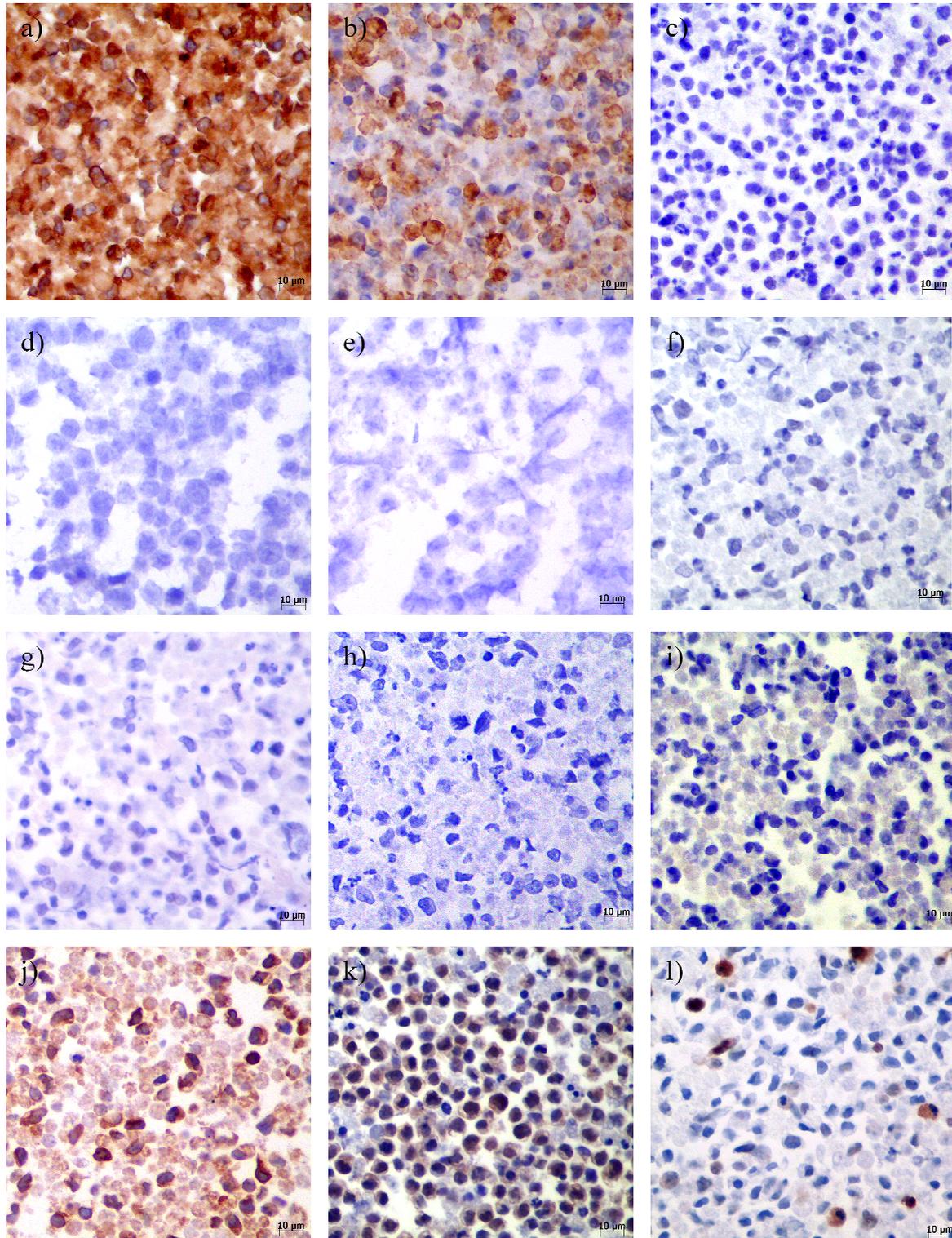
- Vermeulen, B.L., Devriendt, B., Olyslaegers, D.A., Dedeurwaerder, A., Desmarests, L.M., Grauwet, K.L., Favoreel, H.W., Dewerchin, H.L., Nauwynck, H.J., 2012. Natural killer cells: frequency, phenotype and function in healthy cats. *Vet Immunol Immunopathol* 150, 69-78.
- von Erichsen, J., Hecht, W., Lohberg-Gruene, C., Reinacher, M., 2012. Cell lines derived from feline fibrosarcoma display unstable chromosomal aneuploidy and additionally centrosome number aberrations. *Vet Pathol* 49, 648-657.
- Wagner, U., 1998. Ermittlung optimaler Parameter für die in vitro-Stimulation von Hundeblymphozyten mit Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) zur Gewinnung von kaninem Interleukin 2 (IL-2) aus Zellkulturüberständen. *Diss Vet Med. Gießen*.
- Wagner, U., Burkhardt, E., Failing, K., 1999. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. *Vet Immunol Immunopathol* 70, 151-159.
- Walton, R.M., Hendrick, M.J., 2001. Feline Hodgkin's-like lymphoma: 20 cases (1992-1999). *Vet Pathol* 38, 504-511.
- Waly, N., Gruffydd-Jones, T.J., Stokes, C.R., Day, M.J., 2001. The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. *J Comp Pathol* 124, 172-182.
- Waly, N.E., Gruffydd-Jones, T.J., Stokes, C.R., Day, M.J., 2005. Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *J Comp Pathol* 133, 253-260.
- Wang, X.J., Greenhalgh, D.A., Jiang, A., He, D., Zhong, L., Medina, D., Brinkley, B.R., Roop, D.R., 1998. Expression of a p53 mutant in the epidermis of transgenic mice accelerates chemical carcinogenesis. *Oncogene* 17, 35-45.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Nagata, S., 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., Trapani, J.A., 2006. Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol* 84, 72-78.
- Weber, R.G., Bridger, J.M., Benner, A., Weisenberger, D., Ehemann, V., Reifenberger, G., Lichter, P., 1998. Centrosome amplification as a possible mechanism for numerical chromosome aberrations in cerebral primitive neuroectodermal tumors with TP53 mutations. *Cytogenet Cell Genet* 83, 266-269.
- Weiss, A.T.A., 2008. Untersuchungen zur Charakterisierung des feline T-Zell-Rezeptors gamma : Grundlage für die molekulare Diagnose feliner Lymphome durch Analyse klonal rekombinierter Antigenrezeptorgene. *Diss Vet Med. Gießen*.
- Wellman, M.L., Hammer, A.S., DiBartola, S.P., Carothers, M.A., Kociba, G.J., Rojko, J.L., 1992. Lymphoma involving large granular lymphocytes in cats: 11 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc* 201, 1265-1269.
- Whitehead, C.M., Winkfein, R.J., Rattner, J.B., 1996. The relationship of HsEg5 and the actin cytoskeleton to centrosome separation. *Cell Motil Cytoskeleton* 35, 298-308.
- Wood, S.M., Ljunggren, H.G., Bryceson, Y.T., 2011. Insights into NK cell biology from human genetics and disease associations. *Cell Mol Life Sci* 68, 3479-3493.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., el-Deiry, W.S., 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17, 141-143.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D., 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
- Yagita, H., Nakata, M., Kawasaki, A., Shinkai, Y., Okumura, K., 1992. Role of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Adv Immunol* 51, 215-242.
- Yokoyama, W.M., 1995. Natural killer cell receptors specific for major histocompatibility complex class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3081-3085.

- Zanker, D., Xiao, K., Oveissi, S., Guillaume, P., Luescher, I.F., Chen, W.S., 2013. An optimized method for establishing high purity murine CD8(+) T cell cultures. *J Immunol Methods* 387, 173-180.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., Mitchison, T., 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578-583.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., Sen, S., 1998. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20, 189-193.
- Zinkernagel, R.M., 1997. The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. *Scand J Immunol* 46, 421-436.

8 Anhang

8.1 Immunzytologische Untersuchungen

Abbildung 33a-l: Immunzytologische Untersuchungen von S87



Immunzytologie: a) CD3, b) CD45R, c) BLA.36, d) CD4 (Gefrierschnitt), e) CD8 (Gefrierschnitt), f) CD79α, g) NK1, h) CD56, i) FeLV, j) Bcl-2, ka) PCNA, l) Ki-67

Abbildung 34: Positivkontrollen der Gefrierschnitte: a) CD4; b) CD8

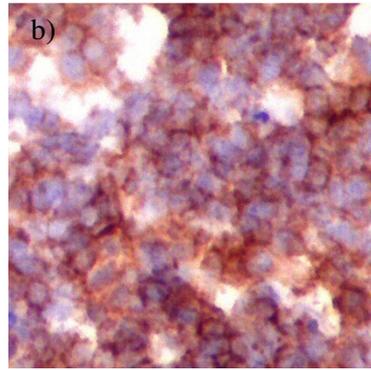
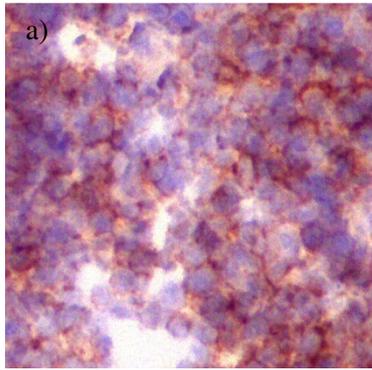
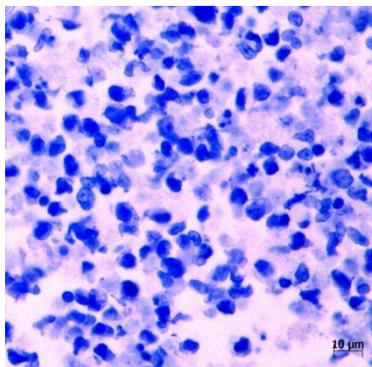


Abbildung 35: Toluidin-Färbung ohne metachromatische Effekte zum Ausschluss von Mastzellen



8.2 Tabellen und Abbildungen

Abbildung 36: Limited-Dilution-Klonierung in einer 96-well-Platte. Vier Tage lang wurde täglich auf ein Wachstum der Zellen in den einzelnen Vertiefungen untersucht. Die einzelnen Graphen repräsentieren dabei jeweils die Zellzahlabweichungen im Versuchsverlauf innerhalb einer Vertiefung. Ein Zellwachstum konnte nicht beobachtet werden.

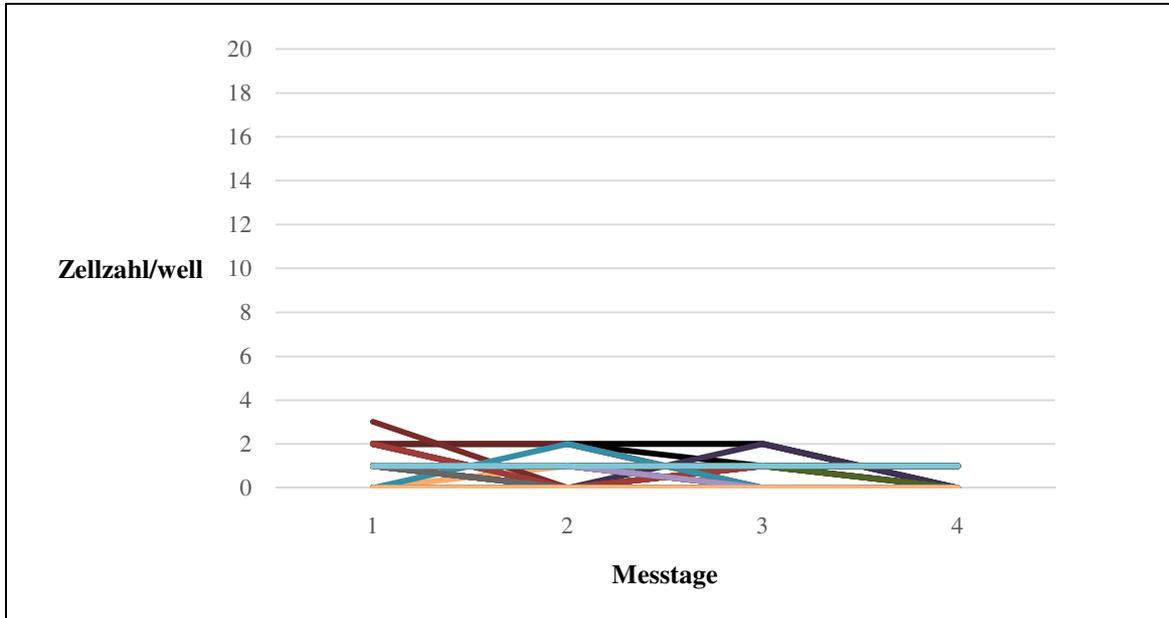


Abbildung 37: Limited-Dilution-Klonierung in einer 96-well-Platte. Die Zellen wurden mit konditioniertem Medium/20 % FCS-Medium (1:1) stimuliert. Vier Tage lang wurde täglich auf ein Wachstum der Zellen in den einzelnen Vertiefungen untersucht. Die einzelnen Graphen repräsentieren dabei jeweils die Zellzahlabweichungen im Versuchsverlauf innerhalb einer Vertiefung. Ein Zellwachstum konnte nicht beobachtet werden.

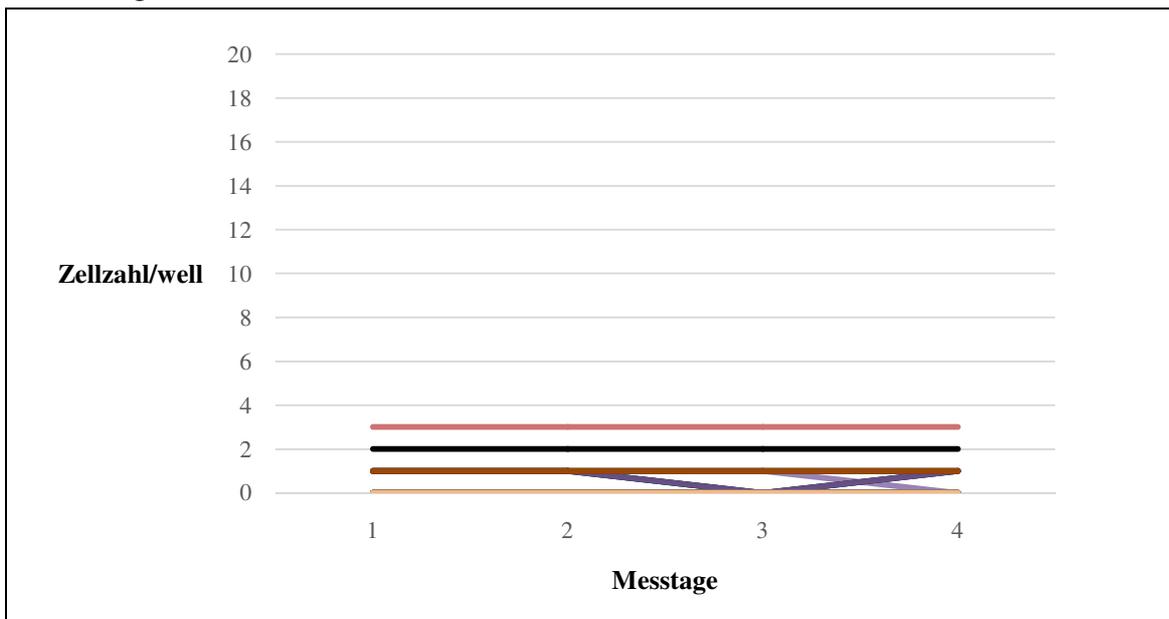


Abbildung 38: Limited-Dilution-Klonierung in einer 96-well-Platte. Die Zellen wurden mit humanem Interleukin 2 (10 U/Vertiefung) stimuliert. Vier Tage lang wurde täglich auf ein Wachstum der Zellen in den einzelnen Vertiefungen untersucht. Die einzelnen Graphen repräsentieren dabei jeweils die Zellzahlabweichungen im Versuchsverlauf innerhalb einer Vertiefung. Ein Zellwachstum konnte nicht beobachtet werden.

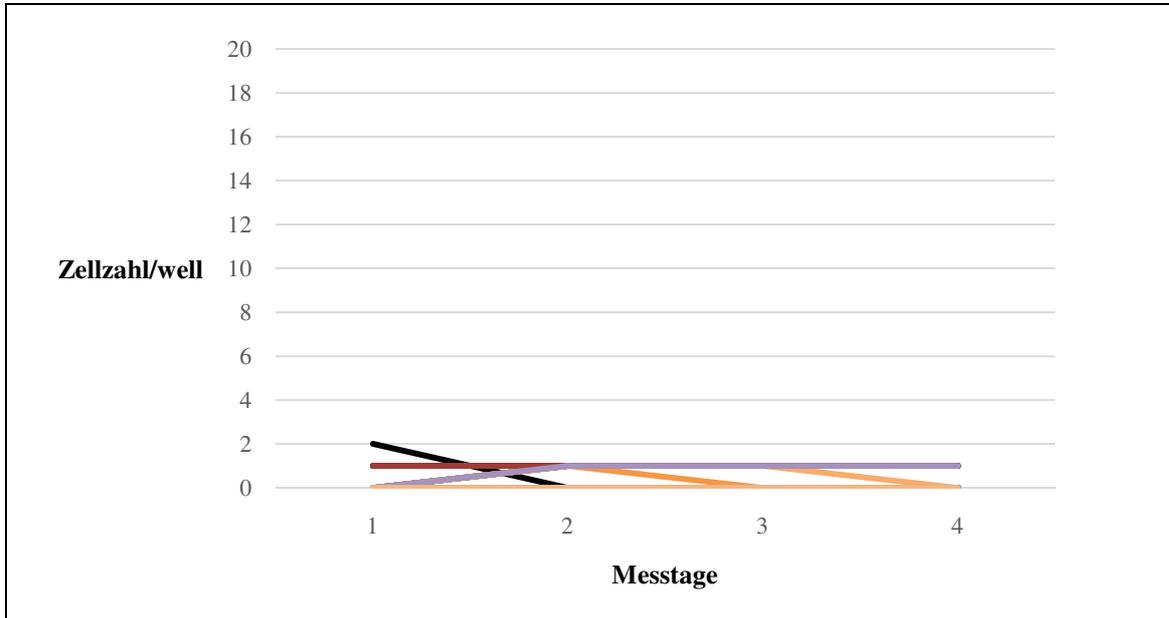


Abbildung 39: Limited-Dilution-Klonierung mit 3 Verdünnungsstufen in einer 96-well-Platte. Die Zellen wurden mit konditioniertem Medium/20 % FCS-Medium (1:1) stimuliert. Vier Tage lang wurde am Stück täglich auf ein Wachstum der Zellen in den einzelnen Vertiefungen untersucht. Es erfolgte anschließend eine weitere Auswertung am 5. Tag und am 6. Tag. Die einzelnen Graphen repräsentieren dabei jeweils die Zellzahlabweichungen im Versuchsverlauf innerhalb einer Vertiefung. Ein Zellwachstum konnte nur in den Vertiefungen beobachtet werden, in denen mehr als 20 Zellen eingesät worden waren.

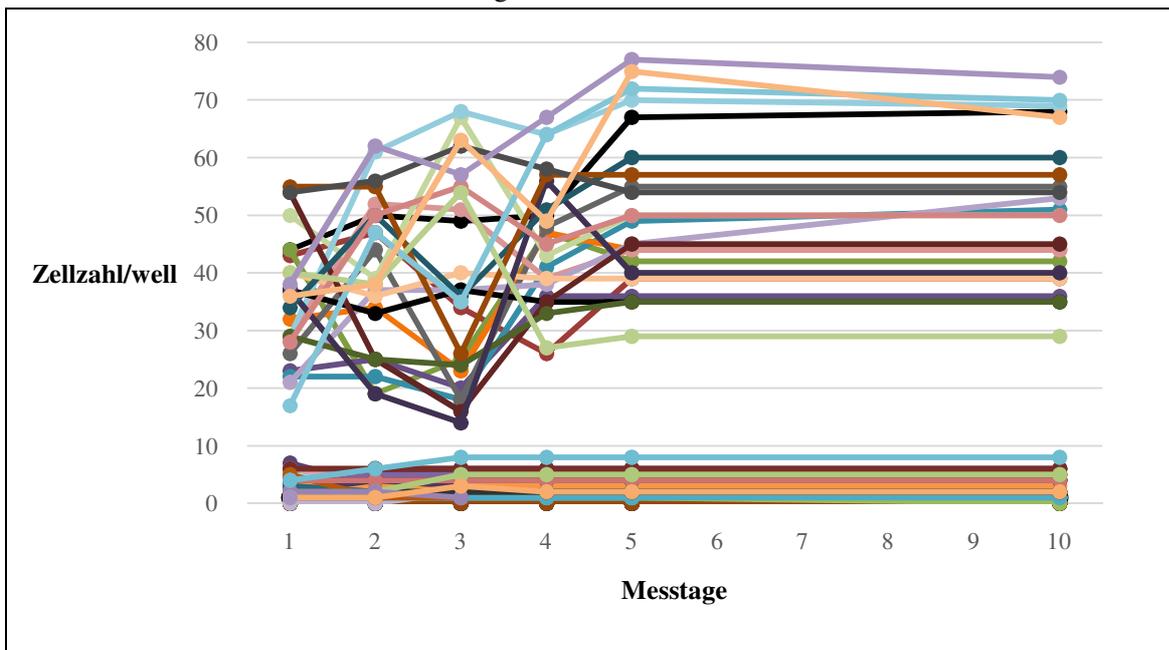


Tabelle 27: Mittelwerte der optische Dichten des Stimulationsversuches ermittelt mit dem ELISA-Reader im Zuge des MTT-Test bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus vier Vertiefungen (OD= optische Dichte).

	\bar{x} OD unstim. Zellen	\bar{x} OD stim. mit kond. Medium/20 % FCS Medium	\bar{x} OD stim. mit II 2	\bar{x} OD stim. mit Con A
1. Messtag	0,0895	0,096	0,112	0,098
2. Messtag	0,18	0,203	0,177	0,19
3. Messtag	0,223	0,264	0,24	0,233
4. Messtag	0,157	0,204	0,152	0,14
5. Messtag	0,162	0,204	0,151	0,14
6. Messtag	0,195	0,239	0,18	0,155

Tabelle 28: RBA-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von S87 (E) gegenüber CTAC (Z) im Verhältnis Z:E 1:50 bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte).

	Kontrolle	1:50	1:50	1:50	1:50	Kontrolle
OD	0,135	0,046	0,1	0,062	0,065	0,202
OD	0,094	0,05	0,088	0,093	0,01	0,162
OD	0,275	0,055	0,075	0,085	0,094	0,261
Zytotox. Aktivität in %: 62						

Tabelle 29: 1. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von S87 (E) gegenüber CTAC (Z) mit verschiedenen Mischungsverhältnissen bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte, Kontr.=Kontrolle).

	Kontr.	E/Z 1:100	E/Z 1:50	E/Z 1:40	E/Z 1:30	E/Z 1:20	E/Z 1:10	Kontr.
OD	0,337	0,146	0,165	0,243	0,276	0,346	0,355	0,41
OD	0,362	0,148	0,176	0,262	0,289	0,354	0,361	0,436
OD	0,358	0,138	0,203	0,239	0,299	0,291	0,418	0,418
Zytotox. Aktivität in %		62	53	36	26	15	6	

Tabelle 30: 2. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von S87 (E) gegenüber CTAC (Z) mit verschiedenen Mischungsverhältnissen bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte, Kontr.=Kontrolle).

	Kontr.	E/Z 1:100	E/Z 1:50	E/Z 1:40	E/Z 1:30	E/Z 1:20	E/Z 1:10	Kontr.
OD	0,429	0,202	0,192	0,265	0,284	0,301	0,344	0,414
OD	0,483	0,165	0,187	0,249	0,289	0,295	0,335	0,41
OD	0,508	0,18	0,168	0,254	0,288	0,329	0,311	0,429
Zytotox. Aktivität in %		60	59	43	36	31	26	

Tabelle 31: 3. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von S87 (E) gegenüber CTAC (Z) im Verhältnis Z:E 1:100 bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte).

	Kontrolle	Kontrolle	1:100	1:100	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
OD	1,012	0,95	0,7	0,048	1,086	1,17	1,161
OD	1,008	0,994	0,019	0,039	1,074	1,15	1,172
OD	0,876	0,999	0,394	0,026	0,933	0,934	1,154
OD	0,895	0,956	0,021	0,024	0,985	1,106	1,017
OD	0,675	1,209	0,11	0,025	1,166	1,059	0,885
OD	0,817	1,098	0,016	0,019	1,185	0,948	0,75
Zytotox. Aktivität in %: 88							

Tabelle 32: 4. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von S87 (E) gegenüber CTAC (Z) im Verhältnis Z:E 1:100 bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte).

	Kontrolle	Kontrolle	1:100	1:100	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
OD	0,795	0,707	0,1	0,442	0,637	0,8	0,575
OD	0,631	0,68	0,199	0,078	0,765	0,811	0,567
OD	0,589	0,778	0,201	0,224	0,775	0,779	0,578
OD	0,635	0,669	0,037	0,176	0,702	0,711	0,429
OD	0,492	0,616	0,468	0,373	0,597	0,572	0,462
OD	0,557	0,57	0,436	0,416	0,529	0,529	0,424
Zytotoxische Aktivität in %: 58							

Tabelle 33: 1. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität des Überstands gegenüber CTAC bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte, Kontr.=Kontrolle).

	Kontr.	Kontr.	Test	Test	Test	Kontr.	Kontr.	Kontr.
OD	1,012	0,95	0,989	1,105	1,087	1,17	1,161	1,086
OD	1,008	0,994	1,029	1,125	1,161	1,15	1,172	1,074
OD	0,876	0,999	1,029	1,02	1,168	0,934	1,154	0,933
OD	0,895	0,956	1,14	1,205	1,066	1,106	1,017	0,985
OD	0,675	1,209	1,179	1,19	0,899	1,059	0,885	1,166
OD	0,817	1,098	1,037	1,02	0,832	0,948	0,75	1,185
Zytotoxische Aktivität in %: -6								

Tabelle 34: 2. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität des Überstands gegenüber CTAC bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte, Kontr.=Kontrolle).

	Kontr.	Kontr.	Test	Test	Test	Kontr.	Kontr.	Kontr.
OD	0,795	0,707	0,805	0,797	0,862	0,637	0,8	0,575
OD	0,631	0,68	0,835	0,77	0,745	0,765	0,811	0,567
OD	0,589	0,778	0,797	0,759	0,698	0,775	0,779	0,578
OD	0,635	0,669	0,689	0,623	0,528	0,702	0,711	0,429
OD	0,492	0,616	0,569	0,55	0,745	0,597	0,572	0,462
OD	0,557	0,57	0,51	0,527	0,523	0,529	0,529	0,424
Zytotoxische Aktivität in %: -8								

Tabelle 35: 1. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von S87 (E) gegenüber Vero-Zellen (Z) im Verhältnis Z:E 1:100 bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte).

	Kontrolle	Kontrolle	1:100	1:100	1:100	Kontrolle	Kontrolle
OD	0,317	0,471	0,128	0,195	0,385	0,519	0,419
OD	0,637	0,614	0,022	0,443	0,183	0,854	0,836
OD	0,792	0,75	0,022	0,151	0,046	0,874	0,806
OD	0,917	0,887	0,032	0,074	0,211	0,826	0,786
OD	1,042	0,902	0,642	1,029	0,545	0,935	0,888
OD	1,035	0,904	0,027	0,285	0,618	0,879	0,867
Zytotoxische Aktivität in %: 64							

Tabelle 36: 2. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von S87 (E) gegenüber Vero-Zellen (Z) im Verhältnis Z:E 1:100 bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte).

	Kontrolle	Kontrolle	1:100	1:100	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
OD	0,891	0,837	0,054	0,449	0,868	0,821	0,789
OD	0,916	0,748	0,139	0,33	0,709	0,724	0,723
OD	0,818	0,807	0,036	0,035	0,829	0,692	0,836
OD	0,779	0,86	0,089	0,126	0,822	0,774	0,864
OD	0,923	0,847	0,114	0,227	0,938	0,855	0,862
OD	0,973	0,904	0,049	0,612	0,876	0,869	0,901
Zytotoxische Aktivität in %: 77							

Tabelle 37: 1. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität des Überstands gegenüber Vero-Zellen bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte, Kontr.=Kontrolle).

	Kontrolle	Kontrolle	1:100	1:100	1:100	Kontrolle	Kontrolle
OD	0,317	0,471	0,784	0,714	0,491	0,519	0,419
OD	0,637	0,614	0,757	0,788	0,791	0,854	0,836
OD	0,792	0,75	0,873	0,775	0,798	0,874	0,806
OD	0,917	0,887	0,826	1,02	0,865	0,826	0,786
OD	1,042	0,902	0,953	0,802	0,838	0,935	0,888
OD	1,035	0,904	0,909	0,927	0,886	0,879	0,867
Zytotoxische Aktivität in %: -5							

Tabelle 38: 2. MTT-Ansatz zu Bestimmung der zytotoxischen Aktivität des Überstands gegenüber Vero-Zellen bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm (OD=optische Dichte, Kontr.=Kontrolle).

	Kontr.	Kontr.	1:100	1:100	1:100	Kontr.	Kontr.	Kontr.
OD	0,891	0,837	0,826	0,799	0,728	0,821	0,789	0,868
OD	0,916	0,748	0,872	0,735	0,825	0,724	0,723	0,709
OD	0,818	0,807	0,853	0,759	0,788	0,692	0,836	0,829
OD	0,779	0,86	0,999	1,265	0,977	0,774	0,864	0,822
OD	0,923	0,847	1,026	0,895	1,012	0,855	0,862	0,938
OD	0,973	0,904	0,851	0,904	0,91	0,869	0,901	0,876
Zytotoxische Aktivität in %: -7								

Tabelle 39: Chromosomenzahl im direkten Vergleich von P10, P80 und PBMC

Chromosomenzahl	Anzahl der Metaphaseplatten mit dieser Chromosomenzahl in P10	Anzahl der Metaphaseplatten mit dieser Chromosomenzahl in P80	Anzahl der Metaphaseplatten mit dieser Chromosomenzahl in PBMC
37	17	3	4
38	90	38	94
39	79	65	2
40	9	84	0
41	4	7	0
42	1	3	0

Tabelle 40: Zahl der Zentrosomen im direkten Vergleich von P10, P80 und PPMC

Zentrosomenzahl	Anzahl der Metaphaseplatten mit dieser Zentrosomenzahl in P10	Anzahl der Metaphaseplatten mit dieser Zentrosomenzahl in P80	Anzahl der Metaphaseplatten mit dieser Zentrosomenzahl in PBMC
1	18	12	30
2	25	24	18
3	7	9	2
4	0	2	0
5	0	3	0
6	0	0	0

Tabelle 41: Übersicht Karyogramme der Passage 10 mit 38 Chromosomen, Gruppeneinteilung der einzelnen Chromosomen entsprechend den Vorgaben der Don Juan Conference (Jones, 1965).

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E	Gruppe F	XX
Karyogramm 1	0	0	1	0	-1	0	0
Karyogramm 2	0	0	1	0	-1	0	0
Karyogramm 3	-1	0	2	-1	0	0	0
Karyogramm 4	0	1	0	-1	0	0	0
Karyogramm 5	0	0	1	-1	0	0	0
Karyogramm 6	1	0	1	-2	0	0	0
Karyogramm 7	0	0	1	-1	0	0	0
Karyogramm 8	0	0	0	1	0	-1	0
Karyogramm 9	-1	-1	2	0	0	0	0
Karyogramm 10	0	0	2	-2	0	0	0

Tabelle 42: Übersicht Karyogramme der Passage 10 mit 39 Chromosomen, Gruppeneinteilung der einzelnen Chromosomen entsprechend den Vorgaben der Don Juan Conference (Jones, 1965).

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E	Gruppe F	XX
Karyogramm 1	0	0	2	-1	0	0	0
Karyogramm 2	1	0	1	0	-1	0	0
Karyogramm 3	0	0	1	0	0	0	0
Karyogramm 4	0	1	1	-1	0	0	0
Karyogramm 5	0	-1	0	0	2	0	0
Karyogramm 6	0	0	1	0	0	0	0
Karyogramm 7	0	1	1	0	-1	0	0
Karyogramm 8	0	0	1	0	0	0	0
Karyogramm 9	0	0	1	0	0	0	0
Karyogramm 10	0	0	1	0	0	0	0

Tabelle 43: Übersicht Karyogramme der Passage 80 mit 39 Chromosomen, Gruppeneinteilung der einzelnen Chromosomen entsprechend den Vorgaben der Don Juan Conference (Jones, 1965).

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E	Gruppe F	XX
Karyogramm 1	0	1	0	0	0	0	0
Karyogramm 2	3	0	2	0	-2	-2	0
Karyogramm 3	1	0	1	0	-1	0	0
Karyogramm 4	0	0	2	0	-1	0	0
Karyogramm 5	-1	0	3	-1	0	0	0
Karyogramm 6	0	0	1	-1	0	0	0
Karyogramm 7	0	0	1	0	0	0	0
Karyogramm 8	0	0	2	-1	0	0	0
Karyogramm 9	0	0	1	0	0	0	0
Karyogramm 10	0	0	1	0	0	0	0

Tabelle 44: Übersicht Karyogramme der Passage 80 mit 40 Chromosomen. Gruppeneinteilung der einzelnen Chromosomen entsprechend der Vorgaben der Don Juan Conference (Jones, 1965).

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E	Gruppe F	XX
Karyogramm 1	0	0	2	0	0	0	0
Karyogramm 2	0	1	2	-1	0	0	0
Karyogramm 3	-1	0	2	0	0	1	0
Karyogramm 4	1	0	2	-1	0	0	0
Karyogramm 5	0	0	2	1	-1	0	0
Karyogramm 6	0	1	1	0	0	0	0
Karyogramm 7	0	1	1	0	0	0	0
Karyogramm 8	0	0	2	1	-1	0	0
Karyogramm 9	0	0	2	0	0	0	0
Karyogramm 10	-1	0	1	2	0	0	0

Tabelle 45: Zusammenfassung der chromosomalen Abweichungen aller analysierten Karyogramme der S87-Zelllinie. Zuordnung der einzelnen Chromosomen zu den Gruppen entsprechend der Vorgaben der Don Juan Conference (Jones, 1965).

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E	Gruppe F	XX
zu wenige	5	2	0	13	8	1	0
korrekt	30	31	4	23	30	37	40
zu viele	5	7	36	4	2	2	0

8.3 Lösungen, Puffer und Bezugsquellen

8.3.1 Bezugsquellen für Chemikalien, Kits, Seren, Antiseren, Antikörper und Geräte (Katalognummer/Bestellnummer)

AppliChem, Gatersleben

Tris-Puffer pH8 (1M) (A45770500)

Biochrom AG seromed, Berlin

Colcemid[®] (Colchizin) in PBS, 25 ml (L6221)

Chromosomenmedium A (F5030)

Pokeweed Mitogen (M5030)

Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf

Biozym LE Agarose (840004)

Midori Green (617004)

Carl Roth, Karlsruhe

4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI (6335.2)

Aceton (9372.3)

Ameisensäure (4734.1)

Ammonia solution, reinst (5460.3)

Borsäure $\geq 99,8 \%$, p.a. (6943.3)

Essigsäure 100 %. Rotipuran[®] (3738.4)

EDTA-Dinatrium-Dihydrat p.a. (9065.4)

Ethanol Rotipuran[®] (9065.4)

Formaldehyd (P733.3)

Isopropanol (9866.4)

Dinatriumhydrogenphosphat (P030)

Methanol Rotipuran[®] $\geq 99,8 \%$ (4627.1)

Roti[®]-Histol (6640.2)

Roti[®]-Plast (Schmelzpunkt 56-58 °C) (PL003S2K)

Trypanblaupulver für Mikroskopie (C.I. 23850)

Xylol-Ersatz, Roti-Histol[®] (6640.3)

Zitronensäure (X863)

Custom Monoclonals Int.; Sacramento, CA,USA

Maus α -p27, Klon PF12J-10A

Maus α -gp70, Klon C11D82i

Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

Kaninchen α -Maus IgG-PO (P0161)

Monoclonal Mouse Anti-Human CD79 α cy/APC, Klon HM57 (C7252)

Monoclonal Mouse Anti-Human natural killer cell-like, Klon NK1 (M1014)

Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Klon PC10 (M0879)

Polyklonal Rabbit Anti-Human CD3 (A0452)

Schwein Anti-Kaninchen IgG (P0161)

Target Retrieval (S169984-2)

Dianova, Hamburg

Cy3-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)

TUF[®] (Target Unmasking Fluid)

PAP vom Kaninchen (323-005-024)

PAP von der Maus (N223005024)

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bacto[®] Agar

Flow Laboratories, Irvine, Schottland

Dulbecco's modification of Eagle's Medium with Glutamine (10-331-26)

Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte

6 x DNS Loading Dye (R0611)

FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (EF0654)

Längenstandard pUC Mix Marker 8 (SM0301)

Längenstandard pUC 19 DNS (SD0061)

Fluka, Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm

Epon 812 (45345)

Eponhärter 2-Dodecenyln-bernsteinsäureanhydrid (DDSA) (45346)

Eponbeschleuniger (2,4,6 – Tris(dimethylaminomethyl)-phenol) (DMP-30) (45348)

GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Ficoll-Paque® PLUS (17-1440-02)

Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt

Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), no phenolred, no calcium, no magnesium (14175-053)

RPMI 1640 with L-Glutamin, with Phenolrot (11875-093)

Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe

Streptavidin HRPO Conjugate (SA1007)

Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

CD56 (NCAM), Klon CD564 (NCL-CD56-504)

Linaris, Dossenheim

Rat Anti-Mouse CD45R, Klon RA3-6B2 (ADI-MCD045R-B)

Merck KGaA, Darmstadt

Brenztraubensäure Natriumsalz (Na-Pyruvat) (6619)

Dimethylsulfoxid (802912)

Dinatriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$). (6580)

Entellan (1079610500)

HCl Trisitol® (1.09956.0001)

Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenlaulösung) (1092040100)

Kaliumchlorid (max. 0,005 % BR) zur Analyse (6580)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (4873)

Natriumchlorid (1.06400.5000)

Papanicolaous Lösung 1 b Hämatoxylinlösung S (1.09254.2500)

Perhydrol® 30 % H_2O_2 p.a. (1.07210.0250)

MoBiTec GmbH, Göttingen

AquaGenomic™ (2030MT)

Novocastra; Newcastle Upon Tyne, UK

Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein, Klon 100/D5 (NCL-L-bcl-2)

O. Kindler, Freiburg I. Br.

Eukitt®, Einschlussmittel für mikroskopische Technik

Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim

Humanes Interleukin 2 (11147528001)

Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Einbettmedium (4583)

Serotec, Kidlington, UK

Maus Anti-Katze CD8 (α - und β -Kette des CD8), Klon vpg 9 (MCA 1347)

Maus Anti-Katze CD4, Klon vpg 38 (MCA 1350)

Serva GmbH, Heidelberg

Triton X-100 (39795.02)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) (D-5637)

Concanavalin A (C5275)

Imidazol (56750)

Monoclonal Anti- γ -Tubulin, Clone GTU-88 (T6557)

MTT-Formazan (M2128)

Rose Bengal (330000)

Trypsin from hog pancreas 127 U/mg

SouthernBiotech, Birmingham, USA

Goat Anti-Mouse, FITC (1070-02)

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10 mg in normal saline), 100 ml (P11-010)

Foetal Bovine Serum, 500 ml (A15-151)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

RPMI 1640 with L-Glutamine, with Phenol Red (E15-840)

Pferdeserum

Ziegenserum

Rattenserum

Schweineserum

Quiagen, Hilden

Quiagen QuAntiTect Antisense Transcription Kit

Quiagen[®] Multiplex PCR Kit

Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

Biot. Rabbit Anti-Rat IgG (H+L), Moused absorbed (BA-4001)

Biot. Horse Anti-Mouse IgG (H+L) (BA-2000)

Biot. Goat anti Rabbit IgG H+L (BA-1000)

ABC-Komplex, Peroxidase Standard (PK-4000)

8.3.2 Bezugsquellen für Geräte und Verbrauchsmaterialien

Biozym Diagnostic AG, Berlin

Multicycler PTC 200

Gelkammer Easyphor Medi

Carl Roth, Karlsruhe

Aluminiumfolie (2596.1)

Neubauer-Zählkammer (T729.1)

Rotilabo[®] Spritzenfilter 0,45 µm, 33 mm (KH55.1)

Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, USA

24 mm Transwell, 3 µm Porengröße Polycarbonat (3410)

96 mm Transwell 3 µm Porengröße Polycarbonat (3386)

Eppendorf GmbH, Hamburg

Eppendor fzentrifuge 5415C

Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg

FACS-Calibur[™]

Fa. Tecnomara GmbH, Fernwald

Absaugpumpe, Vacuboy[®]

Abflammgerät, Fireboy[®]

Heraeus Instruments/Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold

Sicherheitswerbank (LaminAir)

Hettich Lab Technology, Tuttlingen

Zentrifuge Mikroliter

Labnet International, Edison, New Jersey, USA

Spectrafuge™ Mini, Laboratory Centrifuge C1301B

R. Langenbrinck, Teningen

SuperFrost® Plus Objektträger (03-0060)

Polysine™ Objektträger (03-0070)

Leica biosystems Nussloch GmbH, Nussloch

Rotationsmikrotom RM 2255

Life Science International, Frankfurt am Main

Coverplates™ 721100013

Merck KGaA, Darmstadt

Amicon Ultra Centrifugal Filter (0,5 ml) (UFC 503096)

MWG Biotech, Ebersberg

Spannungsquelle für Elektrophorese Powersupply PPS 200-1D

Nikon GmbH, Düsseldorf

Nikon Eclipse 80i

Program NIS-Elements BR 3.2

Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Nunc Cryo Tube Rack (376589)

Nalgene® Cryo 1 °C Freezing Container (5100-0001)

Nunc Cryotubes 1,8 ml (368632)

Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg

Olympus IX70

Reichert-Jung, Nußloch

Kryomikrotom Frigocut 2700

Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

Tissue-Tek® TEC™ Paraffinausgießstation mit Kühlplatte (5229)

Tissue-Tek® VIP.™ Gewebereinbettungsautomat (5905)

Sarstedt, Nümbrecht

Schraubröhre 15 ml, 120 x 17 mm, Spitzboden (62.554.512)

Schraubröhre 50 ml, 114 x 28 mm, Spitzboden (62.547.254)

Gewebekulturflaschen mit Belüftung, 25 cm² (831810002)

Gewebekulturflaschen mit Belüftung, 75 cm² (831813002)

Eppendorfgefäße, Safeseal Gefäß (72.706)

Pipettenspitzen Biosphere Fil. TIP 10 µl farblos, 70.1116.210

Pipettenspitzen Biosphere Fil. TIP 100 µl gelb, 70.760.212

Pipettenspitzen Biosphere Fil. TIP 200 µl gelb, 70.760.213

Pipettenspitzen Biosphere Fil. TIP 1250 µl farblos, 70.1186.210

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

IKA® MS1 Shaker

Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode im Harz

Zentrifuge 4K15C

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

NanoDrop 2000c

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

6-well-Platten mit flachem Boden

24-well-Platten mit flachem Boden

96-well-Platten mit flachem Boden

Vogel Wilhelm GmbH, Gießen

TissueTec® Eindeckfilm

8.3.3 Lösungen und Puffer

Phosphat-buffered saline (pH 7,4)

8 g NaCl

1,42 g Na₂HPO₄

0,2 g KCL

Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit 1N NaOH/1N HCl

Zellkultur

Ansätze für die Weichagar-Mixtur

7,5%ige Natriumhydrogenkarbonatlösungen (NaHCO₃)

4,5 g NaHCO₃

ad 60 ml Reinstwasser

DMEM 10x konzentriert:

90 ml Reinstwasser in steriles Gefäß mit sterilem Magnetrührer geben

DMEM-Pulvermedium (Flow Laboratories, Irvine, Schottland) einrühren

ad 100 ml mit Reinstwasser

DMEM 1x komplett:

10 ml DMEM 10x konzentriert

4,93 ml 7,5% NaHCO₃

2 ml Glutamin (200mM,)

1 ml Na-Pyruvat (100mM,)

1 ml Gentamycin (5 mg/ml,)

ad 100 ml mit Reinstwasser auffüllen

mit 1N NaOH/1N HCl auf einen pH von 7,2 einstellen und anschließend steril filtrieren

DMEM 2x:

20 ml DMEM 10x

ad 100 ml mit Reinstwasser auffüllen und steril filtrieren

Immunhistologie

Tris-buffered saline (pH 7,6)

Stammlösung (10x):

60,57 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

610 ml Aqua dest.

390 ml 1 N HCl

Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit 1 N HCl

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml NaCl 0,8 % in Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit 1N NaOH/1N HCl

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol

ad 1000 ml Aqua dest.

500 ml 0,1 M HCl

Einstellen des pH-Wertes auf 7,1 mit 0,1 M HCl

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure

21,01 g Zitronensäure x H₂O

ad 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 0,1 M Natriumzitat

24,91 g Trinatriumzitat x H₂O

ad 1000 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen

pH-Wert mit 1 N HCl auf pH 6,0 einstellen

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB)

100 mg DAB

200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1)

Mit Magnetrührer mischen, anschließend mittels eines Trichters und eines Filterpapiers

(Filterpapier MN 615 ¼, Ø 320 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) filtrieren und

unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30 % H₂O₂ (Merck KGaA, Darmstadt.) zugeben

Kardasewitsch

200 ml 25% Ammoniaklösung

800 ml 70% Ethanol

Papanicolaos Gebrauchslösung

Papanicolaos Hämatoxylin 1b und Aqua dest. im Verhältnis 1:10 mischen und anschließend filtrieren

Chromosomenpräparation

0,075 KCL

2,8 g KCL

ad 500 ml mit Aqua dest.

Trypsin Gebrauchslösung

200 mg Trypsin in 200 ml PBS-Puffer frisch angesetzt

McIlvain's Puffer

Lösung A: 0,1 M Zitronensäure (Carl Roth, Karlsruhe)

Lösung B: 0,2 M di-Natriumhydrogenphosphat*2H₂O

Arbeitspuffer: 35,2 ml Lösung A + 164,8 ml Lösung B

Prämix

1,1 ml Pokeweed Mitogene

100 ml Chromosomenmedium A

Transmissionelektronenmikroskopie

0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,3, 300 mOsm

21,4 g Cacodylsäure Natrium-Salz Trihydrat

ad 1000 ml Aqua dest.

pH mit 1 N HCL einstellen und bei 4 °C aufbewahren

0,166 M Cacodylatpuffer, pH 7,3, 300mOsm

35,5 g Cacodylsäure Natrium-Salz Trihydrat

ad 1000 ml Aqua dest.

pH mit 1 N HCL einstellen und bei 4 °C aufbewahren

1,5 % Glutaraldehydlösung

0,6 ml 25 % Glutaraldehyd
9,4 ml 0,1 M Cacodylatpuffer
frisch ansetzen

1 % Osmiumtetroxid-Lösung

5 ml 2 % Osmiumtetroxidlösung
5 ml 0,166 M Cacodylatpuffer
Lösung in fest verschlossener Flasche bei 4 °C im Dunkeln aufbewahren

Epon-Einbettkunstharz Bestandteile aufwärmen auf 60 °C

47,5 ml Glycidäther 100 Epon®
20 ml Eponhärter 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (DDSA)
31 ml Härter MNA
1,5 ml Eponbeschleuniger (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol)

Molekularbiologische Untersuchungen:

5 x TBE-Puffer

54,0 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
27,5 g Borsäure
4,15 g EDTA-Na₂
ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

10 mM Tris

121,14 mg Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ad 100 ml Aqua dest.
gründlich vermischen bis alle Feststoffe gelöst sind und bei 121 °C 20 min autoklavieren

2 %iges Agarosegel für eine mittlere Kammer

2,2 g Agarose mit 0,5x TBE (5x TBE 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) auf 110 g auffüllen und unter rühren bis zur vollständigen Auflösung erhitzen. Im Anschluss das Agarose-Puffer-Gemisch kurze Zeit abkühlen lassen und 3,6 µl Midorri Green (1:10) hinzu geben. Gel möglichst blasenfrei in die Gelkammer gießen. Nachdem das Gel festgeworden ist, kann der Kamm entfernt werden.

9 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
Aqua dest.	Aqua destillata
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
Bcl-2	B-Zell lymphoma 2
BLA.36	B lymphocyte antigen 36
bp	base pair
CD	cluster of differentiation
cDNS	Complementary DNS
CTAC	canine thyroid adenocarcinoma
CTL	cytotoxic T-Cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FelV	Felines Leukämievirus
FFPE	Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe
FIV	Felines Immundefizienzvirus
g	Gramm
HE	Hämatoxilin-Eosin
IPO	Indirekte Peroxidase
LGL	Large Granular Lymphocyte
M	molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minute
ml	Milliliter
NK	Natürliche Killer Zellen
NKT	Natürliche Killer T-Zellen
RT	Raumtemperatur
p. a.	pro analysem
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)

Abkürzungsverzeichnis

RT	Reverse Transkription
Sek	Sekunden
TCR	T-Zell-Rezeptor
TRA	Gene des T-Zell-Rezeptor α
TRB	Gene des T-Zell-Rezeptor β
TRD	Gene des T-Zell-Rezeptor δ
TRG	Gene des T-Zell-Rezeptor γ
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUF	Target Unmasking Fluid
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Wdh.	Wiederholung
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Ich danke herzlich

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation.

Manfred Henrich für seine Betreuung, die unermüdlichen Versuche mich in die Geheimnisse der Computerwelt einzuführen und die Hilfe, ohne die diese Dissertation niemals zu Stande gekommen wäre.

Werner Hecht und Silke Engel dafür, dass ihr immer ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art hattet und einem stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt.

Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt für sein Interesse, seine Herzlichkeit, seine Ideen und seine Hilfe.

Allen MitarbeiterInnen des Instituts für Veterinär-Pathologie, die mich so freundlich in aufgenommen und unterstützt haben.

Frau Hild für die Einführung in die Welt der Elektronenmikroskopie.

Katharina Kerner für ihre Hilfe bei der Durchflusszytometrie und deren Auswertung.

Michelle Klymiuk für seine Ratschläge und den Austausch an Ideen.

Renate Deinzer für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Svenja Scheffold für das wertvollste Erbe und deine Freundschaft.

Den Dieters (Nadine, Julia, Sabrina, Manuela und Julia), die viel mehr Freunde als nur Kollegen sind. Danke, dass ihr immer mit mir lacht, weint, schimpft und für mich da seid.

Jana dafür, dass du eine Bereicherung für unser Team bist.

Gundi und Dieter für eure Unterstützung und auch sonst für alles.

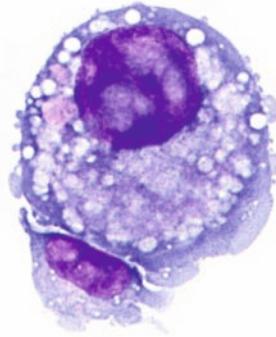
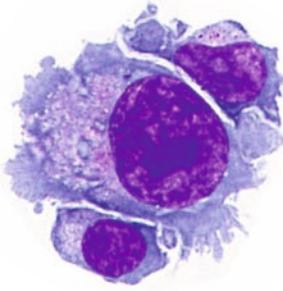
Nadine für die verwandte Seele.

Kiwi und Tilda für stets willkommene Ablenkung.

Ganz besonderer Dank an meine Eltern, die mich immer bei allem unterstützt haben und ohne die ich nicht da wäre, wo ich jetzt bin.

Karsten dafür, dass es dich gibt, für dein Verständnis, deine Hilfe und einfach für alles!

Das Dissertationsprojekt wurde unterstützt durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6395-5



9 783835 196395 5