

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie  
Charité-Virchow-Klinikum  
Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
(Direktor: Prof. Dr. med. B. Dörken)

## HABILITATIONSSCHRIFT

# **Molekulare Defekte in der Pathogenese maligner Lymphome und neue therapeutische Ansätze**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach  
Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Dr. med. Franziska Jundt  
geboren am 20. Oktober 1970 in Heidelberg

Dekan: Professor Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Professor Dr. med. Alfred C. Feller  
2. Professor Dr. med. Wolfgang Hiddemann

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 21. November 2005

## Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassende Darstellung des Habilitationsthemas .....	3
1.1.	Einleitung .....	3
1.1.1.	Hodgkin-Lymphome .....	3
1.1.1.1.	Klinische und histopathologische Manifestationen des Morbus Hodgkin.....	3
1.1.1.2.	Abstammung und Klonalität von Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen .....	3
1.1.1.3.	Abhängigkeit der Zytokinexpression, Proliferation und Apoptoseresistenz der Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen von konstitutiver NF- $\kappa$ B Aktivität .....	4
1.1.1.4.	Neonatal letaler Phänotyp von I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienten Mäusen.....	5
1.1.2.	Notch Signalweg .....	7
1.1.3.	Multiple Myelome.....	9
1.2.	Molekulare Defekte in der Pathogenese maligner Lymphome – Eigene Arbeiten und Diskussion .....	11
1.2.1.	Hodgkin-Lymphome .....	11
1.2.2.	Mausmodell.....	16
1.2.2.1.	Transplantation von fötalen hämatopoetischen Stammzellen aus der Leber I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienter (I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>-/-</sup> ) Mäuse in B-Zell defiziente Rezipienten .....	16
1.2.2.2.	Histologische und immunologische Untersuchung der I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>-/-</sup> Stammzell- rezipienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation .....	17
1.2.2.3.	Interaktion des NF- $\kappa$ B und Notch Signalwegs: Analyse im Mausmodell.....	18
1.2.3.	Multiple Myelome.....	21
1.3.	Neue therapeutische Ansätze in der Behandlung maligner Lymphome – Eigene Arbeiten und Diskussion.....	23
1.3.1.	Sekretase Inhibitoren .....	23
1.3.2.	Rapamycin Derivate (Everolimus, RAD) .....	25
1.4.	Literatur .....	28
1.5.	Zusammenfassung .....	34
2.	Originalarbeiten zum Habilitationsthema.....	36
3.	Danksagung.....	38
4.	Lebenslauf .....	40
5.	Eidesstattliche Versicherung.....	44

# **1. Zusammenfassende Darstellung des Habilitationsthemas**

## **1.1. Einleitung**

### **1.1.1. Hodgkin-Lymphome**

#### **1.1.1.1. Klinische und histopathologische Manifestationen des Morbus Hodgkin**

Der Morbus Hodgkin ist eine maligne Lymphomerkkrankung, die mit generalisierten Lymphomen und Splenomegalie einhergeht und häufig mit sogenannten B-Symptomen wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust verbunden ist. In einem fortgeschrittenen Ausbreitungsstadium findet man einen disseminierten Befall verschiedener extralymphatischer Organe wie Leber, Lunge, Pleura, Knochen, Knochenmark und Haut.

Hodgkin-Lymphome fallen besonders durch ihre charakteristische Histologie auf. Sie bestehen zum überwiegenden Teil aus nicht malignen reaktiven Entzündungszellen wie Lymphozyten, Eosinophilen, Neutrophilen, Plasmazellen, Histiocyten und Stromazellen. Interessanterweise sind nur bis zu 1 % der Zellen im Gewebe Tumorzellen sogenannte Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen (Kaufman and Longo 1992; Poppema, Kaleta et al. 1992; Hsu and Hsu 1994). Die Charakterisierung der Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen war auf Grund ihres geringen Anteils am Tumorgewebe lange Zeit schwierig. Durch die Methode der Mikromanipulation von Einzelzellen konnte jedoch die Arbeitsgruppe von Rajewsky in den letzten Jahren wegweisende Ergebnisse im Hinblick auf Klonalität und Abstammung dieser Tumorzellen liefern (Kuppers and Rajewsky 1998).

#### **1.1.1.2. Abstammung und Klonalität von Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen**

Die Differenzierung naiver B-Zellen findet in Keimzentren lymphatischer Organe statt. Im Zusammenspiel mit Keimzentrum-T-Helferzellen und folliculären dendritischen Zellen durchlaufen diese B-Zellen einen Reifungsprozess, bei dem sie auf Grund ihrer Affinität zum immunisierenden Antigen selektioniert werden. Während dieses Prozesses werden durch somatische Hypermutation eine Vielzahl einzelner Nukleotide in den Immunglobulin-V-Genen ausgetauscht; die entsprechend unterschiedlichen variablen Regionen der Immunglobuline, der Antigenrezeptoren, bestimmen jeweils deren Affinität zum präsentierten Antigen. B-Zellen mit hoher Antigenrezeptor-Affinität werden stimuliert und dadurch positiv selektioniert. B-Zellen mit vergleichsweise geringer Affinität zum Antigen gehen hingegen durch Apoptose zugrunde (Kuppers and Rajewsky 1998).

Durch die Methode der Mikromanipulation von Einzelzellen konnten B-Zellen der Keimzentren mittels PCR-Amplifikation auf Mutationen in ihren Immunglobulingenen analysiert werden. Aus derartigen Einzelzelluntersuchungen von Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen aus Lymphknoten des klassischen und lymphozytenreichen Subtyps geht hervor, dass es sich bei diesen Tumorzellen um eine klonale Population von Keimzentrum-B-Zellen handelt. Obwohl in den Tumorzellen des klassischen Subtyps unproduktive sogenannte "verkrüppelnde" Mutationen in den Immunglobulingenen auftreten, werden sie dennoch nicht durch Apoptose aus dem Keimzentrum eliminiert (Kuppers, Rajewsky et al. 1994; Kanzler, Hansmann et al. 1996; Kanzler, Kuppers et al. 1996). Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen sind offensichtlich durch Fehlregulation oder molekulare Defekte effizient vor Apoptose geschützt.

### **1.1.1.3. Abhängigkeit der Zytokinexpression, Proliferation und Apoptoseresistenz der Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen von konstitutiver NF- $\kappa$ B Aktivität**

Obwohl verschiedene Hodgkin-Zelllinien und primäre Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen eine heterogene Population im Hinblick auf ihre geno- und phänotypischen Eigenschaften darstellen, können das klinische Bild sowie die histopathologischen Befunde beim Morbus Hodgkin auf die Gemeinsamkeit einer deregulierten Expression von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren zurückgeführt werden. In unserer Arbeitsgruppe in der Abteilung von Professor Dörken wurde ein allen Hodgkin-Zelllinien und primären Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen gemeinsames Charakteristikum, die konstitutive Kernbindeaktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, beschrieben. Diese konstitutive Aktivität kann die deregulierte Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren der Tumorzellen erklären, die zu den typischen klinischen und pathologischen Veränderungen beim Morbus Hodgkin führen (Bargou, Leng et al. 1996).

Die in dieser Habilitationsschrift vorgestellten eigenen Arbeiten zeigen, dass die Produktion von TNF- $\alpha$  durch Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen beispielsweise in den Fibroblasten der Hodgkin-Lymphome die Expression des Chemokins Eotaxin stimuliert (Jundt, Anagnostopoulos et al. 1999). Eotaxin lockt spezifisch Eosinophile und Th2-Zellen ins Gewebe und trägt damit zu der charakteristischen Pathobiologie von Hodgkin-Lymphomen bei (Jundt, Anagnostopoulos et al. 1999).

Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivität für die Proliferation, Apoptoseresistenz und das Wachstum von Hodgkin-Zelllinien in SCID-Mäusen verantwortlich ist (Bargou, Emmerich et al. 1997). Diese Daten liefern einen wichtigen Hinweis auf die Bedeutung von NF- $\kappa$ B für die Pathogenese des Morbus Hodgkin. Die

Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B Familie werden in erster Linie durch die Inhibitormoleküle I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  kontrolliert. In zwei von sieben etablierten Hodgkin-Zelllinien konnten wir Mutationen im I $\kappa$ B $\alpha$  Gen nachweisen (Krappmann, Emmerich et al. 1999; Emmerich, Meiser et al. 1999). Diese Mutationen führen zur Expression von C-terminal trunkierten Proteinen, die funktionell defekt sind, und dadurch die Ursache für die deregulierte NF- $\kappa$ B Aktivität in den Tumorzellen sein könnten. Auch bei einem von insgesamt 10 untersuchten Patienten konnten wir mittels Mikromanipulation von Einzelzellen und genomischer PCR eine I $\kappa$ B $\alpha$  Mutation nachweisen, die einem C-terminal trunkierten I $\kappa$ B $\alpha$  entspricht (Emmerich, Meiser et al., 1999). Für einen Teil der Hodgkin-Lymphome könnten demnach Mutationen von I $\kappa$ B $\alpha$  die Ursache für die deregulierte NF- $\kappa$ B Aktivität in den Tumorzellen sein.

Da Hodgkin-Lymphome sich nur zum geringeren Teil aus den eigentlichen Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen zusammensetzen, zum überwiegenden Teil aber aus nicht malignen hämatopoetischen Entzündungszellen bestehen, können Untersuchungen an Hodgkin-Tumorzelllinien nicht allein zur Klärung der pathogenetischen Bedeutung der konstitutiven NF- $\kappa$ B Aktivität dienen. Infiltrierende Entzündungszellen wie z.B. T-Lymphozyten und Eosinophile interagieren mit den Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen, übertragen Proliferations- und Anti-Apoptose-Signale und sind dadurch wichtige Elemente in der Regulation des Tumorwachstums. Experimente mit Tumorzelllinien können deshalb nur eine erste Annäherung sein, die Pathobiologie dieses Lymphoms zu untersuchen. Zudem lässt sich nur durch Untersuchungen in vivo z.B. am Mausmodell zeigen, ob für die maligne Transformation von Keimzentrum-B-Zellen zu Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B ausreichend ist oder ob weitere molekulare Defekte hinzukommen müssen. Im Folgenden wird beschrieben, auf welche Weise durch bereits etablierte Transplantationsmodelle in der Maus eine Untersuchung der oben genannten Fragestellungen möglich ist.

#### **1.1.1.4. Neonatal letaler Phänotyp von I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienten Mäusen**

Hämatopoetische Zellen aus Milz und Thymus, die für den NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  defizient sind, weisen eine konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivität auf. Dies konnte durch die homozygote Inaktivierung von I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>-/-</sup>) im Mausmodell gezeigt werden (Beg, Sha et al. 1995; Klement, Rice et al. 1996). I $\kappa$ B $\alpha$ -defiziente Mäuse besitzen einen Phänotyp, der durch Kachexie, Hautdefekte und eine gesteigerte Granulopoese gekennzeichnet ist (Beg, Sha et al. 1995; Klement, Rice et al. 1996). Die Tiere sterben um den 8. Lebenstag (Beg, Sha et al. 1995; Klement, Rice et al. 1996). Wegen dieser frühen Letalität im Neonatalstadium können die Auswirkungen einer konstitutiven NF- $\kappa$ B Aktivität auf Entstehung und Entwicklung hämatopoetischer Zellen in der

adulten Maus nicht untersucht werden. Durch den Transfer von fötalen hämatopoetischen Stammzellen aus der Leber I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienter Donoren in subletal bestrahlte B-Zell defiziente Rezipienten können hämatopoetische Zellen ausreifen. In den Rezipienten kann dann die Funktion von konstitutiv aktivem NF- $\kappa$ B für Reifung und Aktivierung von B-Zellen verfolgt werden. Derartige Transplantationsexperimente sind bereits mit fötalen Stammzellen aus der Leber von NF- $\kappa$ B p50/p65 defizienten Mäusen erfolgt (Horwitz, Scott et al. 1997; Doi, Takahashi et al. 1997). Die homozygote Inaktivierung von p50 und p65 führt ebenfalls zu einem embryonal letalen Phänotyp. Nach Transplantation der p50<sup>-/-</sup> und p65<sup>-/-</sup> hämatopoetischen Stammzellen konnte dann die Entwicklung und Differenzierung aller hämatopoetischen Linien in den Rezipienten untersucht werden. Die Lymphopoese von p50/p65 defizienten B- und T-Lymphozyten und deren Vorläuferzellen ist erheblich eingeschränkt, wohingegen sich die Granulopoese in Abwesenheit von p50 und p65 normal entwickelt (Horwitz, Scott et al. 1997). In dem hier beschriebenen Transplantationsmodell kann außerdem das Zusammenspiel verschiedener beim Morbus Hodgkin möglicherweise relevanter molekularer Defekte der Tumorzellen analysiert werden. Dies kann durch retrovirale Transduktion der I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienten Stammzellen mit zusätzlichen B-Zell transformierenden Faktoren erfolgen. Anschließend können die transduzierten hämatopoetischen Stammzellen entsprechend dem oben dargestellten Modell transplantiert und die Entwicklung der Hämatopoese untersucht werden.

In Kapitel 1.2.2. wird ein Mausmodell beschrieben, das im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde und die Analyse und Bedeutung von molekularen Defekten, wie z.B. einer permanenten NF- $\kappa$ B Aktivität, für die Pathogenese der Tumorzellen in Hodgkin-Lymphomen erlaubt.

### 1.1.2. Notch Signalweg

Unsere eigenen Arbeiten (Kapitel 1.2.1. und 1.3.1.) zeigen, dass neben dem NF- $\kappa$ B auch der Notch Signalweg in Hodgkin-Lymphomen dereguliert ist und dass dies für die Pathogenese von Hodgkin-Lymphomen von entscheidender Bedeutung ist (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002).

Notch gehört zu einer Familie von Transmembranrezeptoren, die an der Kontrolle von Proliferation und Differenzierung nach Stimulation durch extrazelluläre Liganden auf benachbarten Zellen beteiligt sind. Nach Bindung der Liganden wird in einem mehrfachen proteolytischen Prozess der intrazelluläre Teil der Rezeptoren abgespalten, der dann in den Kern wandert und dort als Transkriptionsfaktor durch Bindung an eine Gruppe von Interaktionspartnern wirkt (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999). Der intrazelluläre Anteil verfügt ähnlich wie die  $\kappa$ B Moleküle über Ankyrinrepeats und kann u. a. mit NF- $\kappa$ B Molekülen interagieren.

Notch1 wurde ursprünglich in Translokationen von humanen akuten lymphoblastischen T-Zellleukämien isoliert und verursacht in konstitutiv aktiven Formen T-Zellneoplasien bei Mäusen (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999; Bellavia, Campese et al. 2000). Trunkierte Notch Proteine sind außerdem an der Transformation von Rattennierenzellen beteiligt, indem sie mit dem Adenovirus Genprodukt E1A kooperieren (Capobianco, Zagouras et al. 1997).

Transgene Mäuse, die die intrazelluläre Domäne von Notch3 unter der Kontrolle des *lck* Promotors exprimieren, entwickeln aggressiv wachsende T-Zelllymphome (Bellavia, Campese et al. 2000). Die Tumorzellen dieser Lymphome besitzen eine konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivität. Die Arbeiten dieser Habilitationsschrift beschreiben dann erstmals eine Beteiligung der Notch-Rezeptoren an der Pathogenese von B-Zelllymphomen (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002; Jundt, Probsting et al. 2004; siehe Kapitel 1.2.1. und 1.2.3.).

Von Notch-Rezeptoren ist darüber hinaus bekannt, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Differenzierung des hämatopoetischen Systems spielen (Brenner 2000). Die Aktivität des Notch Signalwegs entscheidet darüber, ob beispielsweise eine hämatopoetische Stammzelle sich selbst erneuert oder ob sie sich in Richtung myeloischer oder lymphatischer Linie und im nächsten Schritt in Richtung T- oder B-Zelle entwickelt. Notch-Rezeptoren üben diese Schlüsselfunktion aus, indem sie das gesamte B-zelluläre Entwicklungsprogramm unterdrücken und blockieren können. Wir konnten in neuesten Untersuchungen, die auch in dieser Arbeit kurz dargestellt werden, zeigen, dass das Notch-System tatsächlich als Master-Gen ursächlich an dem deregulierten B-Zell Phänotyp von

Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen beteiligt sein könnte (Jundt, Kley et al. 2002 und unveröffentlichte Daten).

### 1.1.3. Multiple Myelome

Multiple Myelome sind B-Zell non-Hodgkin Lymphome, bei denen sich der maligne B-Zell Klon von terminal differenzierten B-Zellen ableitet. Multiple Myelome entwickeln sich dabei aus langlebigen Plasmazellen, die im Keimzentrum bereits den Prozess der somatischen Hypermutation, Antigeneselektion und des Immunglobulin-Klassenwechsels durchlaufen haben. Klinisch zeichnen sich Multiple Myelome insbesondere durch die hohe Produktion monoklonaler Immunglobuline des malignen B-Zell Klons, eine Anämie, durch Knochenschmerzen und pathologische Frakturen - hervorgerufen durch die Lymphom-infiltration der Knochen, durch eine hohe Anfälligkeit gegenüber Infektionen sowie Nierenversagen und ein Hyperviskositätssyndrom aus (Anderson, Kyle et al. 2000).

Studien zur Pathogenese des Multiplen Myeloms zeigen, dass zahlreiche Signalwege in den Tumorzellen dereguliert sind (Anderson, Kyle et al. 2000; Dalton, et al. 2000). Für das Tumorzellwachstum und –überleben sind jedoch vor allem auch Signale der umgebenden Zellen des sogenannten „Mikroenvironments“ im Knochenmark wie z.B. Knochenmark-Stromazellen von entscheidender Bedeutung.

Insbesondere die konstitutive Aktivierung von STAT3 in Tumorzellen, die durch eine exzessive teils autokrine teils parakrine (z.B. Knochenmarkstromazellen) Produktion des Zytokins Interleukin-6 hervorgerufen wird, ist für Wachstum und Überleben der Tumorzellen wichtig (Catlett-Falcone et al. 1999). Weitere Untersuchungen zur Pathogenese des Multiplen Myeloms gehen davon aus, dass verschiedene Immunglobulintranslokationen, die die Zykline D1 oder D3 und Tyrosinkinase aus der Fibroblasten Wachstumsfaktorfamilie betreffen, sowie somatische Mutationen des Ras-Signalwegs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der malignen Transformation auftreten. Es ist jedoch bisher nicht gelungen, aus der Summe der einzelnen Befunde deregulierter Signalwege ein Modell für die Transformation terminal differenzierter B-Zellen zu malignen Plasmazellen zu entwickeln. Befunde an Zelllinien oder an primären Tumorzellen bedürfen deshalb insbesondere beim Multiplen Myelom der Überprüfung ihrer Bedeutung für die Pathogenese in adäquaten Tiermodellen.

Aktuelle Untersuchungen zur Pathogenese zeigten, dass multiple Myelom-Zelllinien wie U266, RPMI-8226, HS-Sultan, K620 und ARP-1 über eine konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivität verfügen (Ni, Ergin et al. 2001). Auch die immunhistologische Untersuchung von 13 Fällen mit primären Myelomzellen bestätigten das Vorliegen einer konstitutiven NF- $\kappa$ B Aktivität in den Tumorzellen. Die tumorbiologische Bedeutung wurde in dieser Studie dann durch die Inhibition von NF- $\kappa$ B mittels Proteasomen-Inhibitoren, die den Abbau der NF- $\kappa$ B Inhibitormoleküle verhindern, und

durch den Einsatz einer dominant-negativen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Mutante untersucht (Ni, Ergin et al. 2001). Myelomzellen, in denen NF- $\kappa$ B blockiert wurde, starben via Apoptose. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind den Analysen bei Hodgkin-Lymphomen, die wir durchgeführt haben, vergleichbar und weisen erneut auf die möglicherweise generelle tumorbiologische Bedeutung einer konstitutiven NF- $\kappa$ B Aktivität für die Entwicklung maligner hämatopoetischer Zellen hin.

Darüber hinaus zeigten Daten unserer Arbeitsgruppe, dass humane Multiple Myelomzellen in Anwesenheit des sie umgebenden Knochenmarkstromas von dem als Wachstums- und Überlebensstimulus beschriebenen IL-6/gp130/STAT3 Signalweg unabhängig wurden (Chatterjee, Honemann et al. 2002). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass nur durch eine kombinierte Blockade des IL-6/gp130/STAT3 und des ebenfalls in Myelom-Zellen hoch aktiven MEK/ERK Signalwegs eine effiziente Unterbrechung der Überlebenssignale und eine Apoptoseinduktion erreichbar waren (Chatterjee, Stuehmer et al. 2004). Diese Befunde haben nicht nur erheblich zum Verständnis der Pathogenese Multipler Myelome und der Abhängigkeit von dem sie umgebenden Knochenmarkstroma beigetragen, sondern haben vor allem auch direkte Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapiestrategien. Diese müssen auf die gleichzeitige Blockade mehrerer überlebenswichtiger Signalwege und auf die Unterbrechung des Kontakts zwischen Myelomzellen und Knochenmarkstroma ausgerichtet sein.

Insbesondere die Arbeiten meiner Arbeitsgruppe, die im Rahmen dieser Habilitationsschrift in den Kapiteln 1.2.3. und 1.3.1. vorgestellt werden, beschäftigen sich mit dem oben aufgezeigten grundsätzlichen, pathogenetischen Mechanismus — der Bedeutung von Myelom-Stromainteraktionen — und einer neuen, sich daraus entwickelnden Therapiestrategie (Jundt, Probsting et al. 2004).

## 1.2. Molekulare Defekte in der Pathogenese maligner Lymphome – Eigene Arbeiten und Diskussion

### 1.2.1. Hodgkin-Lymphome

Jundt, F., Herr, I., Angel, P., zur Hausen, H., and Bauknecht, T. (1995). Transcriptional control of human papillomavirus type 18 oncogene expression in different cell lines: role of transcription factor YY1. *Virus Genes* 11:53-58.

Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Bommert, K., Emmerich, F., Müller, G., Foss, H.D., Royer, H.D., Stein, H., and Dörken, B. (1999). Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood* 94:2065-2071.

Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H.D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., and Dörken, B. (1999). Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF- $\kappa$ B activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 94:3129-3134.

Grinstein, E., Jundt, F., Weinert, I., Wernet, P., and Royer, H.D. (2002). Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* 21:1485-1492.

Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Mathas, S., Stein, H., and Dörken, B. (2002). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99:3398-3403.

Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Schulze Pröbsting, K., Greiner, A., Mathas, S., Scheidereit, C., Wirth, T., Stein, H., Dörken, B. (2002). Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood* 99:3060-3062.

Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mehta-Grigoriou, F., Stein, H., Dörken, B., and Scheidereit, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* 21:4104-4113.

Loddenkemper, C., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Jöhrens-Leder, K., Foss, H.D., Jundt, F., Wirth, T., Dörken, B., Stein, H. (2004). Differential E $\mu$  enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol.* 202:60-69.

Mathas, S., Lietz, A., Anagnostopoulos, I., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M., Jundt, F., Hirsch, B., Jöhrens-Leder, K., Vornlocher, H.P., Bommert, K., Stein, H., and Dörken, B. (2004). c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med.* 199:1041-1052.

Im Mittelpunkt der in diesem Kapitel vorgestellten eigenen Forschungsarbeiten standen die molekularen Mechanismen und Defekte der Wachstumskontrolle und Differenzierung neoplastischer Zellen in Hodgkin-Lymphomen. Um weitere molekulare Defekte zu untersuchen, die zu einer konstitutiven NF- $\kappa$ B Aktivität in malignen Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen führen, analysierten wir den Notch-Signalweg in Hodgkin-Linien und primären Hodgkin-Lymphomen und den morphologisch ähnlichen großzellig anaplastischen Lymphomen (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002). Anlass für unsere Untersuchung waren Publikationen, die eine Beteiligung des aktivierten Notch Signalwegs an der Regulation von NF- $\kappa$ B zeigen. Wir konnten erstmals zeigen, dass aktivierte Notch-Rezeptoren in Tumorzellen der Hodgkin-Lymphome überexprimiert sind, das Tumorzellwachstum und –überleben steuern und vor allem auch bestimmte Differenzierungsschritte blockieren können (Jundt, Anagnostopoulos et

al. 2002 und unveröffentlichte Daten). Insbesondere die Aufklärung des onkogenen Potentials von Notch-Rezeptoren ist für die Tumorbologie von Hodgkin-Lymphomen von großer Bedeutung, da sie auf die Identifikation eines „Master-Gens“ für diese Lymphomkrankung hinweist. Aus diesen eigenen Ergebnissen resultieren neue therapeutische Ansätze (Kapitel 1.3.1.), so dass die in dieser Habilitationsschrift vorgestellten Arbeiten ein gutes Beispiel für die Verbindung von grundlagenorientierter und klinischer Forschung sind.

Hodgkin-Lymphome gehören zu den rätselhaftesten Tumorerkrankungen und erregen seit ihrer ersten Beschreibung durch den Pathologen Sir Thomas Hodgkin 1832 besonderes wissenschaftliches Interesse. Histologisch und klinisch zeigen sie sowohl Merkmale einer Entzündung als auch einer Tumorerkrankung. Die malignen und für die Diagnose pathognomonischen Hodgkin- bzw. Reed-Sternberg-Zellen sind im Tumorgewebe nur sehr selten zu finden. Den überwiegenden Anteil machen Entzündungszellen verschiedenster Herkunft aus: Lymphozyten, Plasmazellen, Fibroblasten, neutrophile und als besonderes Merkmal eosinophile Granulozyten. Auch klinisch zeigt ein Teil der Patienten typische Symptome einer Entzündung: Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Dennoch verhalten sich Hodgkin-Lymphome gerade in fortgeschrittenen Stadien besonders aggressiv und können alle Organsysteme infiltrieren. Sie verlaufen unbehandelt tödlich.

Diese besonderen klinischen und pathologischen Merkmale der Hodgkin-Lymphome sind auf die übermäßige Produktion von Zytokinen durch die Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen zurückzuführen. Wir wiesen in den hier vorgestellten eigenen Arbeiten zu diesem interessanten und für die Tumorentstehung hoch relevanten Sachverhalt nach, dass Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen durch die Bildung des Botenstoffs TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor alpha) Bindegewebszellen in ihrer Umgebung zur Produktion von Eotaxin stimulieren (Jundt, Anagnostopoulos et al. 1999). Eotaxin ist ein Chemokin, das T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten ins Gewebe anlockt und damit entscheidend an der typischen histopathologischen Erscheinungsform von Hodgkin-Lymphomen beteiligt ist (Jundt, Anagnostopoulos et al. 1999).

Wissenschaftliches Interesse hat in den vergangenen Jahren vor allem die Suche nach dem lange Zeit ungeklärten zellulären Ursprung der malignen Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen hervorgerufen. Dies lag zum einen an ihrem seltenen Vorkommen im Tumorgewebe und damit an ihrer schlechten Verfügbarkeit für biologische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden. Besonders ungewöhnlich war jedoch der immunologische

Phänotyp dieser Zellen, der sich keiner normalen hämatopoetischen Zelle zuordnen ließ. Erst vor sechs Jahren gelang es der Arbeitsgruppe von Klaus Rajwesky, auf Einzelzellebene durch den Nachweis von Rearrangements der Immunglobulingene und von somatischen Hypermutationen – beides typische Merkmale von B-Lymphozyten des Keimzentrums lymphatischer Organe – B-Lymphozyten in den meisten Fällen als Ursprungszellen der Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen zu definieren (Kuppers und Rajewsky 1998). Dennoch verfügen diese Tumorzellen über keine typischen B-zellulären Oberflächenmarker und bilden vor allem keine Immunglobuline.

Dies spricht dafür, dass ein elementarer Defekt der Differenzierung dieser neoplastischen B-Zellen vorliegt und dass zellspezifische Programme grundsätzlich gestört sind. Zu diesem Zeitpunkt war von Notch-Rezeptoren bekannt, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Differenzierung des hämatopoetischen Systems spielen. Die Aktivität des Notch Signalwegs entscheidet darüber, ob beispielsweise eine hämatopoetische Stammzelle sich selbst erneuert oder ob sie sich in Richtung myeloischer oder lymphatischer Linie und im nächsten Schritt in Richtung T-Zelle oder B-Zelle entwickelt. Notch-Rezeptoren üben diese Schlüsselfunktion aus, indem sie das gesamte B-zelluläre Entwicklungsprogramm unterdrücken und blockieren. Von Notch-Rezeptoren war außerdem bekannt, dass sie an der Entstehung von T-lymphoblastischen Leukämien und Lymphomen beteiligt sind (Bellavia, Campese et al. 2000).

In unseren eigenen Untersuchungen konnten wir nun erstmals die herausragende Bedeutung der Überexpression von Notch-Rezeptoren für die Pathogenese von Hodgkin-Lymphomen nachweisen (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002).

Wir konnten zeigen, dass in Hodgkin-Lymphomen Notch-Rezeptoren in den neoplastischen Zellen stark überexprimiert sind. In Ko-Kultivierungssystemen *in vitro* steigerten wir durch die Aktivierung des Notch-Signalwegs über den Liganden Jagged1 das Wachstum der Tumorzellen und deren Resistenz gegenüber programmiertem Zelltod exponentiell. Die beobachtete Wachstumssteigerung durch aktivierte Notch-Rezeptoren war vor allem vor dem Hintergrund bereits gut proliferierender Tumorzelllinien unerwartet und beeindruckend. In Untersuchungen von Patientenmaterial lagen Tumorzellen und Zellen, die den Liganden Jagged1 exprimierten, in unmittelbarer Nachbarschaft. Dies lässt den Schluss zu, dass auch *in vivo* eine Interaktion zwischen Rezeptoren und Liganden und damit die Aktivierung des Systems stattfinden kann. Somit weisen die Daten meiner Arbeitsgruppe auf einen wesentlichen Beitrag von aktivierten Notch-Rezeptoren zur Entstehung von Hodgkin-

Lymphomen hin (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002).

Notch-Rezeptoren sind außerdem an der Regulation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beteiligt. Eine unserer Arbeitsgruppen zeigte in den letzten Jahren, dass NF- $\kappa$ B in Hodgkin-Lymphomen durch konstitutive Kernbindeaktivität permanent aktiv ist und für das Wachstum und Überleben der malignen Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen verantwortlich ist (Bargou, Leng et al. 1996; Bargou, Emmerich et al. 1997). Mutationen im Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  tragen zumindest in einem Teil der Hodgkin-Lymphome zu dieser permanenten NF- $\kappa$ B Aktivität bei (Emmerich, Meiser et al. 1999). Die Arbeiten meiner Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Notch-Rezeptoren als Bindeglied zwischen der permanenten NF- $\kappa$ B Aktivität und dem Wachstum und Überleben der Tumorzellen fungieren können. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass Notch-Rezeptoren tatsächlich Genprodukte eines „Master-Gens“ in der Entstehung der Hodgkin-Lymphome sind. Wir versuchen gegenwärtig, die funktionellen Zusammenhänge einer Interaktion von Notch und NF- $\kappa$ B nachzuweisen.

Unsere Hypothese, dass Notch-Rezeptoren für die Störung der Differenzierung der neoplastischen B-Zellen verantwortlich sind, wird durch die weiterführenden Arbeiten meiner Arbeitsgruppe unterstützt, die einen vollständigen Verlust des B-Zell Differenzierungsfaktors PU.1 in den Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen zeigen (Jundt, Kley et al. 2002; Loddenkemper, Anagnostopoulos et al. 2004). PU.1 ist somit an der gestörten Expression der Immunglobuline in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen beteiligt. Auf welchem Weg überexprimierte Notch-Rezeptoren wichtige B-Zelldifferenzierungsfaktoren wie PU.1 in den Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen blockieren, ist Gegenstand der aktuellen Forschungsarbeiten meiner Arbeitsgruppe (Jundt, unveröffentlichte Daten).

Durch die Analysen meiner Arbeitsgruppe von Apoptoseresistenz und Zellzyklusregulation in Hodgkin-Lymphomen beschäftigen wir uns mit den Transkriptionsfaktoren YY1 und Sp1. Sp1 bindet an zahlreiche Enhancer und Promotor Regionen von Wachstumsfaktoren und Zellzyklus regulierten Genen. Des Weiteren ist von Sp1 bekannt, dass es mit Proteinen interagiert, die an der Kontrolle des Zellzyklus und des Tumorwachstums beteiligt sind. Sp1 wird in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen sehr stark exprimiert (Jundt, unveröffentlichte Daten). Wir konnten nun zeigen, dass Sp1 vornehmlich in der G1 Phase des Zellzyklus exprimiert wird und dass diese Regulation durch eine Proteasomen abhängige Degradation erfolgt (Grinstein, Jundt et al. 2002). Dieser Befund warf ein völlig neues Licht auf die zellbiologische Funktion dieses Transkriptionsfaktors, der bis zu diesem Zeitpunkt als ubiquitär exprimiert galt. Wir

konnten den Transkriptionsfaktor Sp1, der durch eine dominant-negative Mutante inhibiert wurde, erstmals als wichtigen Regulator des Zellzyklus in der G1 Phase identifizieren und beschreiben (Grinstein, Jundt et al. 2002). Der Transkriptionsfaktor YY1 reguliert seinerseits wichtige hoch konservierte transkriptionelle Kontrollregionen z.B. von viralen Promotoren des humanen Papillomvirus Typ 18 (Jundt, Herr et al. 1995), dem c-myc Promotor und dem Immunglobulin H Enhancer. YY1 ist mit dem hoch molekularen Notch-Aktivierungskomplex assoziiert und supprimiert die transaktivierende Aktivität von Notch. Wir beschäftigen uns in meiner Arbeitsgruppe derzeit mit der Rolle von YY1 in Hodgkin-Lymphomzelllinien, um Mechanismen der permanenten Notch Aktivierung zu untersuchen (Jundt, unveröffentlichte Daten).

In weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe in der Abteilung von Professor Dörken zur molekularen Pathogenese von Hodgkin-Lymphomen konnten wir zeigen, dass die AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie, die Proliferation, Apoptose und maligne Transformation kontrolliert, in Hodgkin-Lymphomzellen aberrant exprimiert wird (Mathas, Hinz et al. 2002). Dies ist ähnlich wie die zuvor beschriebene permanente NF- $\kappa$ B Aktivität und die deregulierte Expression von Notch ein charakteristisches Merkmal von Hodgkin-Lymphomzellen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die AP-1 Transkriptionsfaktoren mit NF- $\kappa$ B in den Lymphomzellen kooperieren und die Proliferation stimulieren (Mathas, Hinz et al. 2002).

Ebenfalls NF- $\kappa$ B abhängig reguliert wird die Expression von c-FLIP (FAS-associated death domain-like interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein) in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen (Mathas, Lietz et al. 2004). c-FLIP inhibiert den wichtigen durch CD95 induzierten Apoptoseweg in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen (Mathas, Lietz et al. 2004) und ist deshalb ein Schlüsselregulator der Apoptoseresistenz in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen.

## 1.2.2. Mausmodell

### 1.2.2.1. Transplantation von fötalen hämatopoetischen Stammzellen aus der Leber $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienter ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$ ) Mäuse in B-Zell defiziente Rezipienten

In den im Rahmen dieser Habilitationsschrift vorgestellten eigenen Experimenten wurde ein Mausmodell etabliert, um Teilschritte der Pathogenese maligner Lymphome (Hodgkin-Lymphome) im Tierversuch nachzuvollziehen und damit deren Bedeutung für die Entstehung der malignen Erkrankungen *in vivo* abzuschätzen.

Zur Transplantation wurden Embryonen aus Verpaarungen heterozygoter  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Mäuse eingesetzt. Die fötale Leber, die die hämatopoetischen Stammzellen enthält, wurde von 12,5-14 Tage alten Embryonen entnommen und in Einzelzellsuspension gebracht. Für die Genotypisierung wurde ein Teil des embryonalen Gewebes einer PCR zugeführt. Entsprechend der Genotypisierung wurden die hämatopoetischen Stammzellen von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{+/+}$  und  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  Embryonen innerhalb eines Zeitraums von 6 h nach Entnahme transplantiert. Die B-Zell defizienten Rezipienten wurden 24 h vor Transplantation mit 8 Gy subletal bestrahlt. In zahlreichen Vorexperimenten, die der Dosisfindung von zu transplantierenden fötalen Leberzellen dienten, wurde eine Zellzahl von  $8 \times 10^5$  Leberzellen pro Rezipient als optimal ermittelt. Die transplantierten Rezipienten wurden anschließend unter sterilen Bedingungen und autoklavierten Wasser gehalten.

Vier Wochen nach Transplantation wurde erstmals die Rekonstitution der Stammzellrezipienten mit hämatopoetischen fötalen Stammzellen in FACS-Analysen untersucht. Da es sich zuvor um B-Zell defiziente Empfänger handelte, konnte die Rekonstitution durch Spenderzellen durch den Nachweis von B220 positiven (B-Zellmarker) Zellen im FACS ermittelt werden (Abbildung 1A; vgl. S. 20). Bei weiteren hämatopoetischen Linien wie z.B. T-Zellen stellte sich in den Stammzellrezipienten ein Chimärismus aus Spender und Empfänger T-Zellen ein. Das Verhältnis von Spender und Empfänger Zellen konnte zunächst nur durch die Tötung der Rezipienten und die nachfolgende Entnahme von T-Zellen aus der Milz in Southern Blot Analysen bestimmt werden. Deshalb wurde zusätzlich ein Mausstamm generiert, der durch Verpaarung der B-Zell defizienten Rezipienten mit einem Ly5.1 positiven Mausstamm entstand. Dieser Mausstamm zeichnet sich dadurch aus, dass sämtliche Zellen der B-Zell defizienten Rezipienten den Oberflächenmarker Ly5.1 besitzen und sich damit von Spenderzellen ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  knock out Mäuse) mit dem Oberflächenmarker Ly5.2 unterscheiden. In den rekonstituierten Stammzellrezipienten kann der Chimärismus z.B. der T-Zellen jetzt durch einfache FACS-Analysen der Oberflächenmarker Ly5.1 und Ly5.2 bestimmt werden.

Um in den B-Zellen der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  Stammzellrezipienten eine konstitutive NF- $\kappa\text{B}$  Aktivität in Gelretardationsanalysen nachzuweisen, wurden ruhende B-Zellen mittels anti-CD43 Antikörper gekoppelten Beads und durch Depletion der T-Zellen mit Th1.2 markierten Dynalbeads aus der Milz isoliert. Proteinextrakte der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  versus  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  B-Zellen wurden auf ihre NF- $\kappa\text{B}$  Kernbindeaktivität hin untersucht (Abbildung 1B; vgl. S. 20). Parallel wurden Milzen von 3-5 Tage alten, konventionellen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  knock-out Mäusen der gleichen Analyse unterzogen. In beiden Fällen zeigten die Shifftanalysen eindeutig, dass  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  B-Zellen eine konstitutive NF- $\kappa\text{B}$  Aktivität besitzen. Diese Experimente waren die Voraussetzung für alle weiteren molekularbiologischen und immunologischen Analysen der Stammzellrezipienten (Rupeć, Jundt et al. Immunity in Revision und unveröffentlichte Daten).

#### **1.2.2.2. Histologische und immunologische Untersuchung der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$ Stammzellrezipienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation**

Im ELISA wurden die basalen Immunglobulinspiegel der Stammzellrezipienten untersucht. In diesen repetitiven Analysen (3, 6 Monate) fielen bei den Immunglobulinen IgM, IgG1, IgG2a und IgG3 keine Unterschiede zwischen Wildtyp und knock-out Rezipienten auf. Wir konnten jedoch in einem Teil der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  Rezipienten stark erhöhte Autoantikörper und Rheumafaktoren nachweisen. Die Signifikanz dieser Befunde für die potentielle Entstehung einer Autoimmunerkrankung wird in langfristigen histologischen Untersuchungen (Niere, Haut) und im ELISA verfolgt. Des Weiteren wurden die Stammzellrezipienten mit T-Zell abhängigen (NP-CG, nitrophenyl chicken gamma globulin) und T-Zell unabhängigen (TNP-Ficoll) Antigenen immunisiert, um veränderte antigenabhängige Immunglobulinantworten zu untersuchen. Die Bestimmung der Immunglobulinspiegel im ELISA nach diesen Immunisierungen ist noch nicht abgeschlossen. Erste Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defiziente B-Zellen im Beobachtungszeitraum wesentlich höhere Spiegel an IgG1, IgG2a und IgG2b zeigen, was auf eine gestörte spezifische Immunantwort hinweist (Jundt, unveröffentlichte Daten).

FACS-Analysen der Stammzellrezipienten im peripheren Blut zeigten, dass sich in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  Rezipienten mit konstitutiver NF- $\kappa\text{B}$  Aktivität alle hämatopoetischen Linien entwickeln können. Des Weiteren konnten wir auf peripheren und Milz B-Zellen alle Marker reifer B-Zellen (CD19, IgM, IgD) nachweisen, fanden jedoch ein deutlich verschobenes Verhältnis von Ig $\kappa$  und Ig $\lambda$  exprimierenden B-Zellen in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{+/+}$  versus  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  Rezipienten. Die genauere Analyse dieses Befunds ist Gegenstand laufender Experimente. Darüber hinaus fiel in FACS-Analysen mit den Oberflächenmarkern IgM/CD21/CD23 von B-Zellen aus der Milz der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  Rezipienten eine deutlich erhöhte Zahl (50%) von Marginalzonen B-Zellen auf. Dieses Ergebnis bestätigt einen

bereits publizierten Befund, der zeigt, dass NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle für die Entwicklung von Marginalzonen B-Zellen spielt (Cariappa, Liou et al. 2000).

Die histologische Untersuchung der lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz) ergab zunächst keine auffälligen Befunde. Auch Bildung und Struktur der Keimzentren war in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{+/+}$  und  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  Stammzellrezipienten nach Immunisierung gleich. Weitere Untersuchungen sollen jetzt zeigen, ob sich durch die erhöhten Autoantikörperspiegel langfristig histologische Veränderungen in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$  Rezipienten entwickeln.

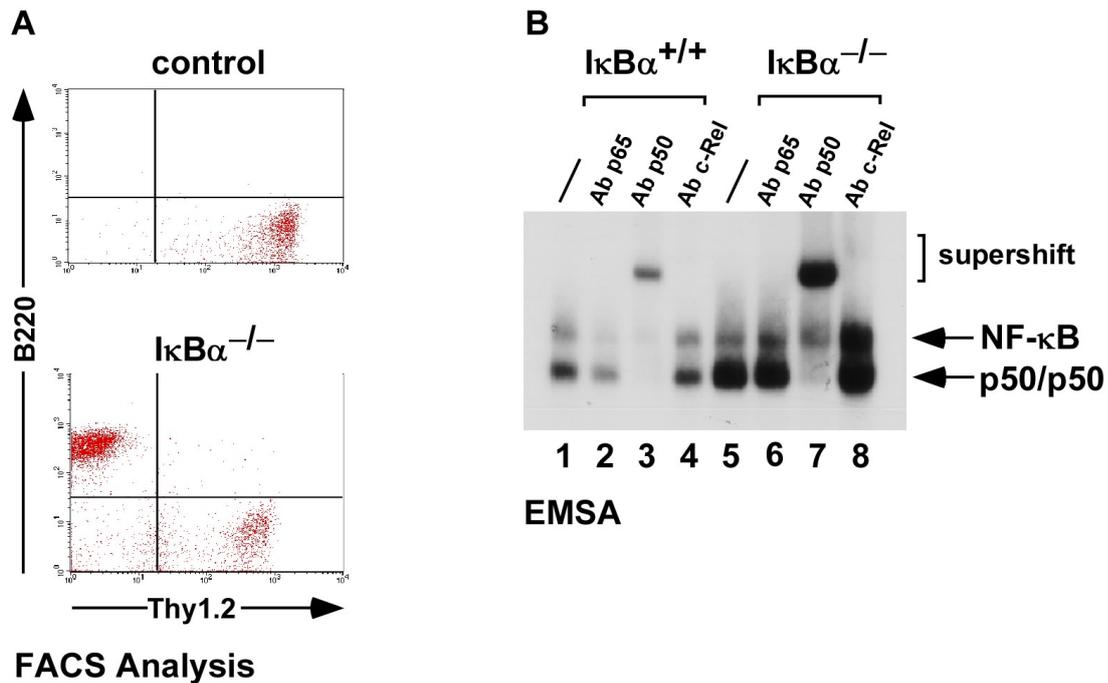
### **1.2.2.3. Interaktion des NF- $\kappa$ B und Notch Signalwegs: Analyse im Mausmodell**

Es wurden zahlreiche Arbeiten publiziert (Bellavia, Campese et al. 2000; Espinosa, Santos et al. 2002; Bash, Zong et al. 1999; Wang, Shelly et al. 2001; Cheng, Zlobin et al. 2001), die eine besondere Verknüpfung und Interaktion der Notch und NF- $\kappa$ B Signalwege nahe legen. Dabei wurden verschiedene Möglichkeiten einer direkten Interaktion der Notch und NF- $\kappa$ B Moleküle beschrieben, die z.B. in Notch3 transgenen Mäusen zu einer konstitutiven NF- $\kappa$ B Aktivität führen und T-Zell Lymphome entstehen lassen. Aktuelle Arbeiten beschreiben außerdem einen Zusammenhang der NF- $\kappa$ B und Notch Aktivierung in hämatopoetischen Vorläuferzellen, die die Differenzierung in verschiedene Linien (lymphatisch versus myeloisch) beeinflussen. Miele und Koautoren beschreiben, dass auch bei der Differenzierung in der Haut ein direktes Zusammenspiel des Notch und NF- $\kappa$ B Signalwegs notwendig ist (Nickoloff, Qin et al. 2002). Notch-Rezeptoren können außerdem in Zellen ihrer unmittelbaren Umgebung über die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs die Expression ihres eigenen Liganden stimulieren (Bash, Zong et al. 1999).

Die Arbeiten meiner Arbeitsgruppe zeigen, dass in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen und in Tumorzellen großzellig anaplastischer Lymphome NF- $\kappa$ B permanent aktiv ist und eine Überexpression der Notch1 bzw. Notch2 Rezeptoren sowie deren Liganden Jagged1 vorliegt (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002). Es lag daher nahe, das Notch Signalsystem nicht nur in den uns zur Verfügung stehenden Tumorzelllinien zu untersuchen, sondern auch in dem von uns etablierten Tumormodell mit Knochenmarkchimären. Wie bereits in Kapitel 1.2.2.1. ausführlich dargestellt, ist es uns gelungen, fötale Stammzellen mit  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  knock-out und permanenter NF- $\kappa$ B Aktivität in B-Zell defiziente Empfänger zu transplantieren. Im Gegensatz zu dem zwischen dem 5. und 7. Lebenstag letalen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  knock-out, der sich insbesondere durch eine massive Hypergranulopoese auszeichnet, zeigten die Knochenmarkchimären keine verstärkte Granulopoese (Rupec, Jundt et al. Immunity in Revision). Um diese Unterschiede hinsichtlich des hämatopoetischen Phänotyps aufzuklären, wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Rupec (Dermatologische Klinik der LMU München) in dem von

ihm hergestellten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\Delta/\Delta}$  knock-out ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  gefloxt Mäus;  $\text{Ilox}$ ,  $\text{Ilox}$  Genotyp) und in den von uns generierten Knochenmarkchimären der Notch Signalweg untersucht.

Von Notch Rezeptoren war bekannt, dass sie eine entscheidende Rolle in der granulozytären Differenzierung spielen (Schröder, Just et al. 2000). Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\Delta/\Delta}$  Mäusen der Notch Ligand Jagged1 in den fötalen Leberzellen weit über den 12. Tag p.c. hinaus bis zur Geburt sehr stark exprimiert wird. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen, bei denen die Expression des Liganden vom 12. Tag p.c. bis zur Geburt physiologischer Weise wieder abnimmt. Diese hohe Expression von Jagged1 konnte in den Knochenmarkchimären in der Leber nicht nachgewiesen werden. In den Granulozyten der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\Delta/\Delta}$  Mäuse wurde zudem eine hohe Expression des zugehörigen Notch1-Rezeptors gefunden, die sich weder in den Granulozyten unserer Knochenmarkchimären noch in Mäusen mit einem Granulozyten spezifischen knock-out für  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\text{flox/flox}}$   $\text{LysMcre}$ ; (Clausen, Burkhardt et al. 1999) zeigte. Weitere Experimente legten nahe, dass die übermäßige Expression des Liganden Jagged1 in der Leber der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\Delta/\Delta}$  Mäuse funktionell für die verstärkte Hypergranulopoese verantwortlich sein könnte, was mit der permanenten NF- $\kappa\text{B}$  Aktivität in den Leberzellen erklärt werden kann. Weder in den Knochenmarkchimären noch in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\text{flox/flox}}$  Mäusen  $\text{LysMcre}$  Mäusen liegt diese Überexpression von Jagged1 vor. Jagged1 kann demnach die Granulopoese in diesen Mausstämmen nicht beschleunigen. In den hier beschriebenen Experimenten dienten die von uns hergestellten Knochenmarkchimären als wichtige Kontrolle, da hier die Granulozyten zwar einen Defekt für  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  aufwiesen nicht jedoch die Leberzellen, die von den Empfängern stammen. Diese Daten zeigen, dass es sich bei der hämatologischen Erkrankung, die sich in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\Delta/\Delta}$  knock-out Mäusen entwickelt, um ein myeloproliferatives Bild handelt, das durch nicht-hämatopoetische Zellen (Hepatozyten in der Leber) unterhalten wird. Durch die kontinuierliche perinatale Expression von Jagged1 in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Hepatozyten findet eine permanente Aktivierung des Notch-Signalwegs in den Granulozyten statt. Die hier vorgestellten Ergebnisse (Kapitel 1.2.2.3) befinden sich bei der Zeitschrift *Immunity* in Revision (Rupec, Jundt et al., *Immunity* in Revision).



**Abbildung 1**

(a) FACS-Analyse von peripherem Blut für den B-Zellmarker B220 bzw. den T-Zellmarker Thy1.2. Untersucht wurden die B-Zell defizienten Rezipienten vor und vier Wochen nach Transplantation mit  $I\kappa B\alpha^{-/-}$  Stammzellen. (b) Gelretardationsanalyse für NF- $\kappa$ B von Milz B-Zellen aus  $I\kappa B\alpha^{+/+}$  versus  $I\kappa B\alpha^{-/-}$  Rezipienten. Supershift-Analysen wurden mit den gekennzeichneten Antikörpern durchgeführt.

### 1.2.3. Multiple Myelome

Jundt, F., Schulze Pröbsting, K., Anagnostopoulos, I., Muehlinghaus, G., Chatterjee, M., Mathas, S., Bargou, R.C., Manz, R., Stein, H., and Dörken, B. (2004). Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* 103:3511-3515.

In der hier vorgestellten Arbeit konnten wir die große Bedeutung überexprimierter Notch-Rezeptoren für die Pathogenese von Multiplen Myelomen zeigen (Jundt, Probsting et al. 2004).

Notch-Rezeptoren kontrollieren in allen entscheidenden Entwicklungsstadien die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen. In der frühen Hämatopoese werden Notch-Rezeptoren von Stammzellen exprimiert und interagieren mit ihren Liganden im Knochenmarkstroma. Diese Interaktion führt in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus der Zellen durch den Notch Signalweg entweder zur Selbsterneuerung der Stammzellen oder zur Differenzierung in lymphatische versus myeloische Linien. Der Notch-Signalweg ist damit funktionell ein wichtiger Bestandteil des Microenvironments im Knochenmark, das für das Überleben und die Differenzierung der Stammzellen notwendig ist. Darüber hinaus machten unsere eigenen Arbeiten erstmals deutlich, dass der Notch Signalweg an der Pathogenese humaner B- und T-Zellneoplasien beteiligt ist (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002). Wir konnten zeigen, dass Notch-Rezeptoren in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen primärer Hodgkin-Lymphome und in Tumorzellen von großzellig anaplastischen Lymphomen im Gegensatz zu normalen, primären lymphatischen Zellen sehr stark exprimiert werden. Mit unserer Arbeit identifizierten wir einen neuen Mechanismus des onkogenen Potentials von Notch Rezeptoren, indem wir nachwiesen, dass die Interaktion von Notch-Rezeptoren auf den Tumorzellen mit ihrem Liganden das Tumorzellwachstum und –überleben entscheidend beeinflussen (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002).

Bisher war keine pathogenetische Rolle von Notch in Multiplen Myelomen bekannt, bei denen die enge Vernetzung von neoplastischen Plasmazellen mit ihrem Microenvironment essentiell für das Tumorzellwachstum und –überleben ist. Um deshalb neue molekulare Mechanismen zu untersuchen, die für die Pathogenese neoplastischer Plasmazellen wichtig sein könnten, untersuchten wir den Notch Signalweg in kultivierten und primären Multiplen Myelomzellen (Jundt, Probsting et al. 2004). Die Notch Rezeptoren Notch1 und Notch2 wurden in allen medullären und extramedullären Manifestationen des Multiplen Myeloms (16 untersuchte Fälle) hoch exprimiert, währenddessen Plasmazellen normaler Spender keine oder nur eine sehr geringe Notch Expression aufwiesen. Damit ist die Überexpression von

Notch-Rezeptoren ein von uns neu beschriebenes wichtiges Charakteristikum von Multiplen Myelomzellen. In einem nächsten Schritt zeigten wir, dass in vivo von den Multiplen Myelomzellen selbst sowie von den Knochenmarkstromazellen der Notch-Ligand Jagged1 in großer Menge exprimiert wurde, so dass die Rezeptoren in vivo sowohl homotypisch als auch heterotypisch stimuliert werden können. Stimulationsexperimente der Multiplen Myelomzelllinien mit den Liganden Jagged1 in vitro zeigten dann, dass die Tumorzelllinien durch diese Stimulation in ihrem Wachstums exponentiell gesteigert wurden. In Anbetracht der Tatsache, dass die Tumorzelllinien bereits vor Stimulation sehr gut proliferierten, war diese Wachstumssteigerung sehr beeindruckend. Unsere Daten machten somit erstmals deutlich, dass die Aktivierung der Notch Signalwegs in Multiplen Myelomen ein pathogenetisch außerordentlich wichtiges Ereignis ist, das unmittelbar Bedeutung für die Tumorbilogie von Multiplen Myelomen hat. Die Bedeutung unserer Ergebnisse für die Pathogenese von Multiplen Myelomen wurde vor allem auch durch ein Editorial in der Zeitschrift Blood gewürdigt (Jundt, Probsting et al. 2004; Milner 2004).

Darüber hinaus wiesen unsere Experimente darauf hin, dass über den Notch Signalweg in den Tumorzellen Apoptoseresistenz vermittelt wird. Dies ist ebenfalls tumorbilogisch in Multiplen Myelomen sehr relevant.

Die Arbeiten meiner Arbeitsgruppe bilden die Grundlage für die Entwicklung einer neuen Therapiestrategie bei Multiplen Myelomen. Ziel neuer Strategien muss dabei die Unterbrechung des Tumorzell-Stromakontakts und die Blockade überlebenswichtiger Signalwege sein (Jundt, Probsting et al. 2004). Die Blockade des Notch Signalwegs kann durch die Anwendung sogenannter  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren erreicht werden, deren Anwendung derzeit in vitro und in Mausmodellen in vivo getestet wird (Kapitel 1.3.1.).

## 1.3. Neue therapeutische Ansätze in der Behandlung maligner Lymphome – Eigene Arbeiten und Diskussion

### 1.3.1. Sekretase Inhibitoren

Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Förster R., Mathas, S., Stein, H. and Dörken, B. (2002). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99:3398-3403.

Jundt, F., Schulze Pröbsting, K., Anagnostopoulos, I., Muehlinghaus, G., Chatterjee, M., Mathas, S., Bargou, R.C., Manz, R., Stein, H., and Dörken, B. (2004). Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* 103:3511-3515.

Wie bereits in Kapitel 1.2.1. und 1.2.3. ausführlich dargestellt wurde, zeigten unsere Arbeiten erstmals einen Zusammenhang zwischen aktivierten Notch-Rezeptoren und der Onkogenese bzw. Tumorbilogie von neoplastischen B-Zellen (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002; Jundt, Probsting et al. 2004). Die Arbeiten meiner Arbeitsgruppe erhalten dadurch klinische Bedeutung, dass sich aus den molekularen Ansätzen neue therapeutische Optionen bei Hodgkin-Lymphomen, großzellig anaplastischen Lymphomen und Multiplen Myelomen ergeben. Der Notch Signalweg wird über sogenannte  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren spezifisch blockiert. Die  $\gamma$ -Sekretase ist dabei eine wichtige Komponente im Notch-Signalweg, ohne deren Aktivität keine Signaltransduktion durch die Notch-Rezeptoren möglich ist. Die Inhibition von Notch durch  $\gamma$ -Sekretase interferiert mit der durch Notch-Liganden vermittelten proteolytischen Aktivierung der Rezeptoren. Die  $\gamma$ -Sekretase ist darüber hinaus eines der wichtigen Enzyme, die für die Spaltung von Amyloid Vorläuferproteinen und die Produktion von pathogenen A $\beta$  Peptiden in der Alzheimer Erkrankung verantwortlich sind.  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren wurden deshalb ursprünglich zur Behandlung der Plaque-Bildung bei der Alzheimer-Erkrankung entwickelt und werden bereits im Rahmen von klinischen Studien geprüft.

Durch den  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT konnten wir in unserer Arbeit zu den Multiplen Myelomen den Notch Signalweg in den neoplastischen Plasmazellen sehr effizient blockieren und dadurch die Proliferationsrate der multiresistenten Tumorzelllinien stark verringern (Jundt, Probsting et al. 2004). Die Wirksamkeit von  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren zur Wachstumshemmung Multipler Myelomzellen in vivo wird von uns derzeit in adäquaten Mausmodellen geprüft. Wir untersuchen außerdem, ob die  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren in den Tumorzelllinien Apoptose auslösen können und welche in der Behandlung des Multiplen Myeloms bereits etablierten Chemotherapeutika – zunächst in vitro – in Kombination mit den neuen  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren synergistisch wirksam sind. Die Etablierung eines vielversprechenden neuen Therapieansatzes beim Multiplen Myelom ist angesichts noch immer unzulänglicher

therapeutischer Möglichkeiten das vorrangige Ziel unserer weiteren Forschungsarbeit.

Wegen der eingeschränkten Verfügbarkeit der bisher nicht kommerziell erhältlichen  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren für weiterführende Experimente in Mausmodellen haben wir deshalb in Kooperation mit Herrn Dr. Preissner (Charité, Campus Mitte, Institut für Biochemie) ein virtuelles Datenbankscreening mit strukturell bekannten  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren durchgeführt. Es ist uns gelungen, strukturell verwandte Substanzen zu identifizieren und diese in in vitro Assays zu testen. Die Analyse der Blockade des Notch Signalwegs erfolgt dabei durch eine RT-PCR auf das Notch Zielgen Hes-1. In Hodgkin-Zelllinien und in Multiplen Myelomzelllinien konnten wir eine dosisabhängige Inhibition des Notch Signalwegs erzielen. Da die Proliferation der Tumorzelllinien entscheidend von der Aktivität des Notch Systems abhängt, führten wir Proliferationsassays durch. Auch in diesen Experimenten erwiesen sich die von uns identifizierten neuen „Sekretase Inhibitoren“ als hoch potente Proliferationshemmer bei Zelllinien, die Notch-Rezeptoren überexprimieren (Hodgkin-Lymphome, großzellig anaplastische Lymphome, Multiple Myelome) im Gegensatz zu Notch negativen Linien. Wir planen deshalb, dieses virtuelle Datenbankscreening zu intensivieren, um noch wirksamere Substanzen zu identifizieren, die in den oben genannten funktionellen Analysen getestet werden müssen. Hierzu ist es nach unserer bisherigen Erfahrung erforderlich, eine große Anzahl potentieller Kandidaten zu untersuchen. In einem nächsten Schritt ist nun geplant, besonders wirksame Substanzen, die in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, in adäquaten Mausmodellen zu testen. Wir konnten mit verschiedenen Hodgkin-Zelllinien ein Mausmodell etablieren (Jundt et al., unveröffentlichte Daten). Hodgkin-Zelllinien, die in NOD/SCID Mäuse xenotransplantiert werden, sind nicht tumorigen. Durch die gleichzeitige Aktivierung des Notch Signalwegs durch den Liganden Jagged1 konnten wir jedoch ein Tumorwachstum hervorrufen und somit ein neues Mausmodell zur Analyse etablieren (Jundt et al., unveröffentliche Daten). In diesen Mausmodellen sollen nun die in vitro als wirksame  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren getesteten Substanzen eingesetzt werden. Durch die wichtige tumorbiologische Bedeutung des Notch Signalwegs in Hodgkin-Lymphomen, großzellig anaplastischen Lymphomen und Multiplen Myelomen ergeben sich durch die Identifizierung dieser Substanzen neue therapeutische Optionen. Aus unseren Arbeiten ergibt sich somit, dass Sekretase-Inhibitoren als neue Kandidaten für potentielle Krebstherapeutika gelten können.

### 1.3.2. Rapamycin Derivate (Everolimus, RAD)

Mathas, S., Lietz, A., Janz, M., Hinz, M., Jundt, F., Scheidereit, C., Bommert, K., and Dörken, B. (2003). Inhibition of NF- $\kappa$ B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 102:1028-1034.

Hodgkin-Lymphome und großzellig anaplastische Lymphome zeigen in einer Untergruppe von Fällen morphologische und vor allem auch immunphänotypische Gemeinsamkeiten, die ihre pathologische Klassifikation erheblich erschweren und die heute als sogenannte „grey zone lymphomas“ bezeichnet werden (Rudiger, Jaffe et al. 1998; Stein, Foss et al. 2000). In der hier vorliegenden Arbeit wird darüber hinaus deutlich, dass Hodgkin-Lymphome und großzellig anaplastische Lymphome wichtige gemeinsame molekulare Defekte aufweisen (Jundt, Anagnostopoulos et al. 2002; Mathas, Hinz et al. 2002). Beide Entitäten haben einen deregulierten Notch Signalweg (Jundt, Probsting et al. 2004) und weisen eine permanente Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 auf (Mathas, Hinz et al. 2002). In gleicher Weise besteht bei beiden Lymphomentitäten heute ein dringender Bedarf an neuen therapeutischen Optionen (Falini, Pileri et al. 1999; Gascoyne, Aoun et al. 1999; Glossmann, Josting et al. 2002). Hodgkin-Lymphome können zwar mit heute angewendeten Therapiestrategien kurativ behandelt werden, allerdings wird der Erfolg dieser hervorragenden klinischen Ergebnisse durch eine ständig steigende Zahl von Spättoxizitäten in Form von Zweitneoplasien u. ä. erheblich geschmälert (Glossmann, Josting et al. 2002). In der Behandlung großzellig anaplastischer Lymphome besteht ebenfalls klinischer Handlungsbedarf, da Patienten mit dieser Erkrankung mit gängigen therapeutischen Maßnahmen nach wie vor eine sehr schlechte Prognose haben (Falini, Pileri et al. 1999; Gascoyne, Aoun et al. 1999).

In unserer Arbeit wurde deshalb nach neuen therapeutischen Optionen auf der Basis der Untersuchung molekularer Defekte dieser Erkrankungen gesucht. Die hier vorliegenden Arbeiten meiner Arbeitsgruppe zeigen, dass ein Derivat von Rapamycin, Everolimus bzw. RAD genannt, sehr effizient das Tumorzellwachstum von Hodgkin und großzellig anaplastischen Lymphomzelllinien *in vitro* und in Mausmodellen *in vivo* blockieren kann (Jundt et al., zur Veröffentlichung in JCI eingereicht).

RAD wurde bereits als hochwirksam in der Behandlung von Posttransplantationslymphomen beschrieben, die sich aus EBV transformierten B-Zellen entwickeln (Majewski, Korecka et al. 2000; Majewski, Korecka et al. 2003). Da diese Substanz ursprünglich in der Organtransplantationsmedizin als Immunsuppressivum eingesetzt wurde, bilden die anti-proliferativen Eigenschaften zur Behandlung von Tumorerkrankungen einen sehr wichtigen

weiteren therapeutischen Ansatzpunkt (Schuler, Sedrani et al. 1997; Schuurman, Cottens et al. 1997; Hausen, Ikonen et al. 2000).

In der hier vorliegenden Arbeit konnten wir nun die Wirksamkeit von RAD gegen Hodgkin und großzellig anaplastische Lymphome insbesondere auf einen RAD vermittelten Zellzyklusarrest in der G1-Phase zurückführen (Jundt et al., zur Veröffentlichung in JCI eingereicht). RAD löst keinen programmierten Zelltod in den Tumorzelllinien aus, so dass wir die potentielle klinische Anwendung dieser Substanz in ihrem Einsatz in einer Kombinationschemotherapie sehen (Jundt et al., zur Veröffentlichung in JCI eingereicht).

Insbesondere das Nebenwirkungsspektrum von Rapamycin Derivaten (CCI 779), die bereits in klinischen Studien der Phase III in der Behandlung solider Tumore (z. B. nicht kleinzellige Bronchialkarzinome) eingesetzt werden, ist nach heutigem Wissensstand begrenzt und vor allem unter klinischen Gesichtspunkten gut beherrschbar (Huang and Houghton 2002; Huang and Houghton 2003). Aus diesem Grund sehen wir die zukünftige Anwendung von RAD in der Therapie maligner Lymphome als gut umsetzbar. Selbstverständlich bedarf jedoch der Einsatz von RAD der kritischen Überprüfung in kontrollierten klinischen Studien.

Wir konnten darüber hinaus bei der Anwendung von RAD bei Hodgkin und großzellig anaplastischen Lymphomen zwei wichtige neue molekulare Mechanismen seiner anti-proliferativen Wirksamkeit zeigen (Jundt et al., zur Veröffentlichung in JCI eingereicht). RAD, das den mammalian target of rapamycin (mTOR) Signalweg inhibiert, regelt die translational gesteuerte Expression der trunkierten Form des Transkriptionsfaktors CCAAT enhancer binding protein (C/EBP) $\beta$  herunter (Jundt et al., zur Veröffentlichung in JCI eingereicht). Von dieser trunkierten Form ist bekannt, dass sie die Proliferation von Zellen massiv stimuliert (Raught, Gingras et al. 1996; Calkhoven, Muller et al. 2000; Zahnaw, Cardiff et al. 2001). Des Weiteren zeigt unsere Arbeit erstmals, dass RAD den für das Tumorzellwachstum und das Überleben von Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen essentiellen NF- $\kappa$ B Signalweg blockiert (Jundt et al., zur Veröffentlichung in JCI eingereicht). Die Blockade des NF- $\kappa$ B Signalwegs, der auch durch Arsen Derivate in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen erreicht werden kann, ist eine neue therapeutische Option in der Behandlung von Hodgkin-Lymphomen (Mathas, Lietz et al., 2002). Von Arsen konnte in unserer Arbeitsgruppe in der Abteilung von Professor Dörken gezeigt werden, dass durch die pharmakologische Inhibition der IKK/NF- $\kappa$ B Aktivität in Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen Apoptose ausgelöst wird (Mathas, Lietz et al., 2002).

Die Bedeutung der Aufklärung der beiden molekularen Mechanismen der RAD Wirkung in Tumorzellen von Hodgkin und großzellig anaplastischen Lymphomzellen - Blockade der

Translation der trunkierten Form von C/EBP $\beta$  und Inhibition der permanenten NF- $\kappa$ B Aktivität - wird insbesondere durch Komplementationsexperimente unterstrichen, die den RAD-vermittelten Effekt rückgängig machen können (Jundt et al., zur Veröffentlichung in JCI eingereicht). Die hier vorgestellte Arbeit befindet sich derzeit beim Journal of Clinical Investigation in Revision.

## 1.4. Literatur

Anderson, K. C., R. A. Kyle, et al. (2000). "Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 147-165.

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-6.

Bargou, R. C., F. Emmerich, et al. (1997). "Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells." J Clin Invest **100**(12): 2961-9.

Bargou, R. C., C. Leng, et al. (1996). "High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells." Blood **87**(10): 4340-7.

Bash, J., W. X. Zong, et al. (1999). "Rel/NF-kappaB can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors." Embo J **18**(10): 2803-11.

Beg, A. A., W. C. Sha, et al. (1995). "Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice." Genes Dev **9**(22): 2736-46.

Bellavia, D., A. F. Campese, et al. (2000). "Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice." Embo J **19**(13): 3337-48.

Brenner, M. (2000). "To be or notch to be." Nat Med **6**(11): 1210-1.

Calkhoven, C. F., C. Muller, et al. (2000). "Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression." Genes Dev **14**(15): 1920-32.

Capobianco, A. J., P. Zagouras, et al. (1997). "Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2." Mol Cell Biol **17**(11): 6265-73.

- Cariappa, A., H. C. Liou, et al. (2000). "Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes." J Exp Med **192**(8): 1175-82.
- Chatterjee, M., D. Honemann, et al. (2002). "In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway." Blood **100**(9): 3311-8.
- Chatterjee, M., T. Stuehmer, et al. (2004). "Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells." Blood **104**(12):3712-3721.
- Cheng, P., A. Zlobin, et al. (2001). "Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells." J Immunol **167**(8): 4458-67.
- Clausen, B. E., C. Burkhardt, et al. (1999). "Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice." Transgenic Res **8**(4): 265-77.
- Doi, T. S., T. Takahashi, et al. (1997). "NF-kappa B RelA-deficient lymphocytes: normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses." J Exp Med **185**(5): 953-61.
- Emmerich, F., M. Meiser, et al. (1999). "Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells." Blood **94**(9): 3129-34.
- Espinosa, L., S. Santos, et al. (2002). "p65-NFkappaB synergizes with Notch to activate transcription by triggering cytoplasmic translocation of the nuclear receptor corepressor N-CoR." J Cell Sci **115**(Pt 6): 1295-303.
- Falini, B., S. Pileri, et al. (1999). "ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome." Blood **93**(8): 2697-706.
- Gascoyne, R. D., P. Aoun, et al. (1999). "Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma." Blood **93**(11): 3913-21.

- Glossmann, J. P., A. Josting, et al. (2002). "New treatments for Hodgkin's disease." Curr Treat Options Oncol **3**(4): 283-90.
- Grinstein, E., F. Jundt, et al. (2002). "Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells." Oncogene **21**(10): 1485-92.
- Hausen, B., T. Ikonen, et al. (2000). "Combined immunosuppression with cyclosporine (neoral) and SDZ RAD in non-human primate lung transplantation: systematic pharmacokinetic-based trials to improve efficacy and tolerability." Transplantation **69**(1): 76-86.
- Horwitz, B. H., M. L. Scott, et al. (1997). "Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF-kappaB-deficient fetal liver cells." Immunity **6**(6): 765-72.
- Hsu, S. M. and P. L. Hsu (1994). "The nature of Reed-Sternberg cells: phenotype, genotype, and other properties." Crit Rev Oncog **5**(2-3): 213-45.
- Huang, S. and P. J. Houghton (2002). "Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic." Curr Opin Investig Drugs **3**(2): 295-304.
- Huang, S. and P. J. Houghton (2003). "Targeting mTOR signaling for cancer therapy." Curr Opin Pharmacol **3**(4): 371-7.
- Jundt, F., I. Herr, et al. (1995). Transcriptional control of human papillomavirus type 18 oncogene expression in different cell lines: role of transcription factor YY1. Virus Genes **11**:53-58.
- Jundt, F., I. Anagnostopoulos, et al. (1999). "Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils." Blood **94**(6): 2065-71.
- Jundt, F., I. Anagnostopoulos, et al. (2002). "Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma." Blood **99**(9): 3398-403.

- Jundt, F., K. Kley, et al. (2002). "Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease." Blood **99**(8): 3060-2.
- Jundt, F., K. S. Probsting, et al. (2004). "Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells." Blood **103**(9): 3511-5.
- Jundt, F., N. Raetzl, et al. (2004). A rapamycin derivative (RAD) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein  $\beta$  and NF- $\kappa$ B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. JCI, zur Veröffentlichung eingereicht.
- Kanzler, H., M. L. Hansmann, et al. (1996). "Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient." Blood **87**(8): 3429-36.
- Kanzler, H., R. Kuppers, et al. (1996). "Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells." J Exp Med **184**(4): 1495-505.
- Kaufman, D. and D. L. Longo (1992). "Hodgkin's disease." Crit Rev Oncol Hematol **13**(2): 135-87.
- Klement, J. F., N. R. Rice, et al. (1996). "I $\kappa$ B $\alpha$  deficiency results in a sustained NF- $\kappa$ B response and severe widespread dermatitis in mice." Mol Cell Biol **16**(5): 2341-9.
- Krappmann, D., F. Emmerich, et al. (1999). "Molecular mechanisms of constitutive NF- $\kappa$ B/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells." Oncogene **18**(4): 943-53.
- Kuppers, R. and K. Rajewsky (1998). "The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease." Annu Rev Immunol **16**: 471-93.

Kuppers, R., K. Rajewsky, et al. (1994). "Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10962-6.

Loddenkemper, C., I. Anagnostopoulos, et al. (2004). "Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas." J Pathol **202**(1): 60-9.

Majewski, M., M. Korecka, et al. (2003). "Immunosuppressive TOR kinase inhibitor everolimus (RAD) suppresses growth of cells derived from posttransplant lymphoproliferative disorder at allograft-protecting doses." Transplantation **75**(10): 1710-7.

Majewski, M., M. Korecka, et al. (2000). "The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: A potential approach to prevention and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4285-90.

Mathas, S., M. Hinz, et al. (2002). "Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B." Embo J **21**(15): 4104-13.

Mathas, S., A. Lietz, et al. (2004). "c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis." J Exp Med **199**(8): 1041-52.

Milner, L.A. (2004). "Notch signaling: a key to the pathogenesis of multiple myeloma?" Blood **103**(9): 3253.

Ni, H., M. Ergin, et al. (2001). "Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis." Br J Haematol **115**(2): 279-86.

- Nickoloff, B. J., J. Z. Qin, et al. (2002). "Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma." Cell Death Differ **9**(8): 842-55.
- Poppema, S., J. Kaleta, et al. (1992). "Biology of Hodgkin's disease." Ann Oncol **3 Suppl 4**: 5-8.
- Raught, B., A. C. Gingras, et al. (1996). "Expression of a translationally regulated, dominant-negative CCAAT/enhancer-binding protein beta isoform and up-regulation of the eukaryotic translation initiation factor 2alpha are correlated with neoplastic transformation of mammary epithelial cells." Cancer Res **56**(19): 4382-6.
- Rudiger, T., E. S. Jaffe, et al. (1998). "Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases ('grey zone' lymphoma)." Ann Oncol **9 Suppl 5**: S31-8.
- Rupec, R.A., F. Jundt, et al. (2004). Stroma-mediated dysregulation of liver and bone marrow myelopoiesis in mice lacking I $\kappa$ B- $\alpha$ . Immunity, zur Veröffentlichung eingereicht.
- Schroder, T. and U. Just (2000). Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. Embo J **19**(11):2558-2568.
- Schuler, W., R. Sedrani, et al. (1997). "SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo." Transplantation **64**(1): 36-42.
- Schuurman, H. J., S. Cottens, et al. (1997). "SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine." Transplantation **64**(1): 32-5.
- Stein, H., H. D. Foss, et al. (2000). "CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features." Blood **96**(12): 3681-95.
- Wang, J., L. Shelly, et al. (2001). "Human Notch-1 inhibits NF-kappa B activity in the nucleus through a direct interaction involving a novel domain." J Immunol **167**(1): 289-95.
- Zahnow, C. A., R. D. Cardiff, et al. (2001). "A role for CCAAT/enhancer binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein in mammary epithelial cell proliferation." Cancer Res **61**(1): 261-9.

## 1.5. Zusammenfassung

Die Identifikation molekularer Mechanismen und Defekte in der Wachstumskontrolle und Differenzierung neoplastischer Zellen ist die Grundlage für neue therapeutische Strategien. Gegenstand der hier vorliegenden Habilitationsschrift ist die Aufklärung von Teilschritten der Pathogenese von Hodgkin-Lymphomen und Multiplen Myelomen. Aus dieser Arbeit resultieren darüber hinaus neue Therapieansätze.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass aktivierte Notch-Rezeptoren in Tumorzellen der Hodgkin-Lymphome und Multiplen Myelome überexprimiert sind, das Tumorzellwachstum und – überleben steuern und vor allem bestimmte Differenzierungsschritte blockieren können. Insbesondere die Aufklärung des onkogenen Potentials von Notch-Rezeptoren ist für die Tumorbiologie von Hodgkin-Lymphomen von großer Bedeutung, da sie auf die Identifikation eines „Master-Gens“ für diese Lymphomkrankung hinweist. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultieren neue therapeutische Ansätze, da die Arbeiten als Vorarbeit für den Einsatz sogenannter  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren dienen, die gezielt den aktivierten Notch Signalweg blockieren. In Mausmodellen wurde das Tumorzellwachstum von Hodgkin-Lymphomzellen durch  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren vollständig unterdrückt. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die hervorragende Wirksamkeit von  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren in der potentiellen Behandlung von Tumorerkrankungen mit dereguliertem Notch Signalweg wie z.B. Hodgkin-Lymphome und Multiplen Myelome.

Schlagwörter:

Hodgkin-Lymphome – Multiple Myelome – Notch Signalweg – neue Therapieansätze

### Abstract

Identification of molecular mechanisms and defects in growth control and differentiation of neoplastic cells is a prerequisite for novel therapeutic strategies.

In the studies presented here, activated Notch receptors were found to be over-expressed in Hodgkin lymphomas and multiple myelomas. Notch receptors control tumor cell growth and survival and can block distinct differentiation stages of these tumor cells. Importantly, the studies further provide evidence for the great oncogenic potential of Notch receptors in the tumor biology of Hodgkin lymphoma and multiple myeloma and therefore identify Notch receptors as “master genes” of these diseases. Furthermore, the studies clearly demonstrate that specifically blocking the Notch signaling pathway by  $\gamma$ -secretase inhibitors can be a novel therapeutic option for Hodgkin lymphomas and multiple myelomas. Using mouse

models the studies show that tumor growth of lymphoma cells can be completely blocked by  $\gamma$ -secretase inhibitors.

In essence, the studies provide evidence for the potential excellent efficacy of  $\gamma$ -secretase inhibitors in the treatment of cancers with deregulated Notch signaling pathway such as Hodgkin lymphomas and multiple myelomas.

Keywords:

Hodgkin lymphoma – multiple myeloma – Notch signaling pathway –  
novel therapeutic strategies

## 2. Originalarbeiten zum Habilitationsthema

1. Jundt, F., Herr, I., Angel, P., zur Hausen, H., and Bauknecht, T. (1995). Transcriptional control of human papillomavirus type 18 oncogene expression in different cell lines: role of transcription factor YY1. *Virus Genes* 11:53-58.
2. Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Bommert, K., Emmerich, F., Müller, G., Foss, H.D., Royer, H.D., Stein, H., and Dörken, B. (1999). Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood* 94:2065-2071.
3. Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H.D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., and Dörken, B. (1999). Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF- $\kappa$ B activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 94:3129-3134.
4. Grinstein, E., Jundt, F., Weinert, I., Wernet, P., and Royer, HD. (2002). Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* 21:1485-1492.
5. Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Förster R., Mathas, S., Stein, H. and Dörken, B. (2002). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99:3398-3403.
6. Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Schulze Pröbsting, K., Greiner, A., Mathas, S., Scheidereit, C., Wirth, T., Stein, H., Dörken, B. (2002). Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood* 99:3060-3062.
7. Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mehta-Grigoriou, F., Stein, H., Dörken, B., and Scheidereit, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* 21:4104-4113.
8. Mathas, S., Lietz, A., Janz, M., Hinz, M., Jundt, F., Scheidereit, C., Bommert, K., and Dörken, B. (2003). Inhibition of NF- $\kappa$ B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 102:1028-1034.

9. Loddenkemper, C., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Jöhrens-Leder, K., Foss, H.D., Jundt, F., Wirth, T., Dörken, B., Stein, H. (2004). Differential Eμ enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol.* 202:60-69.
  
10. Jundt, F., Schulze Pröbsting, K., Anagnostopoulos, I., Muehlinghaus, G., Chatterjee, M., Mathas, S., Bargou, R.C., Manz, R., Stein, H., and Dörken, B. (2004). Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* 103:3511-3515.
  
11. Mathas, S., Lietz, A., Anagnostopoulos, I., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M., Jundt, F., Hirsch, B., Jöhrens-Leder, K., Vornlocher, HP., Bommert, K., Stein H., and Dörken, B. (2004). c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med.* 199:1041-1052.

### 3. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Bernd Dörken, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie der Charité am Campus Virchow-Klinikum, Universitätsmedizin Berlin. Herr Professor Dörken begleitete mich als wissenschaftlicher Mentor seit dem Abschluss meines Studiums und meiner Promotion an der Ruprecht-Karls Universität in Heidelberg 1996. Durch viele konstruktive Diskussionen mit ihm wurde mein Verständnis für wissenschaftliche Zusammenhänge geschult. Seine analytische Denkweise hat mich in meiner wissenschaftlichen Arbeit immer stimuliert und vorangebracht.

Herrn Professor Pezzutto, stellvertretenden Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie der Charité am Campus Virchow-Klinikum, danke ich für seine Hilfe und Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung.

Herrn Professor Dr. Harald zu Hausen ehemaliger Stiftungsvorstand des Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg danke ich ganz herzlich für die Betreuung meiner Promotionsarbeit und seiner nachhaltigen wissenschaftlichen Förderung. Meine Promotionsarbeit bildete für mich eine hervorragende Grundlage für meine wissenschaftliche Arbeit in den folgenden Jahren an der Charité in Berlin.

Meinen Kolleginnen und Kollegen an der Medizinischen Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Virchow-Klinikum und am Campus Berlin-Buch der Charité sowie am Max-Delbrück Centrum in Berlin danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und den Austausch wichtiger Erfahrungen in Klinik und Labor.

Bedanken möchte ich mich bei meinen nationalen und internationalen Kooperationspartnern Professor Dr. Reinhold Förster, Professor Dr. Wolfgang Hammerschmidt, Professor Dr. Klaus Pfeffer, Professor Dr. Christopher Baum und Professor Dr. Lucio Miele für die anhaltende Diskussion über wissenschaftliche Zusammenhänge und die aufmerksame und zugewandte Unterstützung meiner Forschungsarbeit.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe an der Charité in Berlin gilt mein besonderer Dank. Durch ihr wissenschaftliches Engagement und ihre Leistungsbereitschaft ist uns gemeinsam der Aufbau einer produktiven jungen Forschergruppe gelungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Deutschen Krebshilfe und der Berliner Krebsgesellschaft danke ich für die großzügige Unterstützung meiner Forschungsprojekte.

Danken möchte ich außerdem der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre Förderung.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinem Mann für die intensive Unterstützung meiner bisherigen Laufbahn durch viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

## 4. Lebenslauf

Dr. med. med Franziska Jundt

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie

Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum

und Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin

Augustenburger Platz 1

13353 Berlin

Telefon: 030-450 553 192

Fax: 030-450 553 914

E-mail: [fjundt@mdc-berlin.de](mailto:fjundt@mdc-berlin.de)

Geburtsdatum: 20.10.1970

Geburtsort: Heidelberg

Familienstand: verheiratet

### Ausbildung und wissenschaftlicher Werdegang:

1989	Hochschulreife humanistisches Kurfürst-Friedrich Gymnasium Heidelberg, Abitur: 1.0 (Durchschnittsnote)
1989-1996	Studium der Humanmedizin Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  Innere Medizin an der University of Birmingham, England  Innere Medizin an der Clinica Medica dell'Universita, Catania, Italien  Innere Medizin am Massachusetts General Hospital und Hämatologie/Onkologie am Children's Hospital der Harvard University, Boston  Chirurgie am Moffit-Long Hospital der University of California, San Francisco
1995, 1996	Erster und zweiter Abschnitt des United States Medical Licensing Examination
1996	Ärztliche Prüfung

- 1996 Promotion  
 Betreuer: Professor Dr. Dr. h.c. H. zur Hausen  
 Thema der Dissertation: Transkriptionelle Regulation des humanen Papillomvirus Typ18 – Rolle des Transkriptionsfaktors YY1 – am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg (magna cum laude)
- 1997-2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Robert-Rössle Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie am Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Berlin-Buch  
 Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. B. Dörken
- 1999 Tätigkeit als Post-Doc am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Technische Universität München bei Professor Dr. med. K. Pfeffer  
 Thema: Molekulare Kontrolle der B-Zellentwicklung und Lymphomentstehung im Mausmodell
- seit Juli 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Fortbildung zur Fachärztin für Innere Medizin) und Leiterin der Arbeitsgruppe zur Untersuchung der molekularen Pathogenese von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen  
[http://www.charite.de/rv/imed/ag\\_jundt.htm](http://www.charite.de/rv/imed/ag_jundt.htm)  
 an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum  
 Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. B. Dörken
16. Februar 2005 Facharztprüfung für das Fach Innere Medizin

### Preise und Auszeichnungen

- 1991-1996 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 2001 Karl-Mussoff Preis für die Arbeiten zum Notch1 Signalweg in Hodgkin und großzellig anaplastischen Lymphomen auf dem "Fifth International Symposium on Hodgkin's Lymphoma", Köln



seit 2004

Drittmittelgeber: Deutsche Forschungsgemeinschaft  
Klinische Forschergruppe KFO105 „Wachstumskontrolle  
neoplastischer B-Zellen: Tumorbilogie und molekulare  
Therapieansätze (Januar 2005-Dezember 2007)  
Projekt: Deregulation von B-Zell-Transkriptionsfaktoren  
und die Rolle von Notch-Rezeptoren in Hodgkin-Lymphomen  
(Jundt/Hummel)

## 5. Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

17. November 2004

Datum

Unterschrift