

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die CXCL13 induzierte ektope Entstehung lymphatischen Gewebes
dirigiert die Dissemination von Lymphomzellen der *E μ -Myc*
transgenen Maus

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elif Gül

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.5.2015

INHALT

TABELLEN	5
ABBILDUNGEN	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
ABSTRAKT	10
ABSTRACT	11
1. EINLEITUNG	12
1.1. CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN	12
1.2. LYMPHATISCHE GEWEBE UND DIE MIGRATION VON LYMPHOZYTEN	14
1.3. MIGRATION VON ZELLEN SOLIDER UND HÄMATOLOGISCHER NEOPLASIEN	16
1.4. FRAGESTELLUNG.....	17
2. METHODIK	18
2.1. MÄUSE	18
2.1.1. Genotypisierung	18
2.2. ADOPTIVER TRANSFER.....	20
2.3. ERKRANKUNG UND ÜBERLEBEN.....	20
2.4. HISTOLOGIE	20
2.4.1. Hämalaun und Eosin Übersichtsfärbung.....	20
2.4.2. Stereologie.....	21
2.5. IMMUNHISTOCHEMIE	22
2.6. IMMUNZYTOMETRIE	23
2.6.1. Vorbereitung einer Einzelzellsuspension	23
2.6.2. Zellfärbung und Detektion durch Immunzytometrie	24
2.7. QUANTITATIVE POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	25
2.7.1. Quantifizierung und Integrität der RNA	25
2.7.2. Reverse Transkription	25
2.7.3. Realtime-Polymerase Kettenreaktion.....	25
2.7.4. Produktreinheit und Gelelektrophorese.....	26
2.7.5. Auswertung	27
2.8. WESTERN BLOTTING	27
2.8.1. Bestimmung der Proteinmenge (BCA-Methode).....	27
2.8.2. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.8.3. Blotten auf Nitrocellulosemembranen	28
2.8.4. Signaldetektion.....	28

3. ERGEBNISSE	30
3.1. DIE CXCL13 INDUZIERT EKTOTE LYMPHONEOGENESE IM PANKREAS UND IHRE AUSWIRKUNG AUF DIE LYMPHOMZELLMIGRATION	35
3.1.1. Die inselspezifische Migration von Lymphomzellen.....	37
3.1.2. Adoptiver Transfer von Lymphomzellen.....	39
3.1.3. Abhängigkeit von der CXCL13-CXCR5 Signalkaskade	41
3.1.4. Abhängigkeit von Lymphozyten.....	45
3.1.5. Überleben	47
3.2. CHARAKTERISIERUNG EINES MAUSMODELLS FÜR CXCL13 - MEDIIERTE MIGRATION VON LYMPHOMZELLEN INS ZNS	48
4. DISKUSSION.....	50
4.1. WAHL DES VERSUCHSDESIGNS.....	50
4.2. EIGNUNG DER MAUSMODELLE	50
4.3. EINFLUSS VON CXCL13 AUF DIE LYMPHOMMIGRATION.....	51
4.4. EINFLUSS VON LYMPHOZYTEN AUF DIE LYMPHOMMIGRATION	51
4.5. ÜBERLEBEN.....	52
4.6. ZNS MODELL.....	53
4.7. AUSBLICK	53
ZUSAMMENFASSUNG.....	55
LITERATURVERZEICHNIS	57
DANKSAGUNG	63
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	64
LEBENS LAUF	65

TABELLEN

Tabelle 1. Mäuse.....	18
Tabelle 2. Nukleotidsequenzen* (Genotypisierung)	19
Tabelle 3. PCR-Ansatz (Genotypisierung).....	19
Tabelle 4. PCR-Programm* (Genotypisierung).....	19
Tabelle 5. Hämalaun und Eosin Färbung	21
Tabelle 6. Primäre Antikörper (IHC).....	22
Tabelle 7. Sekundäre Antikörper (IHC)	22
Tabelle 8. Antikörper (FCM).....	24
Tabelle 9. Nukleotidsequenzen (qPCR)	26
Tabelle 10. Primäre Antikörper (WB).....	29
Tabelle 11. HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper (WB).....	29

ABBILDUNGEN

Abbildung 1. Diapedesis.....	15
Abbildung 2. Schmelzpunktanalyse.....	26
Abbildung 3. Immunhistologischer Phänotyp der <i>Eμ-Myc</i> Lymphomzellen.....	31
Abbildung 4. Immunphänotypisierung der <i>Eμ-Myc</i> Lymphomzellen.....	31
Abbildung 5. Ki67 Färbung von Pankreas, Milz und Lymphknoten der <i>Rip-CXCL13</i> Maus.....	32
Abbildung 6. CXCL13 mRNA Expression im <i>Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc</i> Pankreas.....	33
Abbildung 7. CXCL13 Proteinexpression im <i>Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc</i> Pankreas.....	34
Abbildung 8. Pankreatische Lymphomzellinfiltration.....	35
Abbildung 9. Inselinfiltrate in <i>Eμ-Myc</i> und <i>Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc</i> Pankreata.....	36
Abbildung 10. B-Lymphozyten überwiegen in den Inselinfiltraten im <i>Rip-CXCL13</i> Pankreas.....	37
Abbildung 11. Charakterisierung der Lymphomzellinfiltrate im <i>Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc</i> Mausmodell.....	38
Abbildung 12. Pankreatische Lymphominfiltration nach adoptivem Transfer.....	39
Abbildung 13. Inselinfiltrate nach adoptivem Transfer.....	40
Abbildung 14. Pankreatische Lymphomzellmigration nach CXCR5 Deletion.....	41
Abbildung 15. Inselinfiltrate nach CXCR5 Deletion und adoptivem Transfer.....	42
Abbildung 16. CXCR5 mRNA Expression in <i>Eμ-Myc</i> Lymphomen.....	42
Abbildung 17. CXCR5 Oberflächenexpression in <i>Eμ-Myc</i> Lymphomen.....	43
Abbildung 18. CXCR5 unabhängige Dissemination von Lymphomzellen.....	44
Abbildung 19. Lymphozytenmigration in <i>Langerhans</i> Inseln der <i>Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}</i> Mäuse.....	45
Abbildung 20. Pankreatische Lymphomzellinfiltration in <i>tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}</i> Mäuse.....	46
Abbildung 21. Inselinfiltrate in <i>tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}</i> Mäuse.....	46
Abbildung 22. Überleben von <i>Eμ-Myc</i> positivem Nachwuchs.....	47
Abbildung 23. Cerebrale CXCL13 Expression im <i>Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc</i> Mausmodell.....	48
Abbildung 24. Histologie der Cerebra von <i>Eμ-Myc</i> und <i>Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc</i> Mäusen.....	49

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACKR	offizielle Abkürzung für atypischer Chemokinrezeptor
ACKR6	atypischer Chemokinrezeptor 6, früher PITPNM3
AP	Alkalische Phosphatase
Avg	engl. <i>average</i>
B220	B-Zellmarker
BCA	Bicinchoninsäure
BCL	B-Zelllymphom
BCR	B-Zellrezeptor
BHS	Blut-Hirnschranke
BSA	Rinderserumalbumin
CCR7	Chemokinrezeptor, Interaktion mit CCL21 und CCL19
CCL21 und 19	Chemokinliganden der CC-Familie, Interaktion mit CCR7
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CKBP	engl. <i>chemokine binding protein</i>
CKBR	engl. <i>chemokine binding receptor</i>
Ct	engl. <i>threshold cycle</i>
CXCL12, 13 etc.	Chemokinliganden der CXC-Familie
CXCR4, 5 etc.	Chemokinrezeptoren, die CXC-Chemokine binden
DAB	Diaminobenzidin
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zelllymphom
DMEM	Zellkultur-Nährmedium
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DRYLAIV	Aminosäurenabfolge, vermittelt die G-Proteinbindung
NaDOC	Natrium-Desoxycholat, Detergens
ECL	Elektrochemilumineszenz
ELR	Aminosäurenabfolge in Chemokinen
FCM	Durchflusszytometrie
FELASA	engl. <i>Federation for Laboratory Animal Science Associations</i>
FSC	Vorwärtsscatte
GALT	engl. <i>gut-associated lymphoid tissue</i>

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<i>Gfap</i>	engl. <i>glial fibrillary acid protein promoter</i>
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanosintriphosphat
HAART	hochaktive anti-retrovirale Therapie
HE	Hämalaun und Eosin Färbung
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
KCR	klassischer Chemokinrezeptor
KG	Körpergewicht
Ki67	Antikörperbezeichnung, Proliferationsmarker
LAGESO	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LCM	Laser-Mikrodissektion
LT	Lymphotoxin
<i>LTi</i> Zellen	engl. <i>lymphoid tissue inducer</i> Zellen
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAdCAM-1	endotheliales Zelladhäsionsmolekül (Mukosa und Entzündung)
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MIP-1 β	engl. <i>macrophage inflammatory protein 1 beta</i> , neu CCL4
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NMR	Nukleäre Magnetresonanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALS	engl. <i>periarteriolar lymphoid sheath</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCNSL	Primäres ZNS Lymphom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PF-4	engl. <i>platelet factor 4</i> , neu CXCL4
PLI	perivaskuläre Lymphominfiltration
PNAd	engl. <i>peripheral lymph node adhesion molecule</i>

PP	<i>Peyer Plaques</i>
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
<i>Rag1</i> und 2	Rekombination aktivierende Gene 1 und 2
RIN	engl. <i>RNA integrity number</i>
<i>Rip</i>	Ratten-Insulin Promoter in <i>Langerhans</i> Inseln des Pankreas
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
<i>RORγ</i>	engl. <i>retinoid-related orphan receptor gamma</i>
RQ	Relative Quantität
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Realtime-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLO	Sekundär lymphatische Organe
SSC	Seitwärtsscatter
T-ALL	Akute T-Zell-Leukämie
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> , Herkunft der hitzestabilen DNA Polymerase
TCR	T-Zellrezeptor
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidyl-Transferase
TLT	Tertiär lymphatisches Gewebe
<i>tx</i>	transplantiert
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
<i>V. sublingualis</i>	<i>Vena sublingualis</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABSTRAKT

Non-Hodgkin Lymphome mit primären und sekundären extranodalen Manifestationen, die prognosebestimmend sind, stellen hinsichtlich dem Fehlen individualisierter Therapien und Standards in der Auswertung des Therapieerfolges eine klinische Herausforderung dar. Die Migration maligner Zellen kann sich auf die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren stützen. Dabei wurde erstmalig für die gewebespezifische Migration von Mammakarzinomen und von T-ALL Zellen im Mausmodell eine Abhängigkeit von homöostatischen Chemokinen und ihren Rezeptoren nachgewiesen [1, 2]. *In vivo* Modelle für die Simulation von Lymphomzelldissemination sind bislang nicht verfügbar. Bisherige Untersuchungen an primären und sekundären humanen NHL-Zellkulturen bleiben den Nachweis einer Funktionalität im lebenden Organismus schuldig. Bisher blieb dabei die Bedeutung von Entzündungen und neu gebildeten tertiären lymphatischen Geweben (TLT), die eng mit der Expression von Chemokinen verbunden sind, ununtersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Kombination von zwei etablierten transgenen Modellen die gezielte Migration von murinen Lymphomzellen (*E μ -Myc*) in ektop CXCL13 exprimierende β -Zellen der *Langerhans* Inseln des Pankreas (*Rip-CXCL13*) induziert werden. Dieses Phänomen war direkt von den im Zuge der ektopen CXCL13 Expression eingewanderten Lymphozyten abhängig und mit einem signifikant verringerten medianen Überleben vergesellschaftet, wenn mit Wildtyp *E μ -Myc* Tieren verglichen wurde.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass murine Lymphomzellen bei der extranodalen Dissemination bevorzugt auf die Verfügbarkeit von Lymphozyten und im weiteren Sinne von neu gebildeten lymphatischen Geweben zurückgreifen. Die molekularen Mechanismen schließen mögliche Chemokin- und Chemokinrezeptor-Interaktionen ein und sind aktuell noch Gegenstand der Untersuchung.

ABSTRACT

Primary and secondarily upcoming extranodal dissemination of NHL challenges daily life and work of patients and hematologists. Whether through direct infiltration or through therapy patients often face severe dysfunction of affected organs that limits therapy and associates with a poor survival. The migratory capacity of malignant cells may rely on the expression of homeostatic chemokines and their respective receptors. As proven in murine models for breast cancer and T-ALL tissue-specific dissemination depended upon distinct expression of certain chemokine receptors [1, 2]. Still, underlying mechanisms for extranodal dissemination of NHL remain unresolved as well as genetic models are missing. *In vitro* analyses upon human biopsy material favour chemokine and receptor interactions, but are irrespective of inflamed and *de novo* formed lymphoid tissues that are closely intertwined with the expression of chemokines and their receptors.

Combining two known transgenic mouse models, we show that by introducing ectopic expression of the homeostatic chemokine CXCL13 (*Rip-CXCL13*) murine *E μ -Myc* lymphoma cells migrate specifically towards pancreatic islets. This finding strongly depended upon lymphocyte recruitment and significantly associated to a poorer median survival of *Rip-CXCL13*^{+/-}*E μ -Myc* mice when compared to wildtype *E μ -Myc* mice.

This study shows that lymphoma cells prefer ectopically recruited lymphocytes, as is a common feature of chronically inflamed tissues and tertiary lymphoid tissues (TLT), for the dissemination from nodal to extranodal. This experimental design further may enable dissecting the cellular and molecular pathways that cover lymphoma dissemination and may serve for future targeted therapies.

1. EINLEITUNG

1.1. CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN

Chemokine sind Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, die sich durch ihre chemotaktische Wirkung auf Zellen auszeichnen. Die Einteilung der Chemokine erfolgt anhand der Primärstruktur, die durch die Anordnung der ersten beiden von mehreren bis zu sechs untereinander Disulfidbrücken ausbildenden Cysteinresten bestimmt wird. Dabei unterscheidet man CC- (zwei aufeinanderfolgende Cysteine), CXC- (zwei Cysteine, die durch eine beliebige Aminosäure getrennt werden) und CX3C-Chemokine (zwei Cysteine, die durch drei Aminosäuren getrennt werden) [3]. Eine Sonderstellung nehmen die C-Chemokine XCL1 und XCL2 ein, die durch alternatives Splicing entstehen und lediglich zwei Cysteinreste besitzen. Aus der CX3C-Subfamilie ist bisher nur das CX3CL1 Chemokin bekannt, welches Fractalkine genannt wird und aufgrund seiner Bindung an einen Oberflächenrezeptor einzigartig ist. Die übrigen Chemokine treten frei sezerniert, an Glykosaminoglykane oder Fibronectin gebunden auf [4, 5].

Das meiste Wissen über Chemokinaufbau und -funktion wurde durch Nukleäre Magnet-Resonanz (NMR)- und Mutationsanalysen anhand von einigen Vertretern wie dem CXCL8, CXCL4 und CCL4 gewonnen [6-8]. Durch NMR zeigte sich, dass Chemokine überwiegend oligomerisieren, wenngleich davon ausgegangen wird, dass ihr Wirkmechanismus auf der monomeren Form beruht.

Chemokinrezeptoren gehören zu den Rhodopsin ähnlichen 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren, die nach Ligandenbindung durch Modulation der G-Proteinaktivität Signale nach intrazellulär transduzieren. Daneben existieren Rezeptoren, die mit oder ohne Kopplung an G-Proteine, Chemokine binden und Arrestin abhängig transduzieren, weswegen sie kürzlich als atypische Chemokinrezeptoren neu klassifiziert wurden [3]. Ein hartes Unterscheidungskriterium zwischen den klassischen und atypischen Chemokinrezeptoren stellt das DRYLAIV-Motif dar - die Aminosäurenabfolge am Ende der dritten transmembranären Helix, die die Kopplung an G-Proteine bedingt, und in den atypischen Chemokinrezeptoren fehlt oder modifiziert vorliegt, woraus die defekte G-Proteinbindung resultiert [3]. Während klassische Chemokinrezeptoren sich in der Wahl ihrer Liganden auf eine Chemokinsubfamilie beschränken, stehen den atypischen Chemokinrezeptoren offensichtlich alle Vertreter zur Wahl [3]. Aktuell sind sechs atypische Chemokinrezeptoren identifiziert. Ihre Funktionen sind noch nicht genau ermessens. Sie dienen als Chemokin-*Scavenger* und können durch Transcytose Chemokingradienten an

Orten aufbauen, in die Chemokine durch Diffusion nicht gelangen können. Sie können die Bindungsaffinität der klassischen Chemokinrezeptoren gegenüber Chemokinen modulieren [3]. Obwohl bisher die Ansicht vertreten wurde, dass sie nicht in der Lage seien, Zellmigration zu induzieren, wurde mit ACKR6 (ehemals PITPNM3) ein atypischer Chemokinrezeptor auf Tumor-assoziierten Makrophagen identifiziert, der die Lungen- und Lebermetastasierung von humanen Mammakarzinomzellen in einem murinen *Xenograft*-Modell förderte [9].

Neben den Chemokinrezeptoren existieren Chemokin-bindende Rezeptoren (CKBR) und Proteine (CKBP), die vornehmlich nicht-humanen Ursprungs sind (viral, durch Protozoen, Zecken). Ihre Erforschung gewährt einen Einblick in die Mechanismen der Immuntoleranz gegenüber Pathogenen und birgt ein hohes Potential für die Entwicklung neuer Therapien [3].

Bislang haben sich zwei Medikamente, die Chemokinrezeptoren angreifen, durchgesetzt: *Plerixafor* und *Celsentri* [3]. *Plerixafor* bindet CXCR4 und verhindert die Interaktion mit CXCL12. Dadurch kann die Infektion mit CXCR4 nutzenden HI-Viren unterdrückt werden. Als eine weitere Folge kommt es zur Leukozytose, bei der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark freigesetzt werden [10]. Seit 2009 ist *Plerixafor* in Deutschland in Kombination mit G-CSF für die Mobilisierung von autologen Stammzellen bei Patienten mit multiplem Myelom und Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen. *Celsentri* inhibiert den CD4-Ko-Rezeptor CCR5, wodurch die Infektion mit CCR5 nutzenden HI-Viren unterdrückt werden kann [11]. Weitere *targeted therapy* Ansätze wie zum Beispiel gegen CCR4 (Mogamulizumab) und CCR3 (ASM8) werden aktuell noch in klinischen Studien evaluiert [3].

Die Aktivierung von Chemokinrezeptoren erfolgt via *N*-Terminus der Chemokine. Dabei dient die Aminosäureabfolge aus Glutaminsäure, Leucin und Arginin (ELR Motif) der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [12]. Chemokine, denen dieses Motif fehlt, wie das CXCL12 und CXCL13 Chemokin treten z.B. als Attrahenten für Lymphozyten auf.

Die Chemokinrezeptorfunktion kann gewebe- und zellabhängig homöostatisch und oder inflammatorisch sein. Während durch inflammatorische Chemokinexpression Effektorzellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen oder aktivierte T-Zellen angelockt werden, erfolgt durch die stete Chemokinexpression in sekundär lymphatischen Organen (SLO) die Werbung von zirkulierenden Lymphozyten, die durch wiederkehrende Antigenabfrage ihre Abwehrbereitschaft aufrecht halten (= Immunhomöostase). Bei der Aktivierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und T-Lymphozyten zu Th1 und Th2 Zellen kommt es zum Verlust der Expression der homöostatischen Chemokinrezeptoren wie CCR7 und CXCR5 [13-

15]. Da damit das Abwandern der Lymphozyten aus SLO assoziiert ist, gilt dieser Chemokinrezeptor-Wandel als eine Art *Exit*-Signal angesehen.

Die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5 bestimmen den qualitativen und quantitativen Aufbau von SLO. Ihre Deletion führt zu vielfältigen Störungen des Immunsystems:

- a) *CXCR5*^{-/-} Mäuse zeigen architekturell gestörte und rarefizierte *Peyer* Plaques (PP), Milzfollikel und Keimzentren und fehlende zervikale und inguinale Lymphknoten [16].
- b) *CXCR5*^{-/-} Lymphozyten ist der Eintritt in SLO nach Transfer in Wildtypmäuse verwehrt [16].
- c) *CCR7*^{-/-} Mäuse weisen eine defekte Navigation von naiven T-Zellen, T-Helferzellen und B-Zellen in PP, Lymphknoten und Milz auf [17].
- d) Durch Hochregulation von CCR7 treten B-Zellen in die T-Zellzone von SLO ein [17].
- e) in *CCR7*^{-/-} und *plt/plt* Mäusen, in denen die Bildung der Chemokine CCL19 und CCL21 ausbleibt, ist die Migration von aktivierten *Langerhans* Zellen der Haut ins Lymphgefäßsystem gestört [17, 18].

1.2. LYMPHATISCHE GEWEBE UND DIE MIGRATION VON LYMPHOZYTEN

Lymphatische Organe können primärer, sekundärer und tertiärer Herkunft sein. Während in den primären lymphatischen Organen, dem Knochenmark und Thymus, die B- und T-Vorläuferzellen zu antigenunerfahrenen Lymphozyten heranreifen, erfolgt in den sekundär lymphatischen Organen (SLO) die Antigenaktivierung. Aktivierte T-Lymphozyten patrouillieren dann durch das Gefäßsystem, antigenerfahrene B-Lymphozyten differenzieren zu Plasmazellen und sezernieren spezifische Immunglobuline. Die Gesamtheit der SLO umfasst die Lymphknoten, die Milz, die lymphatischen Zellen und Gewebe in Haut und Schleimhäuten (MALT, GALT, PP, BALT), die Tonsillen und Adenoide.

Das Wissen über SLO wurde aus Mutationsanalysen gewonnen. Die zelluläre Organisation von SLO wird maßgeblich durch die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 bestimmt. Die Ausbildung der Anlagen von lymphatischen Organen und Geweben dahingegen bleibt weitestgehend unbeeinflusst. *Sun et al.* und *Kurebaya et al.* beschrieben jeweils im Jahre 2000 den Retinoid verwandten Orphan Rezeptor gamma (*RORγ*) auf spezialisierten hämatopoetischen Zellen. In *RORγ*^{-/-} Mäusen werden Lymphknoten und PP nicht ausgebildet [19, 20]. *RORγ* positive Zellen, die sich durch CD3 Negativität, CD4 und CD45 Positivität auszeichnen, werden *Lymphoid tissue inducer (LTi)* Zellen genannt [21]. Überdies exprimieren sie die Chemokinrezeptoren CXCR5, CCR7 und den Interleukin 7α-Rezeptor, die sie zur

Interaktion mit Stromazellen befähigen [22]. Sehr wahrscheinlich stimulieren sie durch die Produktion des kombinierten Lymphotoxins $LT\alpha 1\beta 2$ die Expression von Chemokinen wie CXCL13, die zur Rekrutierung von B- und T-Lymphozyten führt [23]. Dies konnte durch transgene CXCL13 Expression in den *Langerhans* Inseln des Pankreas und dem GI-Trakt Epithel gezeigt werden, in deren lymphozytären Infiltraten *LTi* Zellen nachgewiesen wurden [24, 25]. Dabei wurde durch die Produktion des Lymphotoxins- $\alpha 1\beta 2$ die zelluläre Kompartimentierung in Funktionsbereiche ähnlich den spezialisierten Follikeln in SLO angestoßen [23, 24, 26]. Derartig neu entstandene immunfunktionale Gewebe werden tertiäre lymphatische Gewebe (TLT) genannt. Der Nachweis von ektopter Chemokinexpression und TLT ist ein Charakteristikum von vielen infektiösen und autoimmunen Erkrankungen wie der chronischen Hepatitis C Infektion der Leber [27], der *Helicobacter pylori* assoziierten Gastritis [28-30], der Rheumatoiden Arthritis [31], Myasthenia gravis [32], dem *Sjögren* Syndrom [33] und der Systemischen Sklerose [34].

Die transendotheliale Migration (= Extravasation) von Immunzellen kann durch Chemokine oder entzündlich durch Zytokine vermittelt werden. Sie erfolgt im postkapillären Stromgebiet und ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

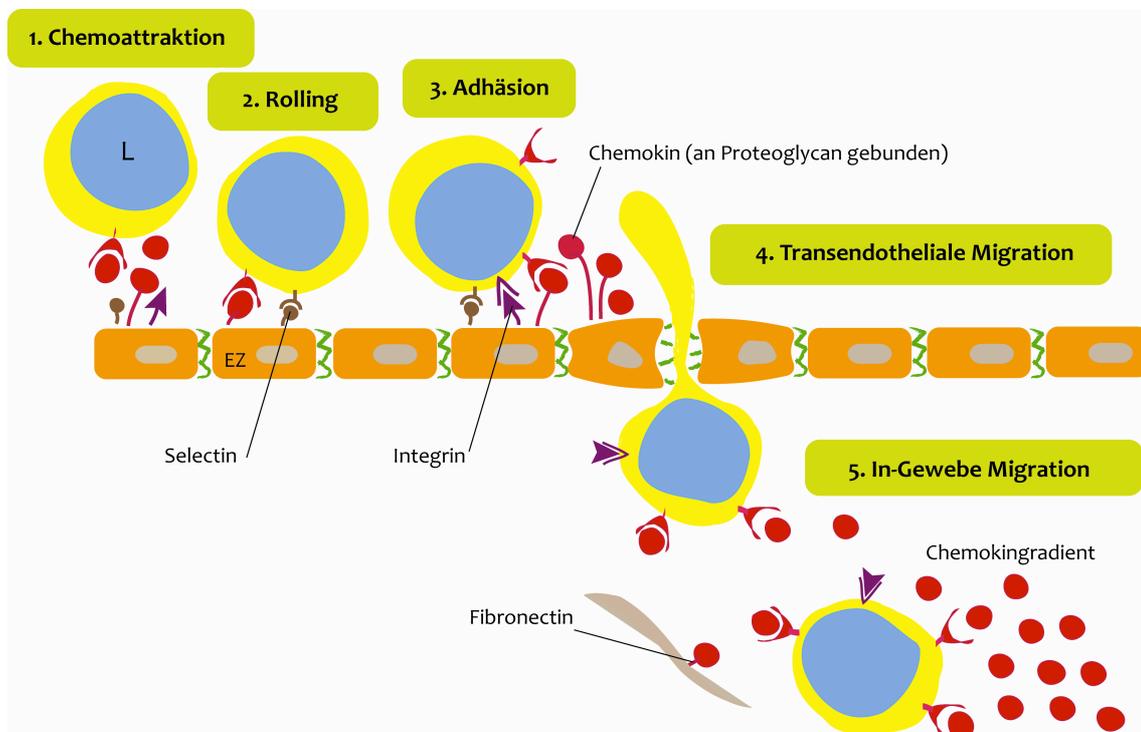


Abbildung 1. Diapedesis.

Leukozyten-Arrest durch Integrinbindung nach Aktivierung durch Chemokine. EZ = Endothelzelle. L = Leukozyt.

1.3. MIGRATION VON ZELLEN SOLIDER UND HÄMATOLOGISCHER NEOPLASIEN

Müller und Kollegen zeigten erstmals, dass Mammakarzinomzellen durch die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 gewebespezifisch metastasieren [2]. In einem T-ALL Mausmodell blieb nach CCR7 Deletion ein leptomeningealer Befall aus [1]. Chemokine und Chemokinrezeptoren wurden in verschiedenen soliden und hämatologischen Neoplasien nachgewiesen [35-42]. Dabei zeigte sich vor allem in primären ZNS Lymphomen (PCNSL) die Expression von homöostatischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren [40, 43-45]. PCNSL zeichnen sich durch den isolierten ZNS Befall aus. Das ZNS galt als immunprivilegiertes Organ, das durch die Blut-Hirn und die Blut-Liquor-Schranke gegenüber Immunzellmigration geschützt ist. Zwischenzeitlich konnte die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren auf den Endothelzellen, der Mikroglia und den perivaskulären Makrophagen des ZNS identifiziert werden. Die perivaskulären Makrophagen leiten sich von Monozyten beziehungsweise hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und unterliegen der Ab- und Einwanderung wie Makrophagen anderen Orten im Organismus auch [46]. Zudem wurden CD11c⁺ DC-ähnliche Zellen in der Blut-Hirn-Schranke in der Maus nachgewiesen, die möglicherweise Antigene präsentieren könnten [47]. In Kenntnis dieser Befunde wird der Begriff der Immunprivilegierung aktuell relativiert [48]. Welche Bedeutung diese Ergebnisse auf die Pathogenese von Erkrankungen wie dem PCNSL haben können, bleibt zunächst unklar. Seit 1988 hat sich das Wissen darüber nicht wesentlich erweitert [49]. Zum Einen wird der isolierte ZNS Befall durch einen NHL (Sub)klon und systemische Eradikation erklärt. Dafür würde der Nachweis von identischen mutierten Schwerketten-Rearrangements aus Blut und Knochenmark von PCNSL Patienten sprechen [50]. Es handelt sich dabei um Studien mit kleinen Fallzahlen, in denen der Nachweis nur unregelmäßig gelang. Dem gegenüber steht die Hypothese, dass ZNS originäre Entzündungen Lymphozyten rekrutieren, die entarten, das in den klinischen Eigenschaften des PCNSL widerspiegelt wird. Geeignete *in vivo* Modelle, um Lymphomzelldissemination ins ZNS zu studieren, fehlen aktuell. *Ex vivo* Analysen humaner Krebszellen zeigen eine migratorische Responsivität gegenüber homöostatischen Chemokinen, bleiben jedoch den Nachweis einer Funktionalität im lebenden Organismus schuldig. Es existieren wenige *in vivo* Analysen von soliden und hämatologischen Neoplasien, die auf *Xenograft*-Modellen basieren, bei denen das Verhalten humaner Krebszellen in immundefizienten Wirten untersucht wird, und die daher bedingt aussagekräftig sind [51-55].

1.4. FRAGESTELLUNG

Der Befall von nicht lymphatischen Organen und Geweben als primäres oder sekundäres Ereignis im Verlauf der NHL Erkrankung ist prognosebestimmend, da sie unklaren Rekrutierungsmechanismen unterliegen und daher nicht gezielt angegriffen werden können. Im Angesicht von ätiologisch unklaren, steigenden Inzidenzraten der PCNSL Erkrankung in immunkompetenten und immunkompromittierten Individuen nach Einführung von HAART fehlen *targeted therapy* Strategien hier noch gänzlich [56, 57]. Der Einsatz des CD20-Antikörpers *Rituximab* in PCNSL Patienten ist gleichwohl wie der Nutzen der Hochdosis-Chemotherapie und autologen Stammzelltransplantation noch nicht genau ermessen [58]. Wie in 1.3 ausführlich erwähnt muss die Immunprivilegierung des ZNS relativiert werden, so dass ein ZNS *Homing* von Lymphomzellen pathogenetisch diskutiert werden darf. Wie aus wissenschaftlichen Arbeiten des vergangenen Jahrzehnts hervorgeht, kann sich die Migration von Zellen anderer Neoplasien im Tiermodell auf das Zusammenwirken von Chemokinen und Chemokinrezeptoren stützen. Der überwiegende Teil dieser Studien basiert auf *Xenograft*-Modellen. Da das Immunsystem aber gemeinhin mit dem Nachweis von tumor-assoziierten T-Zellen und Makrophagen eine noch zu klärende Bedeutung in der Propagation von Neoplasien trägt, ist ihre Untersuchung im immundefizienten Organismus, wie es in *Xenograft*-Modellen unvermeidbar ist, *a priori* problematisch. Gerade die für die Karzinogenese pathogenetisch vielfach herangezogenen chronischen Entzündungen und Neubildungen lymphatischer Gewebe, wie sie in vielen infektiösen und autoimmunen Erkrankungen vorkommen, sind hinsichtlich ihres Potentials für die Metastasierung von Krebszellen nicht genügend berücksichtigt. So bleibt der Einfluss von Lymphozyten und den aus ihnen sich neu bildenden immunfunktionalen Geweben, im weiteren Sinne von TLT, die eng mit der ektopen Chemokinproduktion assoziiert sind, bislang nicht evaluiert. Dabei könnten durch die Aufdeckung von entscheidenden Chemokin und Chemokinrezeptor Interaktionen spezialisierte Therapien entwickelt werden, durch die der klinische Verlauf von Krebserkrankungen wie dem PCNSL vielleicht entscheidend beeinflusst würde. Daher sollte dieses Potential im genetischen Modell untersucht werden. In der vorliegenden Studie konnte durch Kombination von *in vivo* Modellen (*Rip-CXCL13* und *Eμ-Myc*) das Streuverhalten von Lymphomzellen unter dem Einfluss von ektoper Chemokinexpression und Lymphozytenattraktion analysiert werden.

2. METHODIK

2.1. MÄUSE

Der Genotyp und die Herkunft der Mäuse können der Tabelle 1 entnommen werden. Die Tierhaltung erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Campus Benjamin Franklin und Mitte. Die Fachkenntnis für tierexperimentelles Arbeiten wurde gemäß den FELASA-Kriterien erworben und vom LAGESO anerkannt.

Die Gesamtheit der Mäuse entstammt Inzuchtlinien auf einem *C57BL/6* Hintergrund.

Tabelle 1. Mäuse		
Mauslinie	Kurzname	Genetische Alteration
<i>C57BL/6</i>	<i>B6</i>	keine spezifische Alteration
<i>Tg(IghMyc)22Bri</i>	<i>Eμ-Myc</i>	c-myc Expression unter Kontrolle des Schwereketten-Enhancers <i>Eμ</i> in B-Lymphozyten
<i>Tg(Ins2-CXCL13)1Cys</i>	<i>Rip-CXCL13</i>	ektopy Expression von CXCL13 unter Kontrolle des <i>rat insulin</i> Promoters (<i>Rip</i>) im Pankreas
<i>Gfap-CXCL13</i> (nicht veröffentlicht)	<i>Gfap-CXCL13</i>	ektopy CXCL13 Expression unter Kontrolle des <i>glial fibrillary acid protein</i> Promoters (<i>Gfap</i>) im ZNS
<i>CXCR5^{tm1Lipp}/CXCR5^{tm1Lipp}</i>	<i>CXCR5^{-/-}</i>	Deletion von CXCR5
<i>Rag1^{tm1Mom}</i>	<i>Rag1^{-/-}</i>	Deletion des <i>Recombination activating</i> -Gens 1 mit Ablation von reifen B- und T-Zellen

*Arbeitsgemeinschaft Michael Baier, Robert-Koch Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin

2.1.1. Genotypisierung

Bei Eintritt der Geschlechtsreife wurden die Tiere genotypisiert. Die Genotypisierung dient der gezielten Analyse des Genoms auf eine oder mehrere bekannte genetische Informationen. Dazu werden die DNA-Helices durch Lyse mit Proteinase K aus den Zellkernen gelöst (55°C für mindestens vier Stunden). Durch Erhitzen auf 94°C werden die DNA-Doppelhelices in ihre Einzelstränge aufgetrennt, so dass sequenzspezifische Oligonukleotide angelagert werden können (= Annealing). Durch die *Taq*-DNA-Polymerase werden Nukleotide hinzugefügt. Die eingesetzten Primersequenzen, der PCR-Ansatz und Temperaturzyklus können den Tabellen 2 bis 4 entnommen werden. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1.5%-Agarosegel aufgebracht, elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid (1:1000) gefärbt. Das Ergebnis wurde mit der SynGene[®] Kamera und Software (VWR, West Chester, USA) visualisiert und fotodokumentiert.

Tabelle 2. Nukleotidsequenzen* (Genotypisierung)

Genotyp	Name	Typ	Sequenz (5'-3')
<i>Eμ-Myc</i>	PUC 1	vorwärts	CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
	PUC 2	rückwärts	CTGTGACTGGTGAGTACTCAACC
<i>Rip-CXCL13</i>	oIMR5998	vorwärts	CAACCCTGACTATCTTCC
	oIMR5999	rückwärts	GAGATGATAGTGGCTTCAGGCAG
<i>Gfap-CXCL13</i>	tb5	vorwärts	CATCGCCAGTCTAGCCCACT
	tb7	rückwärts	CCTCTACAAATGTGGTATGGCTG
<i>CXCR5^{-/-}</i>	oIMR7120	vorwärts	CGGAGATTCCCCTACAGGAC
	oIMR7121	WT rückwärts	GATCTTGTGCAGAGCGATCA
	oIMR8963	mut rückwärts	AATTCGCCAATGACAAGACG

*Herstellung Metabion, Martinsried, Deutschland

Tabelle 3. PCR-Ansatz (Genotypisierung)

Komponenten	Volumen für 1x Ansatz
DNA (1:10)	2 µl
Forward- und Reverse-Primer (10 µM)	je x 0.75 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase PCR Master Mix (2x)*	1x (10 µl)
H ₂ O	6.5 µl
Total	20 µl

*Promega, USA. Gebrauchsfertige Lösung aus Nukleotiden, *Taq*-DNA-Polymerase, Puffer und Elektrolyten.

Tabelle 4. PCR-Programm* (Genotypisierung)

Temperatur	Zeit	Zykluszahl	Prinzip
94°C	2 min	1x	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase wird aktiviert
94°C	30 sec	35x	Dehybridisierung der DNA Doppelhelix
60 [§] , 57 [†] , 55°C [‡]	30 sec		Primer-Annealing
72°C	1 min		Elongation
72°C	5 min	1x	Extension
8°C			Reaktionsende, Lagerung bis zur Analyse

* Thermocycler von Biometra

§ *Eμ-Myc*, *CXCR5*WT/mut † *Rip-CXCL13* ‡ *Gfap-CXCL13*

2.2. ADOPTIVER TRANSFER

Die Lymphome wurden in einer Sterilbank (Heraeus, Thermo Fisher) homogenisiert und in DMEM-Lösung zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet (0.7 Mikrometer-Sieb, Nalgene, Neerijse, Belgien). Die Lymphomzellen wurden nach Trypan Blue Färbung (0.5%) in der Neubauer Kammer gezählt und für die intravenöse Applikation in Chargen zu 10^6 Zellen in einem Volumen von maximal 5 ml/ kg KG aufbereitet. Für den intravenösen Transfer via *V. sublingualis* wurde mit Ketamin (100mg/ kg KG i.p.) und Xylazin (10mg/ kg KG i.p.) analgosediert und eine, drei, 24 und nachfolgend alle 48 Stunden *post injectionem* untersucht.

2.3. ERKRANKUNG UND ÜBERLEBEN

Die verschiedenen *Eμ-Myc* transgenen Mäuse wurden bis mindestens 230 Tage nach Geburt beobachtet. Die Lymphomkrankung wurde durch die tastbare Vergrößerung von peripheren Lymphknoten oder Verhaltensauffälligkeiten angezeigt. Erkrankte Tiere wurden nach Maßgabe durch das Tierschutzgesetz euthanisiert. Mäuse, die vor Eintritt der Geschlechtsreife verstarben, wurden ausgeschlossen. Das prozentuale Überleben wurde als *Kaplan-Meier* Kurve visualisiert und mittels *Mantel-Cox* Test hinsichtlich statistischer Signifikanz untersucht.

2.4. HISTOLOGIE

Die Lymphom-, Pankreas-, Milz- und Gehirnprouben wurden in gepuffertem 4% Formalin über Nacht fixiert, nachfolgend automatisiert entwässert und paraffiniert. Mit dem Rotationsmikrotom (Microm, Thermo Scientific, Waltham, USA) wurden die Gewebe zu 3 μ m dünnen Schnitten verarbeitet, auf Objektträger aufgezogen, bei 37°C über Nacht getrocknet und vor der Färbung bei 55°C für zehn Minuten erhitzt, um eine ausreichende Haftung des Gewebeschnittes auf dem Objektträger zu gewährleisten.

Um die Gewebefärbung zu ermöglichen, die zumeist auf polaren Wechselwirkungen beruht, wurden die Gewebeschnitte deparaffiniert und rehydriert (Tab. 5).

2.4.1. Hämalan und Eosin Übersichtsfärbung

Hämatoxylin färbt nach Oxidation zu Hämatein (chemisch oder durch Luftsauerstoff) und Chelatierung von Aluminiumsalzen (Hämalaun) die Nukleinsäuren in Zellkern und Zellplasma durch koordinative Bindung seines Zentralions. Durch Eintauchen in einprozentige alkoholische Salzsäurelösung wird der pH Wert erniedrigt, wodurch ein Teil der Bindungen wieder gelöst

wird (= Differenzieren). Zusätzlich konkurrieren die Salzsäuremoleküle mit den Nukleinsäuren um die Bindungsstellen des Zentralions. Die Salzsäurelösung wurde mit 70%-Ethanol hergestellt. In alkoholischen Lösungen laufen Bindungsreaktionen langsamer ab, da sie weniger polar sind als wässrige Lösungen. Durch eine pH-Werterhöhung durch Baden in Leitungswasser wird die Lösung der koordinativen Bindung erschwert (= Bläuen).

Eosin ist ein Derivat des Farbstoffes Fluorescein und wechselwirkt durch sein delokalisiertes π -Elektronensystem mit positiv geladenen Proteinbausteinen von Zellen und Interstitium. Die Färbung ist folglich weniger selektiv als die Hämalaunfärbung, die Färbezeit daher sehr kurz (Tab. 5). Alle Zeiten wurden empirisch in Abhängigkeit vom besten Färbeergebnis für Paraffin-Gewebeschnitte ermittelt.

Tabelle 5. Hämalaun und Eosin Färbung

Schrittfolge	Zeit
Xylol	2 x 5 min
Absteigende Ethanolreihe (100, 90, 80, 70 %) bis Aqua dest.	tauchen
Kernfärbung mit Hämalaun nach <i>Mayer</i> *	5 min
Differenzieren in 1% Salzsäurelösung (in 70% Ethanol)	5 min
Fixieren in Leitungswasser (Bläuen)	5 min
Eosin	25 sec
Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe (70, 80, 90, 100%)	tauchen
Xylol	2 x 2 min

* Merck, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer 9249.

2.4.2. Stereologie

Zur Quantifizierung der organspezifischen Lymphomzelldissemination wurden ganze Pankreata zu jeweils zehn Ebenen in 160 μm Intervallen verarbeitet, die konventionell gefärbt, mikroskopiert (DP21[®] Kamera-Lichtmikroskop, Olympus, Shinjuku, Japan) und mit der *cell-D*[®] Software fotodokumentiert wurden. Die Inselinfiltration durch Lymphozyten und Lymphomzellen wurde in Relation zur Gesamtinselzahl pro Pankreas bestimmt und für alle Versuchsgruppen in Diagrammen dargestellt und mittels t-Test auf statistische Signifikanz mit Hilfe der GraphPad Prism[®] Software untersucht.

2.5. IMMUNHISTOCHEMIE

Konsekutive Pankreasschnitte wurden im Ventana BenchMark GX-Automaten (Roche, Penzberg, Deutschland) durch den Einsatz von enzymmarkierten Antikörpern (Peroxidase oder alkalische Phosphatase) gefärbt. Nach Antigenerkennung durch den primären Antikörper wird ein sekundärer enzymmarkierter Antikörper dazugegeben, der sich gegen das speziesspezifische Fc-Fragment des primären Antikörpers richtet (Tab. 6 und 7).

Durch die gekoppelten Enzyme Peroxidase (HRP) und alkalische Phosphatase (AP) werden Wasserstoffperoxid und Naphtholester umgesetzt. Für die HRP gekoppelten sekundären Antikörper wurde das Chromogen DAB (Diaminobenzidin) gemeinsam mit Substrat eingesetzt (Liquid DAB + Substrate, K3467, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark). DAB präzipitiert zu einem braunen Farbprodukt. Für die AP gekoppelten sekundären Antikörper wurde das Chromogen Fast Red (Naphthol-AS-MX-Phosphat) eingesetzt, welches sich nach hydrolytischer Spaltung des Naphtholesters mit diesem zu einem rotbraunen Farbprodukt verbindet (Ventana, Roche, Penzberg, Deutschland). Beim anti-B220/CD45R Antikörper handelt es sich um einen biotinylierten Antikörper, nach dessen Antigenbindung das Signal durch Bindung von Streptavidin-Molekülen verstärkt wird. Die Signalverstärkung kommt durch die mehrfache Biotinylierung des Primärantikörpers und Bindung mehrerer Sekundärantikörper mit höherem Substratumsatz und größerer Farbproduktbildung zustande.

Tabelle 6. Primäre Antikörper (IHC)

Bezeichnung (Wirt)	Verdünnung	Klon	Hersteller
anti-B220/CD45R Antikörper (Ratte)	1:200	RA3-6B2	Becton Dickinson
anti-CXCL13 Antikörper (Ratte)	1:5000	143608	RnD Systems
anti-GFAP Antikörper (Kaninchen)	1:2000	polyklonal	DakoCytomation
anti-Insulin Antikörper (Maus)	1:5000	D6C4	Abcam
Ki67 Antikörper (Kaninchen)	1:200	SP6	Thermo Scientific

Tabelle 7. Sekundäre Antikörper (IHC)

Bezeichnung (Wirt)	Verdünnung	Klonalität	Hersteller
anti-Kaninchen Antikörper (Esel)	1:100	polyklonal	Amersham Biosciences
anti-Ratte Antikörper (Ziege)	1:200	polyklonal	Jackson IR Lab.
anti-Maus Antikörper (Schaf)	1:100	polyklonal	Amersham Biosciences

2.6. IMMUNZYTOMETRIE

Suspendierte Zellen können ergänzend zu den in der Lichtmikroskopie gewonnenen morphologischen Informationen mittels der Durchflusszytometrie (FCM) durch Messung von Größe und Granularität näher charakterisiert werden. Diese Methode ist etabliert für periphere Blutzellen und Knochenmarkzellen. Dafür werden einzelne Zellen angesogen und an einem Strahl monochromatischen Lichts vorbeigeführt. Die vorwärtsgerichtete Ablenkung des Strahls, Streulicht (engl. *scattering*), die durch einen Fotodetektor aufgezeichnet wird, verändert sich mit der Größe der untersuchten Zellen. Ihre Darstellung wird Forward-Scatter (FSC) bezeichnet. Durch einen weiteren Fotodetektor wird das seitliche Streulicht, Sideward-Scatter (SSC), detektiert, das sich mit der Zellgranularität verändert. So können bereits Blasten nachgewiesen werden. Zur differenzierten Analyse von aberrantem Streulicht wird die Fluoreszenz-gestützte FCM eingesetzt, bei der durch fluorochrommarkierte Antikörper einzelne Epitope nachgewiesen werden. Ursprünglich wurden die Antikörper, die sich gegen ein bestimmtes Zellantigen richten, in einer eigenen Nomenklatur, dem *cluster of differentiation* (CD), zusammengefasst. Mittlerweile gilt die Bezeichnung synonym für die Zellantigene. Anhand der Expression der CD-Antigene können aberrante Zellpopulationen hinsichtlich ihrer myeloischen oder lymphatischen Herkunft und ihres Differenzierungsgrades charakterisiert werden. Das Fluorochrommolekül besitzt ein delokalisiertes π -Elektronensystem, welches durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt wird (Absorption). Durch Re-Emission wird die absorbierte Energie in Form von Licht, das detektiert werden kann, wieder frei. Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit wird jedes Fluorchrom durch Licht einer bestimmten Wellenlänge optimal angeregt, so dass die Wellenlänge des emittierten Lichts bekannt ist. Nach Festlegen eines Schwellenwertes anhand von Isotypkontrollen wird die Antigenexpression ermittelt.

2.6.1. Vorbereitung einer Einzelzellsuspension

Die frisch entnommenen Milz- und Lymphomproben wurden in der Sterilbank (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit einem Spritzenstempel durch ein steriles Edelstahlsieb gedrückt und in etwa 20 ml FCM-Pufferlösung (1x PBS, 1% fetales Kalbsserum, 5 mM EDTA) aufgenommen. Danach wurde das Lysat wiederholt durch ein Mikro-Zellsieb mit einer Porengröße von 70 μm (Nalgene Filtration Products, Neerijse, Belgien) gegeben. Bei Splenozyten wurde eine Erythrozytenlyse mit der *Thomson*'schen Lösung (1000 μl / Zellpellet) durchgeführt. Anschließend wurde die Einzelzellsuspension bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Zelniederschlag in Form eines Pellets mit 1 ml FCM-Puffer resuspendiert.

2.6.2. Zellfärbung und Detektion durch Immunzytometrie

Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde zunächst eine Inkubation der Zellproben mit dem anti-Fc γ -Rezeptor Antikörper (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) für 10 min auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die Lymphomzellen und Splenozyten nach einem Waschschrift mit FCM Puffer, der Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min und Resuspension in 50 μ l FCM Puffer mit den anti-B220 und anti-CXCR5 Antikörpern lichtgeschützt bei 37°C für 20 min gefärbt. Die Doppelfärbung der Lymphomzellen mit anti-B220 und anti-CD19, anti-CD43 und anti-IgM Antikörpern erfolgte lichtgeschützt auf Eis für 20 min. Die Reaktion wurde durch einen Waschschrift mit FCM Puffer, Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min und Resuspension in 1 ml FCM Puffer beendet. Die Zellen wurden im Zytometer FACS Canto[®] (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) gemessen. Propidiumjodid (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) wurde zum Ausschluss von toten Zellen verwendet.

Nach Messung erfolgte die Dokumentation und Auswertung mit der FlowJo[®] Software.

Tabelle 8. Antikörper (FCM)

Bezeichnung	Verdünnung	Klon	Hersteller
Anti-B220/CD45R:APC	1:400	RA3-6B2	BioLegend
Anti-B220/CD45R:V450	1:400	RA3-6B2	Becton Dickinson
Anti-CD19:PECy7	1:800	1D3	Becton Dickinson
Anti-CD43:APC	1:800	S7	Becton Dickinson
Anti-CXCR5:PE	1:20	2G8	BD Biosciences
Anti-IgM:PerCPCy5.5	1:200	R6-60.2	Becton Dickinson
IgG2 α , κ :PE	1:20	R35-95	Becton Dickinson
IgG2 α , κ :PerCPCy5.5	1:200	R35-95	Becton Dickinson

2.7. QUANTITATIVE POLYMERASE-KETTENREAKTION

Für die RNA-Isolation wurden die Gewebe (Pankreas, Lymphome, Milz und Gehirn) in RNA stabilisierendem Reagenz (RNAlater[®], Sigma Aldrich, St. Louis, USA) bei minus 20°C gelagert. Die RNA wurde mittels Trifast[®] Reagenz (Peqlab, Erlangen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach Zugabe von Chloroform wurde RNA separiert und durch weitere Zugabe von Alkoholen gefällt und gewaschen. Für weitergehende Analysen wurde das RNA-Isolat in nukleasefreiem Wasser resuspendiert und bei minus 80°C gelagert.

2.7.1. Quantifizierung und Integrität der RNA

Die RNA Menge wurde spektralphotometrisch (infinite 200, Tecan[®], Grodig, Österreich) bestimmt und mit der i-control[®] Software ausgewertet. Durch Bestimmung der Extinktion, d.h. der Löschung monochromatischen Lichts bei 260 nm (Absorption) kann die Reinheit der extrahierten RNA bestimmt werden, da Kontaminanten, z.B. Proteine, in anderen Wellenlängenbereichen absorbieren. Aus den Einzelextinktionen wird die rRNA Ratio gebildet, die für reine RNA zwischen 1.9 und 2.1 liegt. Die RNA-Qualität wurde überdies mithilfe des Agilent[®] 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) überprüft.

2.7.2. Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde zunächst durch Einsatz von Reverser Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Genomische DNA wurde durch DNase ebenfalls nach Angaben des Herstellers entfernt. Die cDNA Herstellung erfolgte aus 1 µg isolierter RNA mit dem QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen, Venlo, Niederlanden) nach Angaben des Herstellers.

2.7.3. Realtime-Polymerase Kettenreaktion

Für die quantitative Polymerase Kettenreaktion wurde SYBR Green[®] (QuantiTect[®] SYBR Green PCR Kits, Qiagen, Venlo, Niederlanden) eingesetzt. Die cDNA wurde 50-fach verdünnt und mit spezifischen Oligonukleotiden (Tab. 9) und SYBR Green[®] nach Angaben des Herstellers gemischt. SYBR Green[®] interkaliert die DNA-Helix und zeigt durch Fluoreszenzänderung die amplifizierten Produkte proportional an. Durch Erfassen der Fluoreszenzänderung wurde die relative mRNA Über- oder Unterexpression im Vergleich zum Kontrollgen ermittelt. Als intrinsische Kontrolle diente die GAPDH mRNA. Für das Annealing wurde eine Temperatur von 60°C gewählt, der Temperaturzyklus wurde 45-mal wiederholt.

Tabelle 9. Nukleotidsequenzen (qPCR)

Bezeichnung	Typ	Sequenz (5'-3')
CXCL13	vorwärts	CCCCAAAAGTGAAGTTGTGATCT
	rückwärts	CAGGCAGCTCTTCTCTTACTCACT
CXCR5	vorwärts	TGGCCTACAGCCTCATCTTC
	rückwärts	CACGTAACACCATCCCATCA
GAPDH	vorwärts	GAAATTGTGAGGGAGATGCT
	rückwärts	CCACCCAGCAAGGAGACT

2.7.4. Produktreinheit und Gelelektrophorese

Durch Erfassen der Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Temperatur kann auf die Produktspezifität geschlossen werden (Schmelzpunktanalyse). Ein hoher Reinheitsgrad bedeutet hohe sterische Ordnung und hohe Lösungsenergie (= Schmelztemperatur, T_m). Je höher die Spezifität der PCR, umso höher T_m und umso reiner das PCR Produkt.

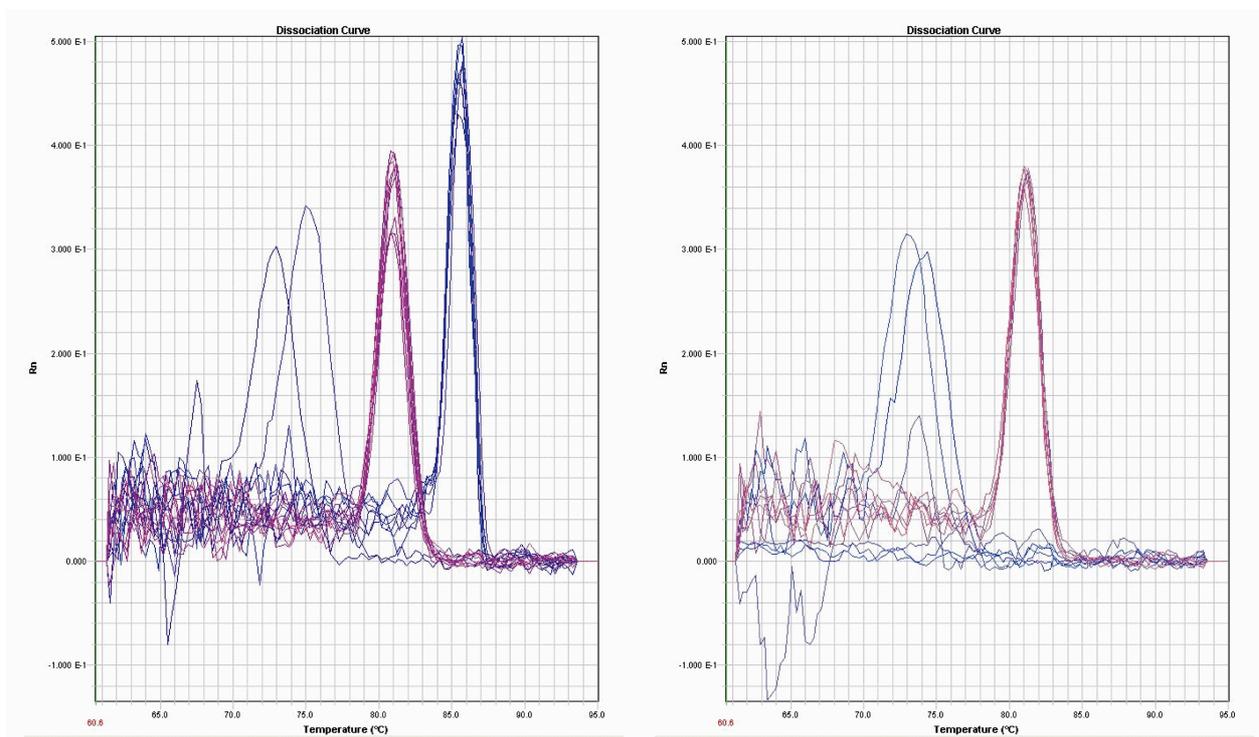


Abbildung 2. Schmelzpunktanalyse.

CXCR5 Amplifikationsergebnis (blau) in Wildtyp-Splenozyten (linkes Diagramm) und in $CXCR5^{-/-}$ Splenozyten (rechtes Diagramm). Rote Kurven entsprechen der Schmelzpunktanalyse nach GAPDH-Amplifikation.

2.7.5. Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der geräteeigenen Software (Rq-Manager®). Sie ermittelt die Zykluszahl (Ct), bei der das SYBR Green® Fluoreszenzsignal die Basislinie überschreitet. In einer Rechentabelle wurde die Differenz aus den durchschnittlichen Ct-Werten des Zielgens und des Kontrollgens pro Probe ermittelt.

$$\Delta C_t = \text{Avg } C_t (\text{Zielgen}) - \text{Avg } C_t (\text{Referenzgen})$$

Aus den durchschnittlichen ΔC_t -Werten der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe wurde die Differenz gebildet. Dabei werden die Zyklenunterschiede zwischen Ziel- und Referenzgen der Versuchs- und Kontrollgruppe verglichen.

$$\Delta \Delta C_t = \text{Avg } \Delta C_t (\text{Versuchsgruppe}) - \text{Avg } \Delta C_t (\text{Kontrollgruppe})$$

Die Berechnung der relativen Über- oder Unterexpression, relative Quantität (RQ), erfolgte anhand folgender Formel:

$$2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Durch sie wird eine effektive Primerbindung und exponentielle Verdopplung der PCR-Produkte pro Zyklus vorausgesetzt. Je kleiner der $\Delta \Delta C_t$ -Wert, umso höher ist die relative mRNA Überexpression in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

2.8. WESTERN BLOTTING

Nach der Transkription verlässt die mRNA den Zellkern, um im Zytosol in Protein übersetzt zu werden (Translation). Frisch geerntetes oder bei minus 80°C gelagertes Gewebe wurde in einem Verhältnis von Probengewicht (mg) zu Puffervolumen (ml) von 1:10 in Extraktionslösung mit Proteinasehemmern (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.5% NaDOC, pH 7.5) genommen und homogenisiert. Durch Zentrifugation bei 15000 x g für 30 Minuten wurde das Proteinlysate als Überstand gewonnen.

2.8.1. Bestimmung der Proteinmenge (BCA-Methode)

Die *Bicinchonic-Acid* (BCA)-Methode zur Bestimmung der Proteinmenge beruht auf der Reduktion von Kupferionen (Cu^{2+} zu Cu^+) in Gegenwart von Aminosäuren und Peptiden [59]. Dabei wird das Kupferion von je zwei BCA-Molekülen chelatiert, wodurch der Farbumschlag von grün zu violett eintritt. Diese Reaktion ist nahezu linear abhängig von der gegebenen Proteinkonzentration in einem Bereich von 20 bis 2000 $\mu\text{g/ml}$, der neu entstandene Chelatkomplex hat das Absorptionsoptimum bei 562 nm. Da es sich um eine indirekte

Nachweismethode handelt, wurde die Messung auf eine Standardkonzentrationsreihe von Rinderserumalbumin (BSA, engl. *bovine serum albumin*) bezogen. Die Proben wurden 1:10 verdünnt eingesetzt. Das Probenvolumen betrug 25 µl. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Detektionskit, welches die Reagenzien und BSA beinhaltet, eingesetzt (Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Reagenzien A (BCA) und B (Kupfer-II-sulfat) wurden unmittelbar vor der Messung nach Herstellerangaben im Verhältnis 50:1 gemischt. Pro Probe wurden 200 µl eingesetzt. Das Ergebnis wurde aus drei Einzelmessungen einer Probe gemittelt (infinite 200[®], Tecan, Grodig, Österreich) und mit Hilfe der geräteeigenen Magellan[®] Software ausgewertet. In einer Rechentabelle wurden die finalen Proteinkonzentrationen ermittelt.

2.8.2. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem 12%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (30% Acrylamid/Bisacrylamid, 29:1, Bio-Rad, Hercules, California, USA). Dazu wurden die Proteinlysate mit 20% β-Mercaptoethanol in LDS Sample Buffer (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) bei 90°C denaturiert und anschließend in die Geltaschen gegeben. Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) stabilisiert das denaturierte Protein. Als SDS-Proteinkomplex wandern die Proteine bei 150 Volt (für 90 min) durch das Polyacrylamidgel von der Kathode (Minuspol) zur Anode (Pluspol). Das Gel befindet sich dabei in Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS).

2.8.3. Blotten auf Nitrocellulosemembranen

Nach Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf Nitrocellulosemembranen mit 0.4 µm Porengröße (GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) in einfachem Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin) bei 400 mA für 90 Minuten (*wet blotting*). Dafür wurden das Gel und die Nitrocellulosemembran in einer Blotkammer nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, Hercules, USA) angeordnet. Vor der Proteindetektion wurden polare Bindungsstellen durch Inkubation mit einer 5%-Magermilchpulverlösung abgesättigt.

2.8.4. Signaldetektion

Auf der Nitrocellulosemembran können Proteine durch Einsatz von spezifischen Antikörpern gezielt detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion mit Hilfe von Substratumsatz durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP), die an die sekundären Antikörper

gekoppelt ist. Durch Zugabe einer Reagenzlösung, die das Peroxid und ein Chemilumineszenz beinhaltet, wird das gefragte Antigen sichtbar gemacht (Ansatz nach Herstellerangaben, ECL Advance Western Blotting Detection Kit[®], GE Healthcare, Großbritannien). Die Nitrocellulosemembran wurde mit dem primären Antikörper in 5% Magermilchpulverlösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) bei 4°C über Nacht inkubiert, nachfolgend dreimal für 20 min in 1x PBS und 0.1% Tween gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit sekundärem Antikörper inkubiert. Die Antikörperverdünnungen wurden empirisch anhand des besten Ergebnisses ermittelt.

Tabelle 10. Primäre Antikörper (WB)

Bezeichnung (Wirt)	Verdünnung	Klon	Hersteller
anti-CXCL13 Antikörper (Ratte)	1:2000	143608	RnD Systems
anti-GFAP Antikörper (Kaninchen)	1:5000	polyklonal	DakoCytomation
anti-Insulin Antikörper (Maus)	1:500	H-86	Santa Cruz
anti-GAPDH Antikörper (Maus)	1:50.000	6C5	Meridian Life

Tabelle 11. HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper (WB)

Bezeichnung (Wirt)	Verdünnung	Klon	Hersteller
anti-Kaninchen Antikörper (Esel)	1:2000	polyklonal	Amersham Biosciences
anti-Ziege Antikörper (Kaninchen)	1:2000	polyklonal	DakoCytomation
anti-Maus Antikörper (Schaf)	1:100.000	polyklonal	Amersham Biosciences

Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS und 0.1% Tween wurde die ECL Lösung für 5 Minuten aufgetragen. Nach Abgießen überschüssiger ECL Lösung wurde das Färberegebnis mit der SynGene[®] Kamera und Software (VWR, West Chester USA) dokumentiert und ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

Um zelluläre und molekulare Mechanismen der Migration von Lymphomzellen studieren zu können, wurde die transgene *Eμ-Myc* Maus untersucht, in der die Ausbildung eines B-zellulären Lymphoms spontan erfolgt. Das meiste Wissen über molekulare Entstehung und Verhalten von Tumorzellen wurde aus *in vivo* Modellen gewonnen [60]. Brinster und Kollegen konnten erstmals im Jahre 1984 durch Onkogenexpression die Tumorentstehung in der Maus provozieren [61]. Technisch war zuvor nur die Implantation von humanen oder tierischen Tumorzellen in immundefiziente Wirte möglich (= *Xenograft*-Modell). Die Entwicklung des *gene targeting* machte ab 1992 vielfältige Untersuchungen durch Deletion von Tumor-assoziierten Genen möglich. In diese frühe Entstehungszeit gentechnischer Modelle fällt auch die Generierung der *Eμ-Myc* Maus [62]. Dabei wurde das Protoonkogen c-Myc unter die Kontrolle des Immunglobulin-Schwerketten Enhancers *Eμ* gesetzt. C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Aktivierung der Expression von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und durch Deaktivierung von CDK Inhibitoren, den Zellzykluseintritt und Übergang von der G1 in die S-Phase reguliert [63]. Durch konstitutive c-Myc Expression wird es zum Onkogen und führt zur unverhältnismäßigen Proliferation der B-Zelle. *Eμ-Myc* Lymphome entstehen daher spontan und können pro-B-, prä-B-, unreif- oder reifzellig B-zellulären Ursprungs sein [64]. Die Lymphome in der *Eμ-Myc* Maus entwickeln sich in einem durchschnittlichen Alter von 10 bis 14 Wochen nach Geburt. Initial zeigt sich die Erkrankung häufig nur lymphonodulär. Im weiteren Verlauf treten eine Splenomegalie, gelegentlich Thymome und spät häufig leukämische Verläufe mit disseminiertem Befall von soliden Organen wie Leber und Lungen auf. Dabei bleiben das ZNS und die Nieren ausgespart; das Pankreas ist nicht untersucht worden [62].

Für die Analyse der gezielten Lymphomzellmigration konzentrierten wir uns zunächst auf das frühe lymphonoduläre Erkrankungsstadium der *Eμ-Myc* Maus. Dabei zeigte sich in vergrößerten Lymphknoten eine aufgehobene Architektur bei Vermehrung von blastären Zellen mit vielen atypischen Mitosefiguren und in Nestern konzentrierten Apoptosen (Abb. 3 Mitte). Die Zellen wiesen eine hohe Kern-Plasma-Relation, schütteres Chromatin und mehrere Nukleoli auf. Anhand der Ki67 Färbung, einem Proliferationsmarker, wurden diese Zellen als Lymphomzellen identifiziert. Typischerweise wiesen die *Eμ-Myc* Lymphomzellen einen Proliferationsindex von über 90% auf (Abb. 3 rechts, [62]).

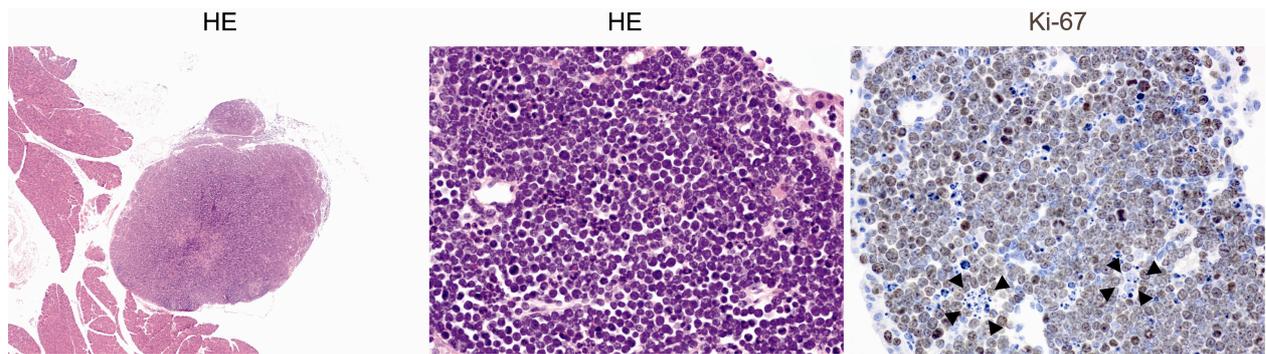


Abbildung 3. Immunhistologischer Phänotyp der *Eμ-Myc* Lymphomzellen.

In Paraffin eingebetteter, HE gefärbter peripankreatischer Lymphknoten (10x, links und 40x, Mitte). Die Ki67 Färbung zeigt die stark proliferierenden Lymphomzellen an (40x, rechts). Gruppierte Pfeile zeigen auf jeweils ein kleines Apoptosenest.

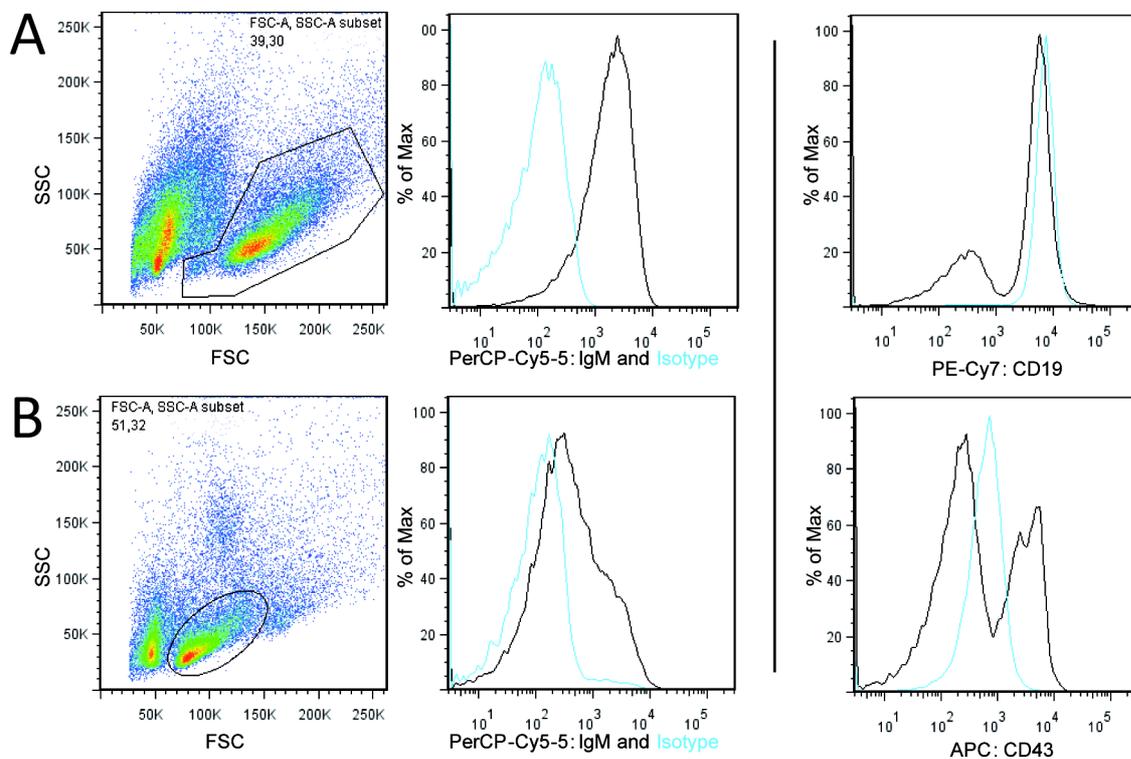


Abbildung 4. Immunphänotypisierung der *Eμ-Myc* Lymphomzellen.

Membrangebundenes IgM (schwarz) und Isotypkontrolle (blau) in (A) Lymphomzellen aus Lymphknoten von *Eμ-Myc* transgenen Mäusen (n=3) und in (B) Splenozyten einer Wildtyp-Maus. Abgetrennt: Oberflächenfärbung von CD19 und CD43 in den *Eμ-Myc* Lymphomzellen (blau) und Wildtyp-Splenozyten (schwarz).

Immunzytometrisch zeigte sich die B-lymphoblastische Lymphomzell-Differenzierung anhand der Oberflächenexpression von CD19, B220 und CD43 (Abb. 4). Des Weiteren wiesen die

untersuchten *Eμ-Myc* Lymphomzellen eine mindestens unreifzellige Differenzierung auf, die durch membranständiges IgM repräsentiert wurde (Abb. 4).

Durch die Vereinigung von Schlüsseleigenschaften humaner NHL (Tumorgenetik, B-zelluläre Herkunft und Tumorbilogie) eignete sich das *Eμ-Myc* Mausmodell für die weitergehenden Analysen, wenngleich die meisten Gemeinsamkeiten zum Burkitt-Lymphom und DLBCL bestehen.

Um Änderungen im Streuverhalten von Lymphomzellen durch ektope Antigenstimulation untersuchen zu können, nutzten wir das etablierte *rat insulin* Promoter (*Rip*)-*CXCL13* Mausmodell, in dem durch ektope *CXCL13* Expression in β -Zellen der *Langerhans* Inseln des Pankreas Lymphozyten akkumulieren und TLT entstehen können (Abb. 5A, Einleitung 1.1), und kreuzten sie mit *Eμ-Myc* Mäusen. *Rip-CXCL13* Mäuse weisen eine normale Lebenserwartung auf und sind fertil. Die Aggregation von Lymphozyten und Formation von TLT bleibt auf die Insulin produzierenden Inseln des Pankreas beschränkt [24].

Zunächst wurden die Pankreata und SLO von unverpaarten *Rip-CXCL13* Mäusen histologisch untersucht. Dabei zeigte sich bei normaler Milz- und Lymphknotenarchitektur selektiv an *Langerhans* Inseln eine Akkumulation von Lymphozyten (Abb. 5). Diese wiesen als wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu den Lymphomzellen von *Eμ-Myc* Mäusen einen niedrigen Ki67-Proliferationsindex von ca. 10% auf (Abb. 5D).

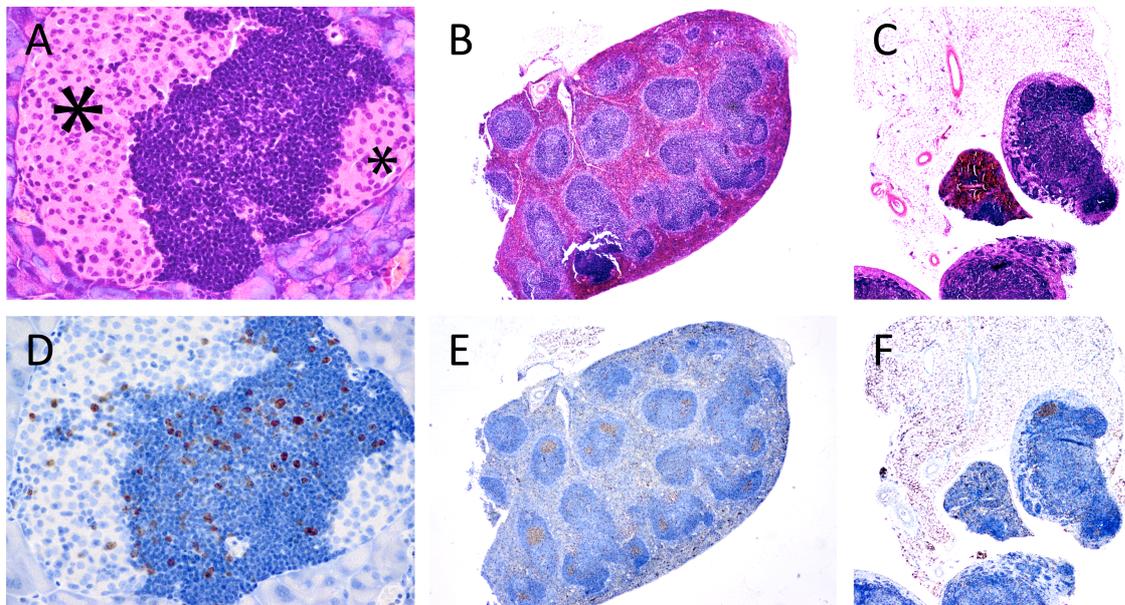


Abbildung 5. Ki67 Färbung von Pankreas, Milz und Lymphknoten der *Rip-CXCL13* Maus.

Repräsentative HE Färbungen eines Lymphozyteninfiltrats zwischen zwei *Langerhans* Inseln (s. Sternsymbol, A, 40x) einer Milz (B, 4x) und eines mesenterialen Lymphknotens (C, 4x) einer *Rip-CXCL13* Maus. Die dazugehörigen Ki67 Färbungen sind braun dargestellt (D, E, F).

Im nächsten Schritt wurde die Expression von CXCL13 mRNA im Pankreas von Wildtyp *Eμ-Myc* Mäusen und von *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen im Vergleich zum Wildtyp-Pankreas untersucht. Dafür wurde RNA aus ganzen Pankreata isoliert und nach DNA-Verdau in cDNA mittels Reverser Transkriptase (RT) umgeschrieben. Durch quantitative PCR wurde die CXCL13 mRNA Expression in Relation zum ubiquitär exprimierten Gen GAPDH (engl. *housekeeping gene*) ermittelt. Es zeigte sich bei niedriger CXCL13 mRNA Expression im Wildtyp-Pankreas und WT *Eμ-Myc* Pankreas eine variabel höhere Expression im *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreas, wenn mit der GAPDH mRNA Expression normalisiert wurde (Abb. 6A).

Nachfolgend wurde die CXCL13 Proteinexpression im Pankreas von *Eμ-Myc* und *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen im Vergleich zu der in Wildtyp-Pankreata analysiert. Dabei konnte CXCL13 Protein nur im Pankreas von *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen detektiert werden (Abb. 7). Es zeigten sich zwei Signalbanden für CXCL13. Eine Oligomerisierung ist denkbar, da sie bereits für viele CXC-Chemokine gesichert ist [65]. Für das CXCL13 Chemokin sind diesbezüglich aktuell keine Daten verfügbar.

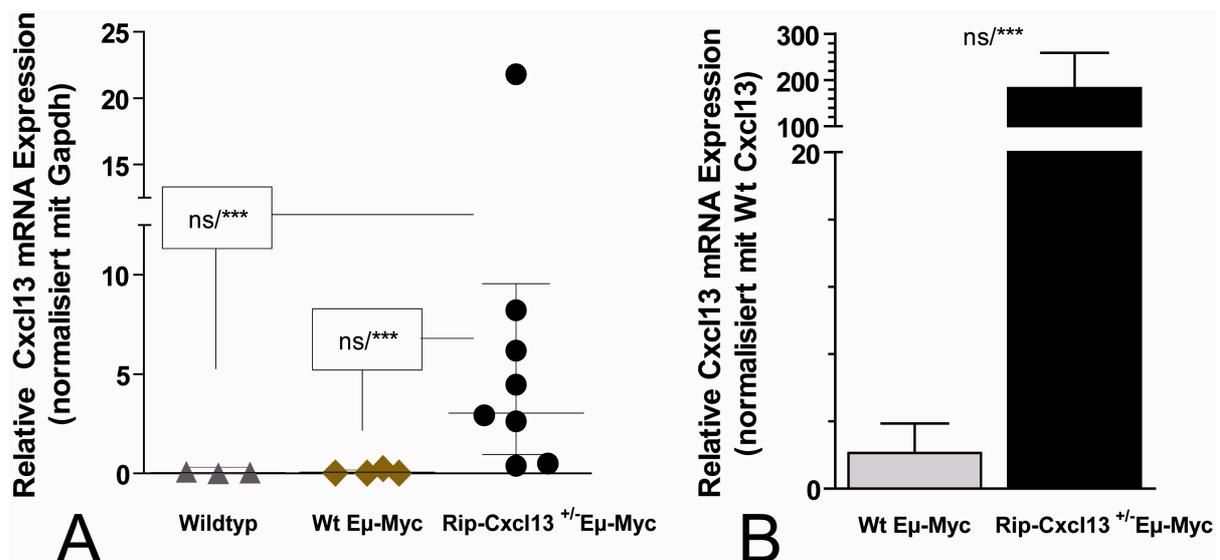


Abbildung 6. CXCL13 mRNA Expression im *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreas.

(A) Relative CXCL13 mRNA Expression im Pankreas von Wildtyp-Mäusen (n=3), *Eμ-Myc* Mäusen (n=4) und *Rip-Cxcl13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen (n=8) normalisiert mit der GAPDH mRNA Expression durch die Berechnung von $\Delta Ct(Ct^{Zielgen} \text{ minus } Ct^{Referenzgen})$ und $2^{-\Delta Ct}$ unter der hypothetischen Annahme der 100%-Primerbindungseffizienz. ns/*** Die Cxcl13 mRNA Expression in *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreata im Vergleich zu Wildtyp-Pankreata zeigte im t-Test Non-Signifikanz (P-Wert 0,0969) und im F-Test Signifikanz (P-Wert <0,0001). Die CXCL13 mRNA Expression in *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreata im Vergleich zu WT *Eμ-Myc* Pankreata ergab im t-Test Non-Signifikanz (P-Wert 0,0672), im F-Test Signifikanz (P-Wert < 0,0001).

(B) Relative CXCL13 mRNA Expression in WT *Eμ-Myc* und *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreata normalisiert auf die pankreatische Wildtyp CXCL13 mRNA Expression. ns/*** siehe (A).

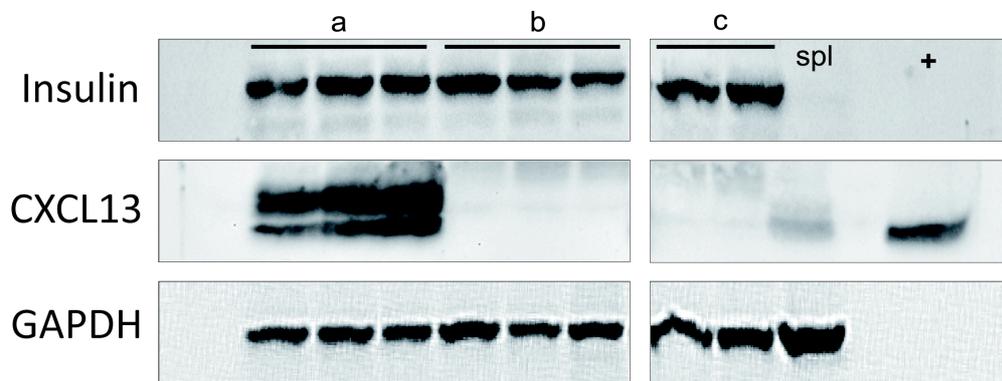


Abbildung 7. CXCL13 Proteinexpression im *Rip-CXCL13^{+/+}Eμ-Myc* Pankreas.

(a) *Rip-CXCL13^{+/+}Eμ-Myc* und (b) *Eμ-Myc* Pankreas, jeweils n=3. (c) Wildtyp-Pankreas, n=2. (spl) Wildtyp-Milz. (+) rekombinantes murines CXCL13 Protein.

3.1. DIE CXCL13 INDUZIERT E KTOPE LYMPHONEOGENESE IM PANKREAS UND IHRE AUSWIRKUNG AUF DIE LYMPHOMZELLMIGRATION

Das Pankreas wurde hinsichtlich einer Beteiligung im Rahmen der Lymphomkrankung im originären *E μ -Myc* Mausmodell nicht untersucht [62]. Um eine spontane Lymphomzellinfiltration ins Pankreas auszuschließen, wurden zunächst die Pankreata von *E μ -Myc* Mäusen paraffiniert, zu Gewebeschnitten verarbeitet und für die Lichtmikroskopie mit HE gefärbt. Es zeigten sich dabei vereinzelte Infiltrate durch Lymphomzellen, die bis zu 3% der *Langerhans* Inseln betrafen (Abb. 8AB und Abb. 9). Aufgrund der perivaskulären Anordnung wurden sie zunächst als unspezifisch bewertet. In Analogie wurden nachfolgend die Pankreata von *Rip-CXCL13^{+/-}E μ -Myc* Mäusen untersucht.

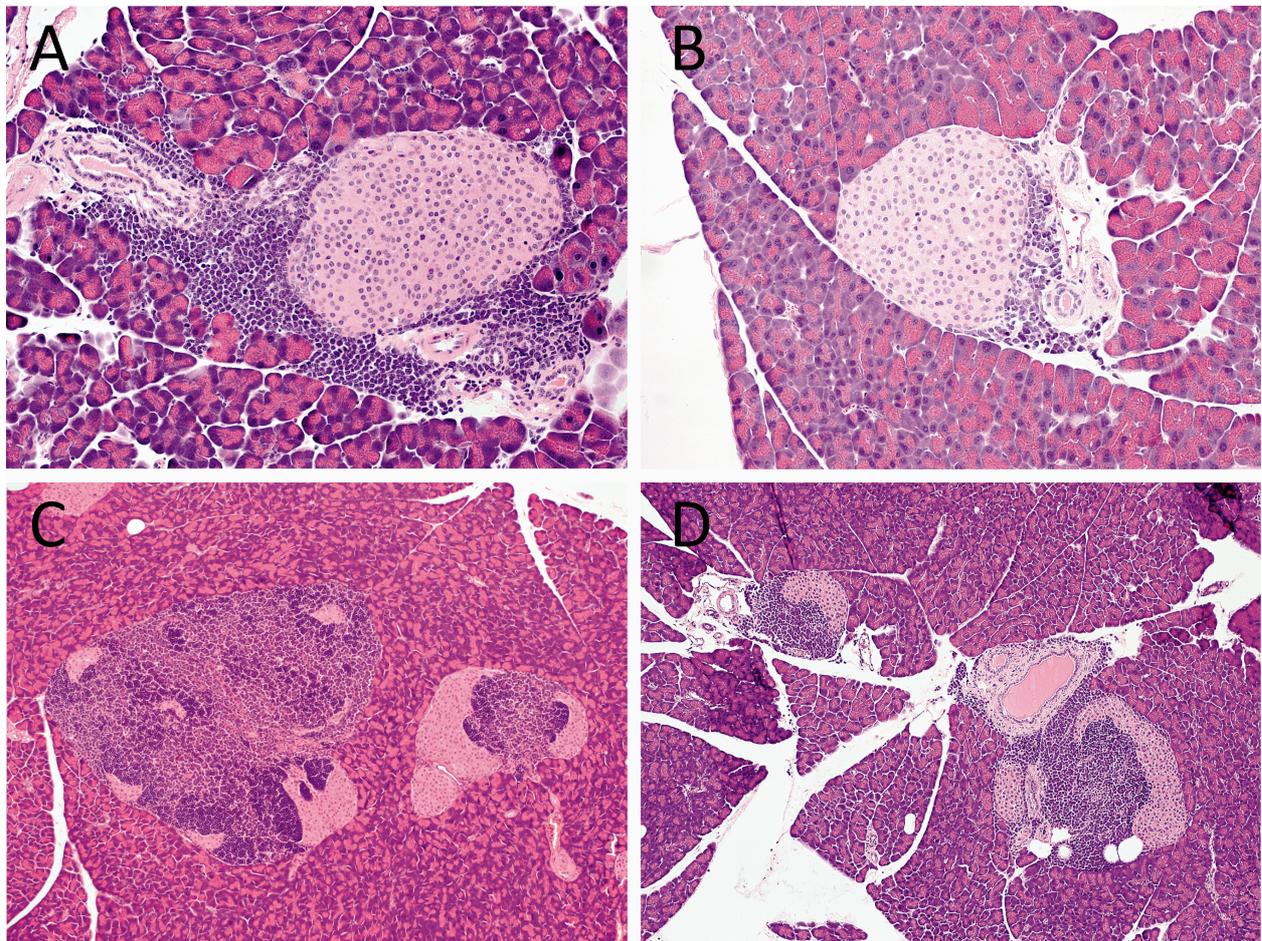


Abbildung 8. Pankreatische Lymphomzellinfiltration.

HE gefärbte Pankreata von *E μ -Myc* Mäusen mit je einer erfassten *Langerhans* Insel und perivaskulärem Lymphomzellinfiltrat (A, B, 20x) und von *Rip-CXCL13^{+/-}E μ -Myc* Mäusen (C, D, 10x) mit *Langerhans* Inselresten und variabel großen Infiltraten aus Lymphozyten (stark basophil) und Lymphomzellen (schwach basophil).

Dabei zeigten sich häufiger perivaskulär gelegene Infiltrate durch Lymphomzellen in etwa 5% der *Langerhans* Inseln der *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäuse, die aber statistisch nicht signifikant waren (Abb. 9). Zusätzlich war eine inselspezifische Akkumulation der *Eμ-Myc* Lymphomzellen nachweisbar, die mit einer gestörten Integrität der *Langerhans* Inseln einherging (Abb. 8CD) und ca. 7% der *Langerhans* Inseln in *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen betraf (Abb. 9). Zusätzlich waren Infiltrate durch Lymphozyten in 4% der *Langerhans* Inseln in *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreata nachweisbar.

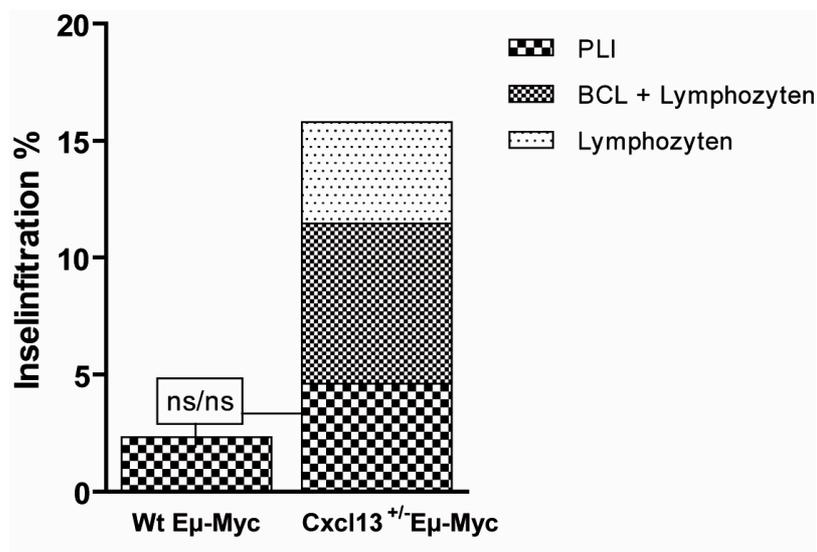


Abbildung 9. Inselinfiltrate in *Eμ-Myc* und *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreata.

Inselinfiltrate in Wildtyp *Eμ-Myc* Mäusen (Wt *Eμ-Myc*, n=10) und in *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen (kurz: *Cxcl13^{+/-}Eμ-Myc*, n=18) mit Unterscheidung in perivaskuläres Lymphominfiltrat (PLI), gemischte Infiltration durch Lymphozyten und B-Zelllymphom (BCL) und durch Lymphozyten alleine. Total wurden 1505 Inseln in ganzen *Eμ-Myc* Pankreata und 2965 Inseln in *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreata analysiert. ns/ns: Das PLI-Vorkommen in WT *Eμ-Myc* und *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen ergab im t-Test (P-Wert 0,4120) und im F-Test (P-Wert 0,5537) Non-Signifikanz.

3.1.1. Die inselspezifische Migration von Lymphomzellen

Für die Detektion von Lymphomzellen in den lymphozytären Infiltraten der Pankreata von *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen wurden die Gewebeschnitte immunhistologisch untersucht. Zum Anzeigen der β -Zellen der *Langerhans* Inseln erfolgte eine Insulinfärbung. Die CXCL13 Färbung erfolgte für die Detektion von CXCL13 Protein in *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* und *Eμ-Myc* Pankreata. Bei dem Nachweis von Inselinfiltraten wurde eine B220 und eine Ki67 Färbung durchgeführt, durch die die Differenzierung zwischen Lymphozyten und Lymphomzellen gelang.

Zunächst wurden die lymphozytären Inselinfiltrate der *Rip-CXCL13* Maus betrachtet, die von Luther und Kollegen charakterisiert wurden [24]. Sie bestehen zum überwiegenden Teil aus B-Lymphozyten, das durch die starke B220 Färbung angezeigt wird (Abb. 10 rechts).

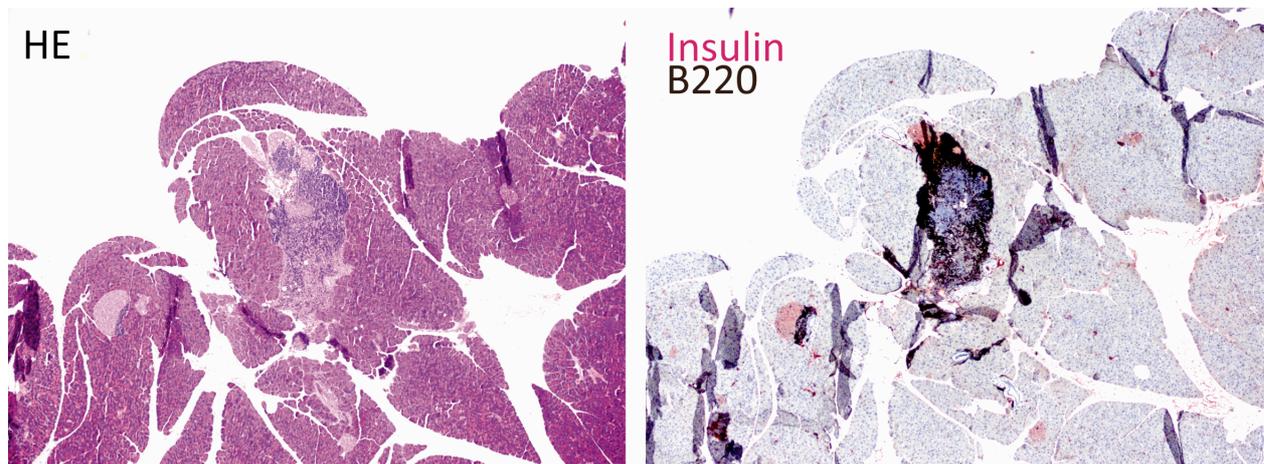


Abbildung 10. B-Lymphozyten überwiegen in den Inselinfiltraten im *Rip-CXCL13* Pankreas.

HE gefärbter Ausschnitt eines *Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreas mit in der Mitte des Ausschnitts gelegener, eine *Langerhans* Insel betreffender, konfluierender lymphozytärer Infiltrat (links, 4x). Rechts: B220 (braun) färbt die B-Lymphozyten stark an, die kleine und große Infiltrate dominieren. Insulin (rot) färbt die β -Zellen der *Langerhans* Inseln des Pankreas an (rechts).

Die Lymphomzellen der *Eμ-Myc* Mäuse wurden durch die schwache Expression von B220 bei starker Anfärbbarkeit durch den Ki67 Antikörper angezeigt und waren in der Lagebeziehung zu den pankreatischen Inseln den B-Lymphozyten nachgeordnet (Abb. 11FG). Durch die Insulinfärbung konnten restliche β -Zellen in den konfluierenden Infiltraten nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnte das CXCL13 Protein in den *Langerhans* Inseln der *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Pankreata nachgewiesen werden. Eine CXCL13 Expression war im *Eμ-Myc* Pankreas nicht nachweisbar (Abb. 11C).

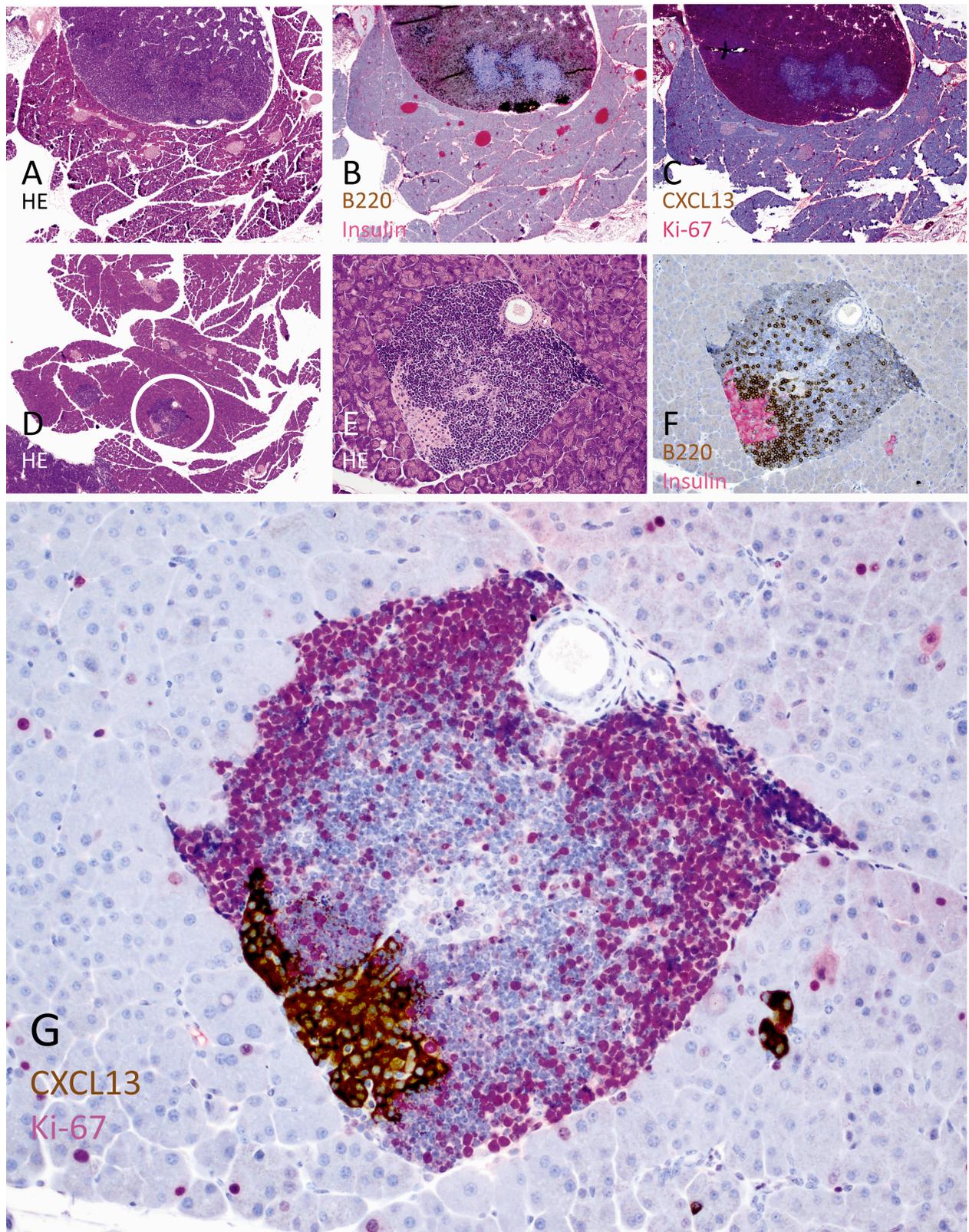


Abbildung 11. Charakterisierung der Lymphomzellinfiltrate im *Rip-CXCL13^{+/+}Eμ-Myc* Mausmodell.

Repräsentative HE Färbungen vom Pankreas einer *Eμ-Myc* Maus (A, 4x) und einer *Rip-CXCL13^{+/+}Eμ-Myc* Maus (D, 4x und E, 20x). Immunohistochemische Doppelfärbungen der konsekutiven Schnitte wie angezeigt (B, C, je 4x und F, G, je 20x).

3.1.2. Adoptiver Transfer von Lymphomzellen

Obwohl sich die Erkrankung der *Eμ-Myc* Maus durch periphere Lymphadenopathie anzeigt, war teilweise eine variabel fortgeschrittene Lymphominfiltration im Pankreas nachweisbar. Um größere Vergleichbarkeit zu erzielen, wurde der adoptive Transfer von Lymphomzellen etabliert, durch den Lymphome in den Empfängermäusen in einem vorgegebenen Zeitraum von zehn bis vierzehn Tagen regenerieren [62]. Dafür wurden *Eμ-Myc* Lymphome entnommen, zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und Wildtyp (= *tx* WT) sowie *Rip-CXCL13^{+/-}* (= *tx Rip-CXCL13^{+/-}*) Empfängern intravenös appliziert. Die Pankreata wurden zu festen Zeitpunkten nach adoptivem Transfer entnommen, paraffiniert und HE gefärbt. Die *Langerhans* Inseln wurden untersucht und die Infiltrate quantifiziert.

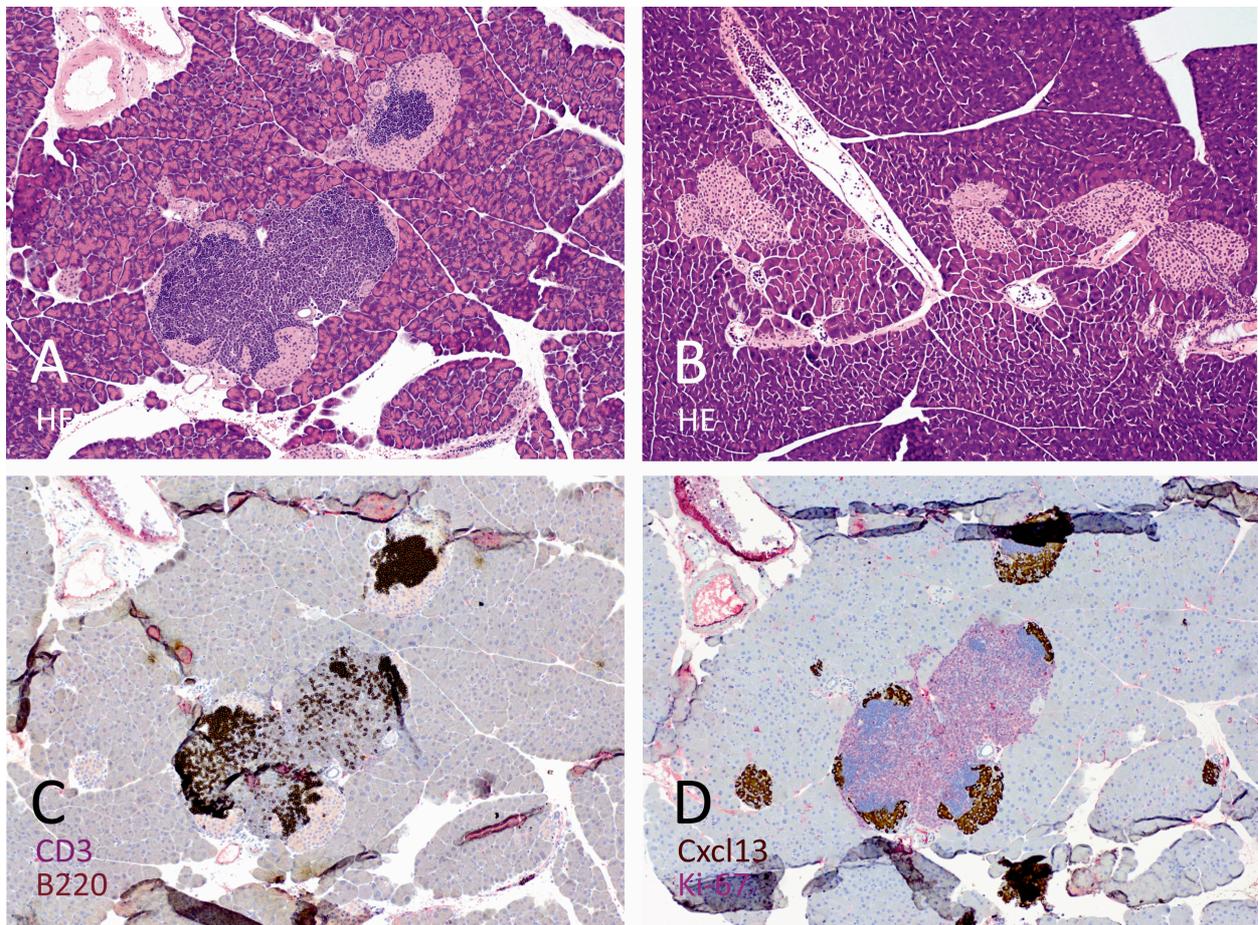


Abbildung 12. Pankreatische Lymphominfiltration nach adoptivem Transfer.

Repräsentative HE Färbungen vom Pankreas eines (A, 10x) *tx Rip-CXCL13^{+/-}* mit *Langerhans* Inselinfiltraten und eines (B, 10x) *tx* Wildtyp Geschwisters ohne Nachweis von Inselinfiltraten. In den Bildern C, D sind die immunohistochemischen Färbungen zum *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreas dargestellt, in denen inselständige B-Lymphozyten (durch B220) und Lymphomzellen (durch Ki67) nachweisbar sind.

In Analogie zum genetischen Experiment bildeten sich Lymphomzellinfiltrate in *Langerhans* Inseln der *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Empfänger aus (Abb. 12A). In den *tx WT* Pankreata wurden durchschnittlich 212 Inseln pro Pankreas, in *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata 207 Inseln pro Pankreas gezählt. Dabei zeigten sich PLI in *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata häufiger als in *tx WT* Pankreata (Abb. 13). Zusätzlich wiesen die *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata in weiteren 33% aller *Langerhans* Inseln eine parallele Infiltration durch Lymphozyten und Lymphomzellen auf, die in *tx WT* Pankreata fehlte. Somit unterstrich der adoptive Transfer von Lymphomzellen deutlich das Ergebnis aus dem genetischen Experiment (s. 3.1.1) und wurde für die weitergehenden Analysen verwendet.

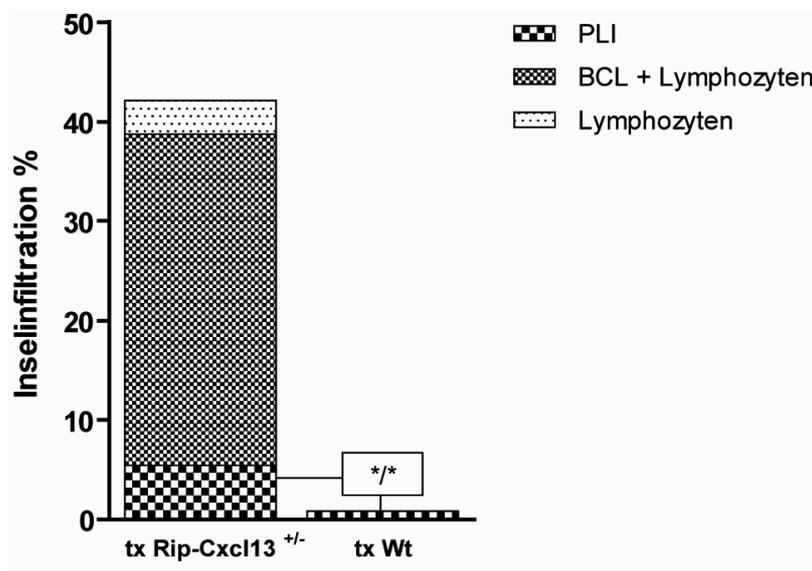


Abbildung 13. Inselinfiltrate nach adoptivem Transfer.

Inselinfiltrate in *tx Rip-CXCL13^{+/-}* (n=4) und *tx Wildtyp*-Empfängern (n=4). PLI = perivaskuläre Lymphominvasion.

** Das PLI-Vorkommen ergab im t-Test (P-Wert 0,0105) und im F-Test Signifikanz (P-Wert 0,0315).

3.1.3. Abhängigkeit von der CXCL13-CXCR5 Signalkaskade

Bei Erhalt inselspezifischer Lymphommigration im *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Modell wurde im nächsten Schritt ihre Abhängigkeit von der ektope CXCL13 Expression evaluiert. In der originären *Rip-CXCL13* Maus werden die Lymphozyten durch Interaktion von CXCR5 mit CXCL13 in die pankreatischen Inseln rekrutiert. Dabei können TLT entstehen [24]. Um den direkten Einfluss der CXCL13 Präsentation auf die Lymphomzellmigration in Abwesenheit von Lymphozyten zu beurteilen, wurden die *Rip-CXCL13* Mäuse mit *CXCR5^{-/-}* Mäusen verpaart. Die CXCR5 defiziente Maus zeigt ein gestörtes *Homing* von B-Lymphozyten sowie minder ausgeprägte bis anzahlverminderte periphere Lymphknoten und PP.

Nach adoptivem Transfer von *Eμ-Myc* Lymphomzellen wurden die Pankreata der *CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Empfänger auf HE gefärbten Paraffinschnitten lichtmikroskopisch untersucht. Als Kontrollen dienten die Pankreata der *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Empfänger aus 3.1.2. Das Vorkommen von PLI war in den *tx CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata im Vergleich zu den *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata signifikant vermindert. Eine inselständige Ko-Infiltration von Lymphozyten und Lymphomzellen war in den *tx CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata nicht nachweisbar (Abb. 15).

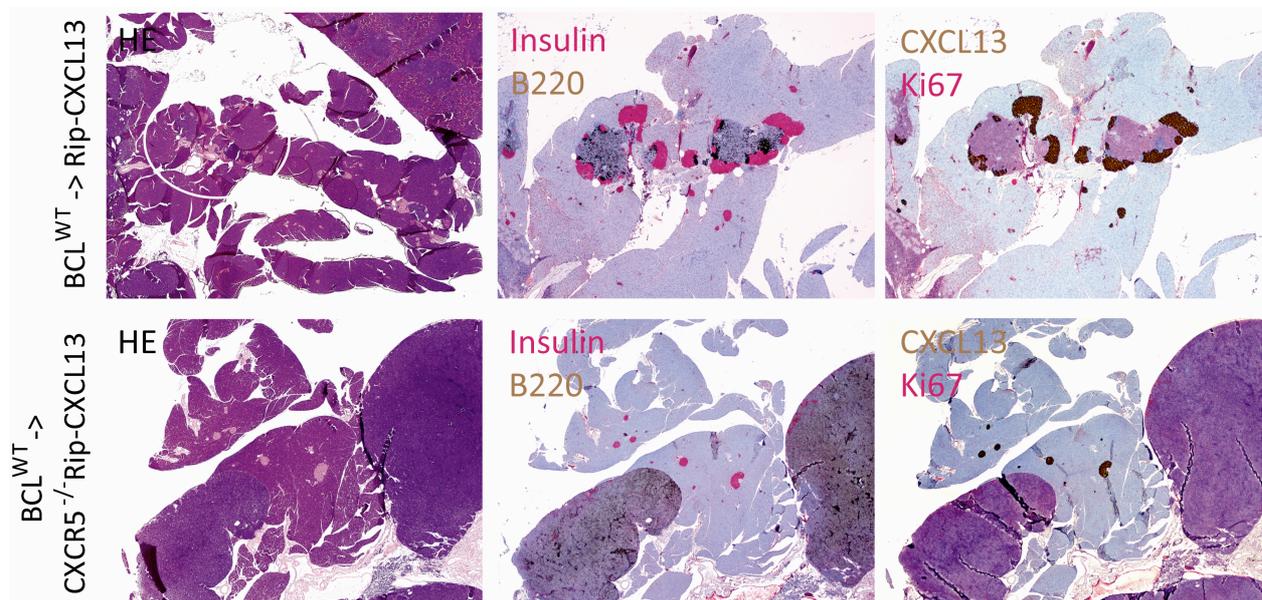


Abbildung 14. Pankreatische Lymphomzellmigration nach CXCR5 Deletion.

Repräsentative HE Färbungen von *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Empfängern (obere Reihe, 10x) und *tx CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Empfängern (untere Reihe, 4x). Nach *Eμ-Myc* Lymphomzell-Transfer in *CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Mäuse bleibt eine Inselinfiltration durch Lymphomzellen aus.

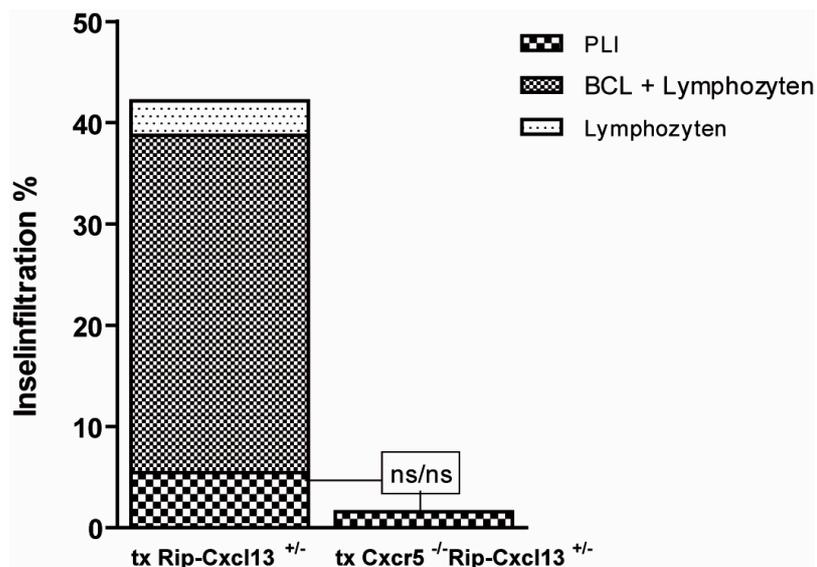


Abbildung 15. Inselinfiltrate nach CXCR5 Deletion und adoptivem Transfer.

Inselinfiltrate in *tx CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* (n=3) im Vergleich zu den *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Empfängern (n=4). Es wurden durchschnittlich jeweils 128 und 207 Inseln pro Pankreas gezählt. ns/ns: Das PLI-Vorkommen ergab im t-Test (P-Wert 0,0592) und im F-Test Non-Signifikanz (P-Wert 0,7651).

Das Ausbleiben der inselspezifischen Lymphomzellinfiltration in *tx CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Mäusen kann auf einer fehlenden Oberflächenexpression von CXCR5 durch die eingebrachten *Eμ-Myc* Lymphomzellen beruhen. Für Letzteres waren keine Angaben in der aktuellen Literatur verfügbar, so dass die *Eμ-Myc* Lymphomzellen molekulargenetisch und biochemisch bezüglich der CXCR5 Expression charakterisiert wurden. Dafür wurden mesenteriale Lymphome entnommen und aus ihnen RNA isoliert. Als Kontrollgewebe wurden Wildtyp-Milzen, *CXCR5^{-/-}* Milzen und mesenteriale *CXCR5^{-/-}Eμ-Myc* Lymphome verwendet. Nach dem Verdau von genomischer DNA und cDNA Transkription mittels Reverser Transkriptase erfolgte die PCR zum Nachweis von CXCR5 mRNA, der in den Lymphomen von *Eμ-Myc* Mäusen und in Wildtyp-Milzen gelang (Abb. 16).

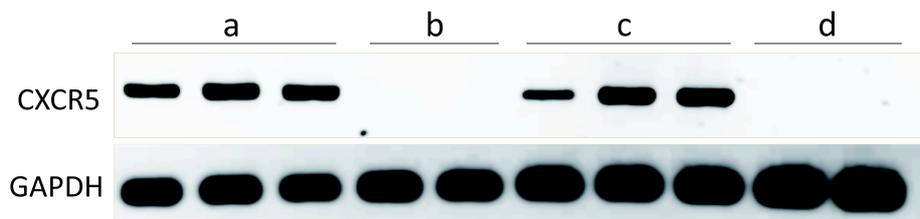


Abbildung 16. CXCR5 mRNA Expression in *Eμ-Myc* Lymphomen.

Gelelektrophorese nach PCR für CXCR5 mRNA in (a) *Eμ-Myc* Lymphomen und (c) Wildtyp Splenozyten. Kontrollen: *CXCR5^{-/-}Eμ-Myc* Lymphome (b) und *CXCR5^{-/-}* Splenozyten (d). Die nachgewiesene Bandengröße für das CXCR5 PCR Produkt entsprach der erwarteten Bandengröße von 531 bp.

Nachfolgend wurde die CXCR5 Expression auf *Eμ-Myc* Lymphomzellen immunzytometrisch untersucht (n=13). Die Zellen wurden aus vergrößerten Lymphknoten isoliert. Dabei waren 96% aller Zellen im Lymphozyten/Blasten-Gate *Eμ-Myc* Lymphomzellen, die keine CXCR5 Oberflächenexpression aufwiesen. Die gesehene CXCR5 Oberflächenexpression resultierte jeweils aus einer kleinen Lymphozyten-Restpopulation von nur 1% aller Zellen (Abb. 17A).

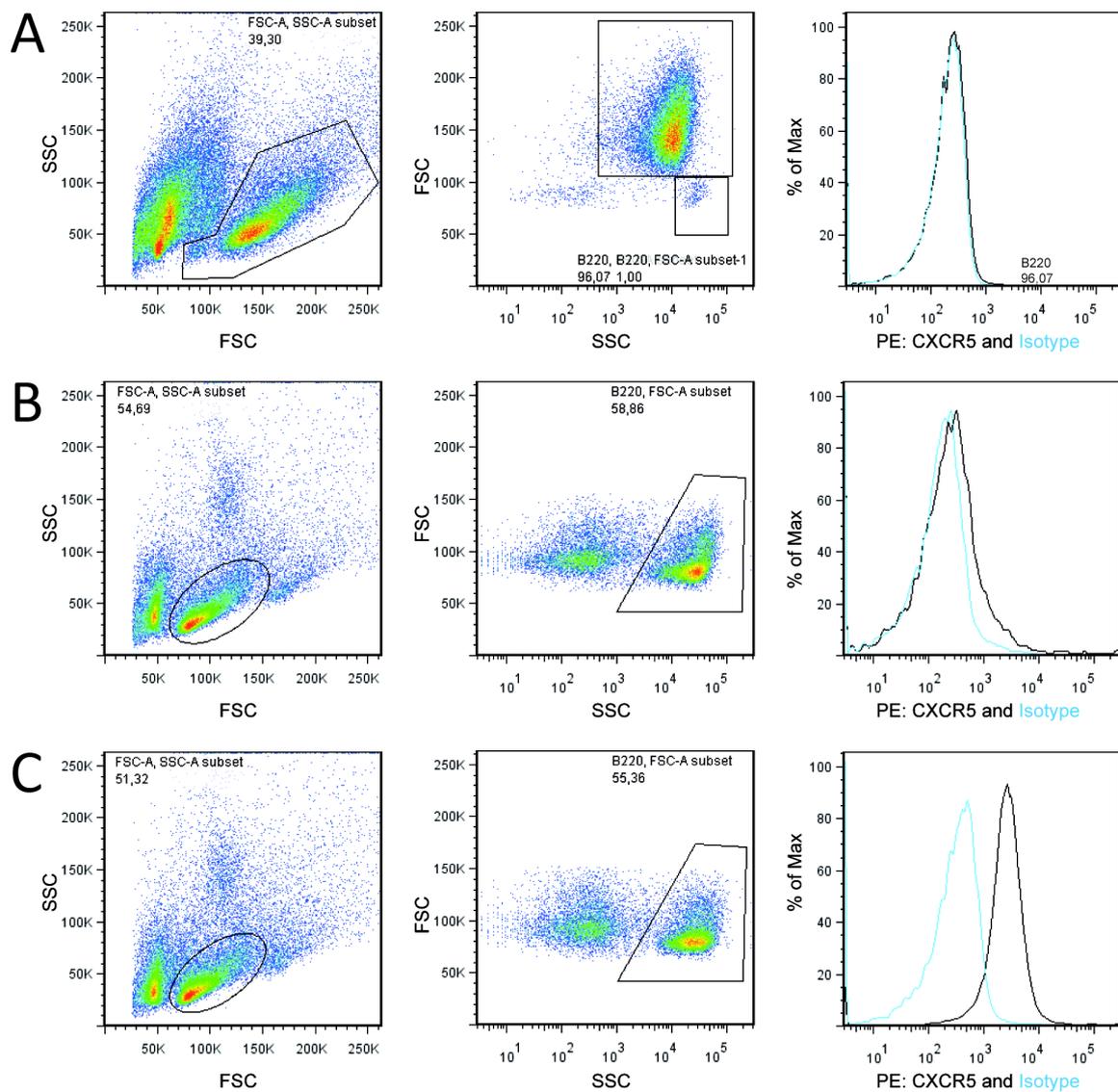


Abbildung 17. CXCR5 Oberflächenexpression in *Eμ-Myc* Lymphomen.

CXCR5 Oberflächenfärbung (schwarze Kurve) in (A) *Eμ-Myc* Lymphomzellen, (B) *CXCR5*^{-/-} Splenozyten und (C) Wildtyp-Splenozyten. Blaue Kurve entspricht der Isotypkontrolle.

Obwohl eine CXCR5 Oberflächenexpression durch *Eμ-Myc* Lymphomzellen nicht nachweisbar war, war sie für die die *Langerhans* Inseln infiltrierenden Lymphomzellen, die eine kleine CXCR5 positive Subpopulation darstellen könnten, nicht hinreichend evaluiert. Um diesen Umstand genauer untersuchen zu können, wurden CXCR5 negative *Eμ-Myc* Lymphome durch die Verpaarung von *CXCR5*^{-/-} Mäusen mit *Eμ-Myc* Mäusen generiert, isoliert und adoptiv in *Rip-CXCL13*^{+/-} Empfänger transferiert. Als Kontrollexperiment erfolgte der adoptive Transfer von Wildtyp *Eμ-Myc* Lymphomzellen in *Rip-CXCL13*^{+/-} Empfänger. Dabei zeigte sich nach dem Transfer von *CXCR5*^{-/-}*Eμ-Myc* Lymphomzellen in *Rip-CXCL13*^{+/-} Pankreata die charakteristische Parallelinfiltration durch Lymphomzellen und Lymphozyten, die in selber Art in den Wildtyp *Eμ-Myc* lymphomzelltransplantierten *Rip-CXCL13*^{+/-} Empfängern beobachtet wurde (Abb. 18), so dass angenommen werden muss, dass die CXCR5 Expression für die Ausbildung des Phänotyps der doppelt transgenen *Rip-CXCL13*^{+/-}*Eμ-Myc* Maus von untergeordneter Bedeutung ist.

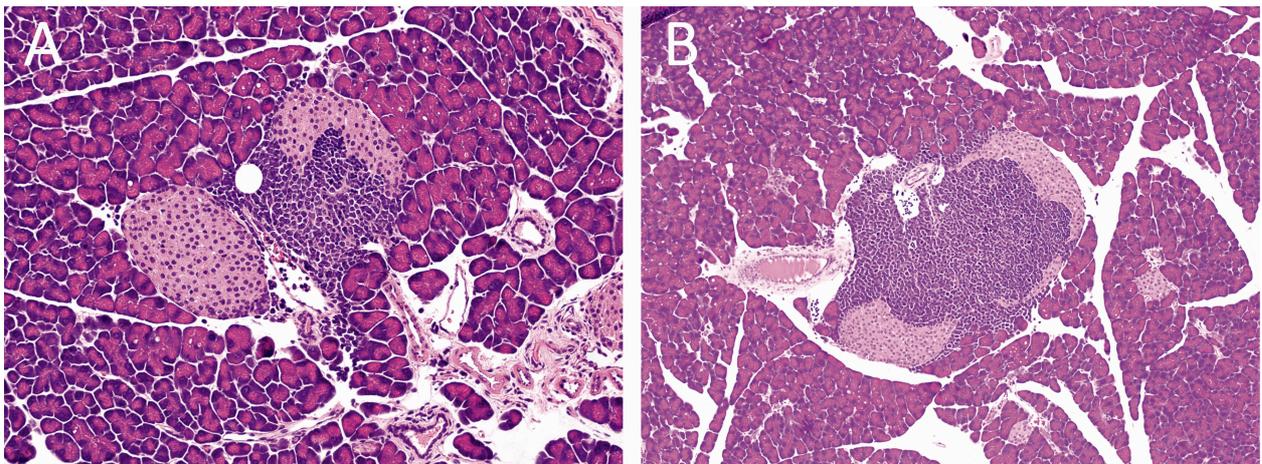


Abbildung 18. CXCR5 unabhängige Dissemination von Lymphomzellen.

CXCR5^{-/-}*Eμ-Myc* Lymphomzellen (A) infiltrieren *Langerhans* Inseln nach Transfer in *Rip-CXCL13* Empfänger (n=6) in vergleichbarem Maße wie WT *Eμ-Myc* Lymphomzellen (B, n=7), je 20-fache Auflösung.

3.1.4. Abhängigkeit von Lymphozyten

Die inselspezifische Lymphomzellmigration konnte durch ektope CXCL13 Expression alleine nicht induziert werden. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der im Zuge der CXCL13 rekrutierten, inselinfiltrierenden Lymphozyten auf die Migration der Lymphomzellen evaluiert. Dafür wurden *Rip-CXCL13* Mäuse mit *Recombination activating Gen 1 (Rag1)* defizienten Mäusen verpaart. Die Gene *Rag1* und *Rag2* codieren Enzyme, die die somatische Rekombination der V (*variable*)-, D (*diverse*)- und J (*joining*)-Gensegmente für den Aufbau von B- und T-Zellrezeptor (BCR, TCR) koordinieren. Die D-Gensegmente sind lediglich der Rekombination der Schwerketten des BCR und der β -Kette des TCR vorbehalten. Durch verschiedene VDJ-Segmente sind für Immunglobuline ca. 10^6 und für TCR ca. 3×10^6 Kombination möglich. Durch weitere Modifikationen durch Exonukleasen, die terminale Deoxyribonucleotidyl-Transferase (TdT) und P-Nukleotide ergibt sich ein Repertoire an 10^{11} unterschiedlichen Immunglobulinen und 10^{16} unterschiedlichen TCR. Bei defektem BCR und TCR in der *Rag1* defizienten Maus unterliegen die Lymphozyten der Apoptose, die Reifung bleibt aus [66].

Die durch die CXCL13 Expression bedingte Migration von Lymphozyten in die *Langerhans* Inseln im *Rip-CXCL13* Pankreas ist Voraussetzung für die Entstehung von TLT. Um zu erfahren, wie sich die Depletion von reifen Lymphozyten auf die Lymphozytenmigration und Bildung von TLT in den *Langerhans* Inseln auswirkt, wurden zunächst die Pankreata von *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Mäusen paraffiniert, zu Gewebeschnitten verarbeitet, HE gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht (n=2). Dabei war eine inselspezifische Lymphozytenmigration in den *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata in lediglich 2.6 % aller *Langerhans* Inseln nachweisbar (Abb. 19).

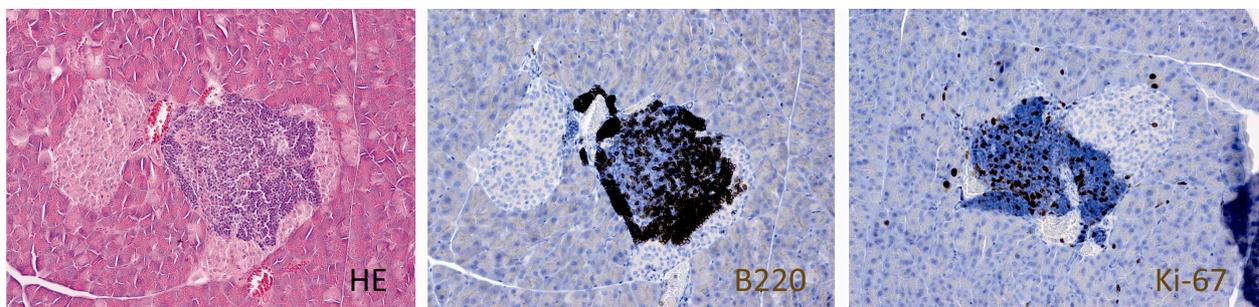


Abbildung 19. Lymphozytenmigration in *Langerhans* Inseln der *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Mäuse.

Repräsentative Histologie vom Pankreas einer *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Maus, je 20x. Lymphozytäre Infiltrate traten nur in 2.6% aller *Langerhans* Inseln auf.

Nachfolgend wurde das Streuverhalten von *Eμ-Myc* Lymphomzellen in *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata untersucht (n=4). Dafür wurden die *tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata paraffiniert, zu Gewebeschnitten verarbeitet und HE gefärbt. Es zeigten sich vereinzelt Lymphomzellen in den wenigen lymphozytären Inselnfiltraten. Bemerkenswert war das signifikant überwiegende Vorkommen von PLI in den *tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Empfängern (Abb. 20, 21).

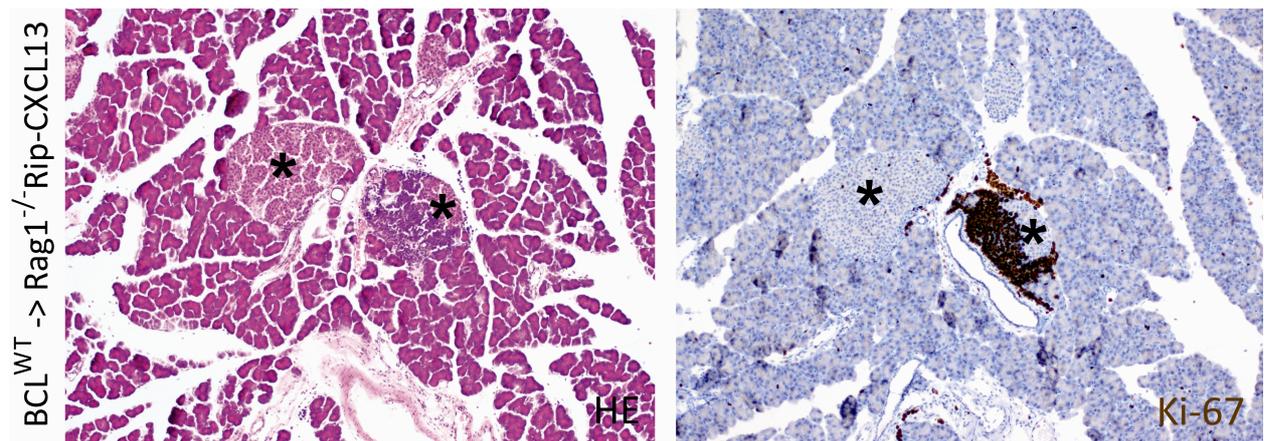


Abbildung 20. Pankreatische Lymphomzellinfiltration in *tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Mäuse.

HE und Ki67 Färbung vom Pankreas einer *tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Maus mit perivaskulärem Lymphomzellinfiltrat, je 10x. Die Sternchen markieren die *Langerhans* Inseln.

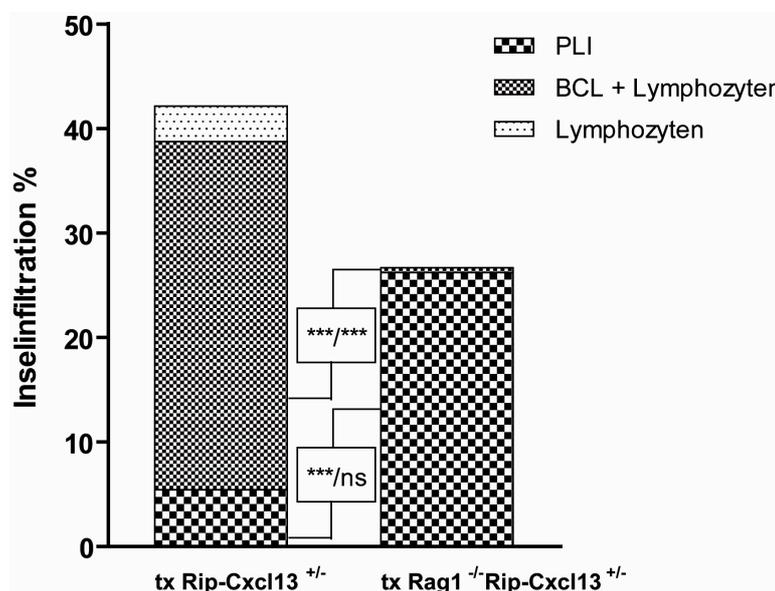


Abbildung 21. Inselinfiltrate in *tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Mäuse.

Inselinfiltrate in *tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* (n=4) und *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Empfänger (n=4). Es wurden durchschnittlich jeweils 105 und 207 Inseln pro Pankreas gezählt. ***/*** Das vermehrte Vorkommen von spezifischen Ko-Infiltraten aus BCL + Lymphozyten in den *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Empfängern ergab im t- (P-Wert 0,0005) und F-Test (P-Wert <0,0001) statistische Signifikanz. ***/ns: Das PLI Vorkommen zeigte im t-Test Signifikanz (P-Wert 0,0003), im F-Test Non-Signifikanz (P-Wert 0,1325).

3.1.5. Überleben

Der *Eμ-Myc*, *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* und *CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Nachwuchs wurde hinsichtlich des Alters bei Erkrankung untersucht. Alle Mäuse wurden bis mindestens 230 Tage nach Geburt beobachtet. Zuchttiere wurden nicht ausgeschlossen. Die Erkrankung wurde durch vergrößerte Lymphknoten oder Verhaltensauffälligkeiten angezeigt (siehe Abschnitt 2.3). Das Überleben der *Eμ-Myc*, *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* und *CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäuse wurde mittels *Kaplan-Meier* Kurve als prozentuales Überleben in Tagen nach Geburt dargestellt. Dabei zeigte sich bei den *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen ein geringeres medianes Überleben von 74 Tagen nach Geburt bei einem medianen Überleben von 113 Tagen nach Geburt der *Eμ-Myc* Mäuse. Bemerkenswert war, dass CXCR5 defiziente *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäuse ein verbessertes medianes Überleben von 165 Tagen nach Geburt zeigten. Der Vergleich der Überlebenskurven mittels *Mantel-Cox* Test ergab statistische Signifikanz ($P < 0.0001$).

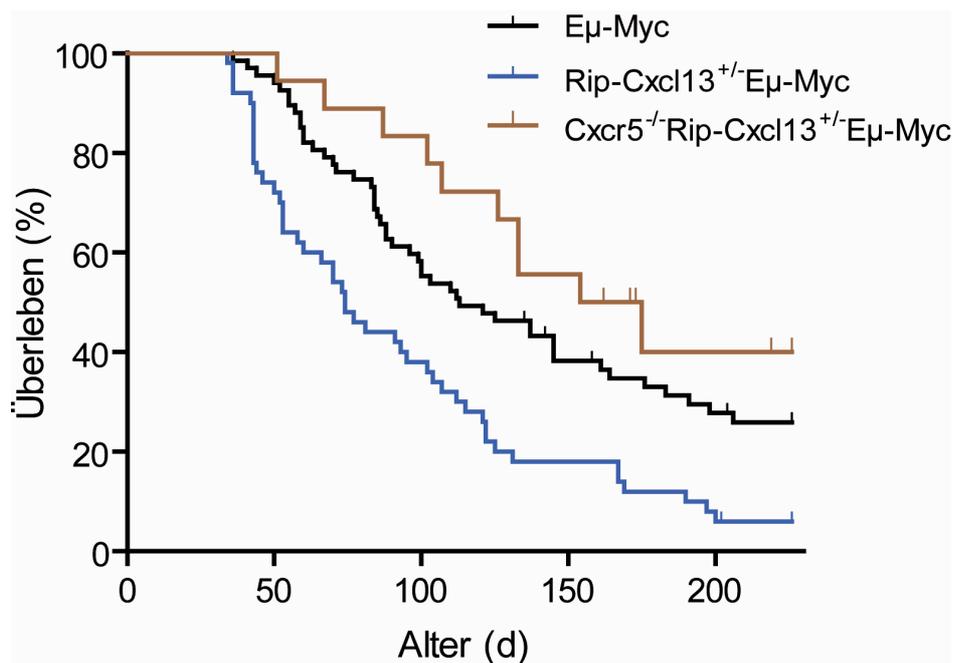


Abbildung 22. Überleben von *Eμ-Myc* positivem Nachwuchs.

Prozentuales Überleben in Tagen nach Geburt von *Eμ-Myc* Mäusen (n=67), *Rip-Cxcl13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen (n=50) und *Cxcr5^{-/-}Rip-Cxcl13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen (n=18).

3.2. CHARAKTERISIERUNG EINES MAUSMODELLS FÜR CXCL13 - MEDIERTE MIGRATION VON LYMPHOMZELLEN INS ZNS

Für viele humane NHL wird der Einfluss von Chemokinen auf die Pathogenese und Dissemination diskutiert [37, 41, 67, 68]. Besonders in PCNSL ist die Expression von Chemokinen mehrfach untersucht. In der vorliegenden Arbeit führte die CXCL13 Expression durch Migration von Lymphozyten ins Pankreas zur gewebespezifischen Migration von Lymphomzellen. Dieser Phänotyp war mit einem geringeren medianen Überleben der Mäuse im Vergleich zu WT *Eμ-Myc* Mäusen assoziiert und war durch CXCR5 Deletion reversibel. Um diesen Zusammenhang für ZNS Lymphome untersuchen zu können, wurden *Gfap-CXCL13* Mäuse zur Verfügung gestellt (AG Baier, RKI, Berlin), in denen unter Kontrolle des *Glial fibrillary acid protein (Gfap)* Promoters ZNS-spezifisch CXCL13 gebildet wird. Dabei wurden die *Gfap-CXCL13*^{+/-} Mäuse mit *Eμ-Myc* Mäusen verpaart und der *Gfap-CXCL13*^{+/-}*Eμ-Myc* Nachwuchs hinsichtlich der Entstehung von intracerebralen Lymphomen untersucht. Als Kontrollen dienten die Cerebra von *Eμ-Myc* Mäusen. Zunächst wurde die cerebrale Expression von CXCL13 untersucht (Abb. 23). Dabei zeigte sich eine mit der GAPDH mRNA Expression normalisierte schwache CXCL13 mRNA Expression in beiden Gruppen, wenngleich sie in *Gfap-CXCL13*^{+/-}*Eμ-Myc* Cerebra signifikant höher war (Abb. 23A). Cerebrales CXCL13 Protein war in *Gfap-CXCL13*^{+/-}*Eμ-Myc* Cerebra erwartungsgemäß variabel schwach detektierbar (Abb. 23B).

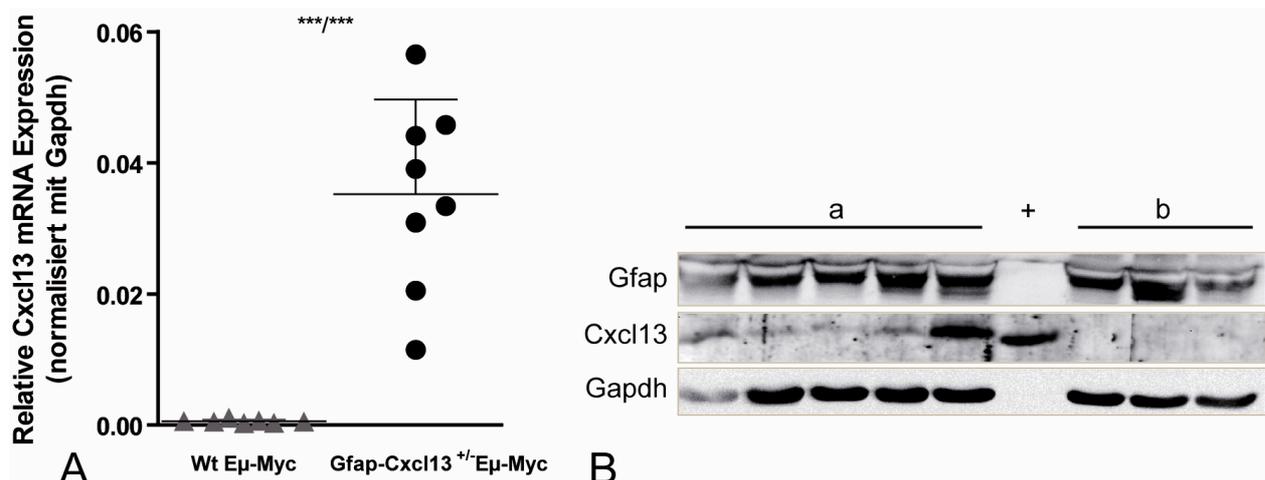


Abbildung 23. Cerebrale CXCL13 Expression im *Gfap-CXCL13*^{+/-}*Eμ-Myc* Mausmodell.

(A) Relative CXCL13 mRNA Expression normalisiert mit GAPDH mRNA in WT *Eμ-Myc* (n=7) und *Gfap-CXCL13*^{+/-}*Eμ-Myc* (n=9). ***/** Die CXCL13 mRNA Expression in *Gfap-CXCL13*^{+/-}*Eμ-Myc* Cerebra im Vergleich zu den Wildtyp-Cerebra ergab statistische Signifikanz im t-Test (P-Wert <0,0001) und im F-Test (P-Wert <0,0001). (B) CXCL13 Proteinblot in (a) *Gfap-CXCL13*^{+/-}*Eμ-Myc* Cerebra (n=5) und (b) WT *Eμ-Myc* Cerebra (n=3). (+) rekombinates murines CXCL13 Protein.

Daraufhin wurden die anderen Hemisphären mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich in beiden Gruppen ein intracerebraler Normalbefund. Eine Meningeosis war in *Eμ-Myc* und *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen häufig nachweisbar (Pfeile in Abb. 24A-E, nicht quantifiziert).

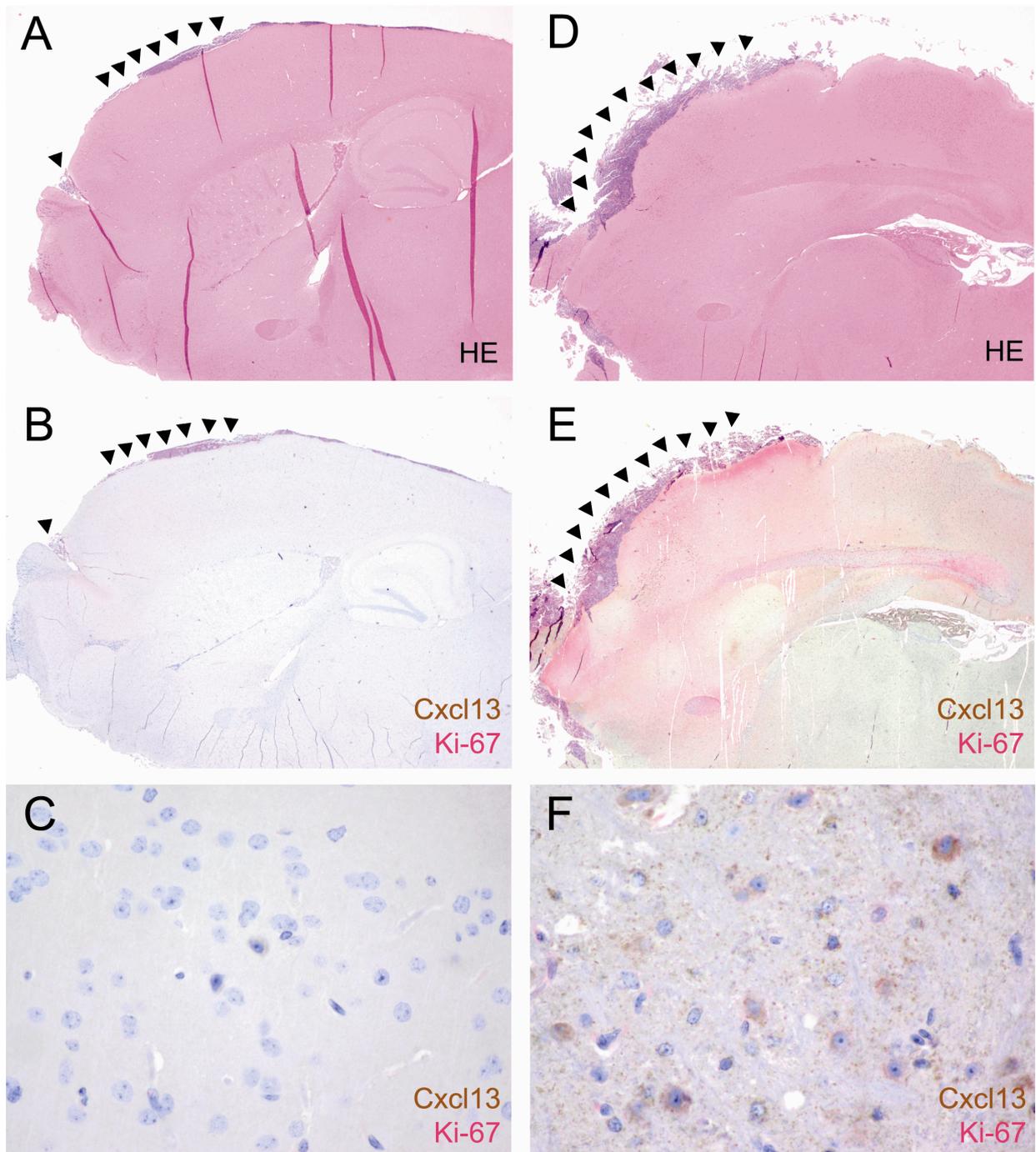


Abbildung 24. Histologie der Cerebra von *Eμ-Myc* und *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen.

Repräsentative HE Färbungen der Cerebra von *Eμ-Myc* Mäusen (A, n=8) und *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäusen (D, n=12), je 2x. Immunhistochemische Doppelfärbungen konsekutiver Schnitte in B und E wie angezeigt. C und F: 40x. Intrazerebrale Lymphomzellinfiltrate waren nicht nachweisbar. Pfeile zeigen Meningeosis an.

4. DISKUSSION

4.1. WAHL DES VERSUCHSDESIGNS

Das bisherige Wissen über den Einfluss von Chemokinen und Chemokinrezeptoren auf NHL wurde aus *in vitro* Analysen [69-72] oder aus *Xenograft*-Modellen gewonnen, die bei Immundefizienz der Wirte eingeschränkt aussagekräftig sind [51-55]. Experimentelle Modelle, das Migrationsverhalten von Lymphomzellen studieren zu können, sind nicht verfügbar. Für die Fragestellung einer mehrere Organe und Gewebe einbeziehenden Migration von Lymphomzellen wurden *in vitro* Analysen aus technischen Gesichtspunkten nicht gerecht.

4.2. EIGNUNG DER MAUSMODELLE

Die *Eμ-Myc* Maus entwickelt Lymphome B-zellulären Ursprungs, die zunächst als lymphonoduläre Erkrankung verlaufen und wesentliche genetische und biologische Eigenschaften humaner NHL aufweisen (s. Abschnitt 3). Pankreata der *Eμ-Myc* Maus wurden bei ihrer Erstbeschreibung nicht untersucht [62]. In dieser Arbeit zeigte sich, dass *Langerhans* Inseln gelegentlich durch Lymphomzellen betroffen waren. Da der pankreatische Lymphombefall in den verschiedenen *Eμ-Myc* transgenen Tieren und nach dem Transfer von *Eμ-Myc* Lymphomzellen (außer in *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Empfänger) jeweils etwa 5% der *Langerhans* Inseln betraf, wurde er als unspezifisches perivaskuläres Lymphomzellinfiltrat (PLI) in allen Gruppen gleich behandelt, wenngleich er in *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata signifikant häufiger auftrat als im *tx* Wildtyp Pankreas, das dadurch bedingt sein kann, dass bei Progress die ursprüngliche spezifische gemeinsame Infiltration von Lymphozyten und Lymphomzellen sich zu Gunsten der Lymphomzellen umkehrt. Da die *Langerhans* Inseln in der *Eμ-Myc* Maus somit weitestgehend ausgespart blieben, eigneten sie sich als Zielgewebe für die Migration von Lymphomzellen.

Um den Einfluss der ektopen Chemokinproduktion auf die Lymphomzellinfiltration außerhalb von lymphatischen Organen untersuchen zu können, wurde das *Rip-CXCL13* Modell gewählt. Die inselständigen Lymphozyteninfiltrate im *Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreas teilen Eigenschaften von chronischen Entzündungen und SLO, da ihre zellulär-funktionale Kompartimentierung LTα1β2-abhängig erfolgt [23, 26]. Daher wurde im weiteren Sinne auch der Einfluss von Lymphozyten und lymphatischen Gewebes auf die Lymphomzellmigration evaluiert.

4.3. EINFLUSS VON CXCL13 AUF DIE LYMPHOMMIGRATION

Durch ektope CXCL13 Expression im Pankreas werden Lymphomzellen im *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mausmodell spezifisch angezogen. Aktuell wird der Einfluss von homöostatischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren auf die Dissemination von hämatologischen und soliden Neoplasien evaluiert [51-55]. In der vorliegenden Arbeit muss der direkte Einfluss der CXCL13 Expression als gering eingestuft werden, da *Eμ-Myc* Lymphomzellen keine CXCR5 Oberflächenexpression aufwiesen (Abb. 17A) und die CXCL13 Expression in Abwesenheit von Lymphozyteninfiltraten keine Lymphomzellmigration induzierte (Abb. 14). Chemokine und ihre Rezeptoren wechselwirken mit verschiedenen Partnern. Für CXCR5 und CXCL13 sind keine weiteren Bindungspartner bekannt, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass CXCL13 mit einem anderen Antigen auf den *Eμ-Myc* Lymphomzellen interagiert als unklar, aber gering eingestuft wird. Die *Langerhans* Insel ständigen Lymphomzellen wurden bezüglich der CXCR5 Expression nicht hinreichend untersucht; sie könnten eine CXCR5 positive Subpopulation darstellen. Die immunhistochemische CXCR5 Detektion konnte auf den Paraffinschnitten von Pankreas, Milz und Lymphknoten nicht etabliert werden. Das Formaldehyd-fixierte und paraffinierte Gewebe kam für eine Laser-gestützte Mikrodisektion nicht in Frage. Stattdessen konnte eine CXCR5 gestützte Migration der Lymphomzellen funktionell ausgeschlossen werden, da durch den Transfer von *CXCR5^{-/-}Eμ-Myc* Lymphomzellen in *Rip-CXCL13^{+/-}* Empfänger die spezifische Inselinfiltration reproduzierbar war. Dieses Ergebnis wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt, die eine CCR7 gesteuerte und CXCR5 unabhängige Migration von *Eμ-Myc* Lymphomzellen in SLO zeigte [73].

4.4. EINFLUSS VON LYMPHOZYTEN AUF DIE LYMPHOMMIGRATION

Die in die *Langerhans* Inseln migrierten Lymphozyten im *Rip-CXCL13* Pankreas bedingen die spezifische Migration der Lymphomzellen. Angesichts der Redundanz der Wechselwirkung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren kommen viele als Migrationsinduktoren in Frage. Der Chemokinrezeptor CCR7 gewinnt diesbezüglich Aufmerksamkeit, da sich *Eμ-Myc* Lymphomzellen durch ihn in T-Zellzonen von SLO orientieren [73]. Damit vereinbar, wird das Chemokin CCL21, ein Bindungspartner von CCR7, in den TLN der *Rip-CXCL13* Maus gebildet [24]. Somit könnte die hier gezeigte spezifische Lymphomzellmigration auf der Interaktion von CCR7 mit CCL21 beruhen. Das Chemokin CCL21 wird im *Rip-CXCL13* Pankreas nur in solchen lymphozytären Infiltraten gebildet, in denen Lymphotoxin abhängig eine Transformation in TLN erfolgt ist [24]. Sollte die Lymphomzellmigration auf dieser Chemokinattraktion

basieren, so wäre das TLT-abhängige Vorkommen von CCL21 eine mögliche Erklärung dafür, dass nur ein Teil der *Langerhans* Inseln, die lymphozytäre Infiltrate in den *Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Tieren aufwiesen, zusätzlich durch Lymphomzellen betroffen war.

Für die Ausbildung von Lymphominfiltraten im *Rip-CXCL13* Pankreas sind Lymphozyten unerlässlich. In der *Rag1^{-/-}* Maus sind Lymphozyten depletiert, weswegen sie zur Analyse der Abhängigkeit von Lymphozyten eingesetzt wurden. Die unreifen T-Zellen der *Rag1^{-/-}* Maus sind typischerweise CD3, CD4 und CD8 sowie TCR negativ, die B-Zellen IgM und IgD negativ. Unabhängig vom Reifegrad wird B220 auf etwa einem Drittel bis einem Viertel aller B-Lymphozyten exprimiert. Die Infiltrate im *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreas, die durch B220 Positivität angezeigt werden konnten, waren deutlich reduziert (Abb. 19). Zwar sind keine Angaben bezüglich der CXCR5 Expression auf *Rag1^{-/-}* B- und T-Lymphozyten verfügbar gewesen, allerdings verfügen *Rag1^{-/-}* Mäuse über SLO, die auf das Wirken von *Lymphoid tissue inducer* Zellen (*LTi*) zurückgeführt werden, die sich durch die Expression des nukleären Hormonrezeptors *RORγ* (*Retinoid-related orphan receptor gamma*) auszeichnen [19, 20]. Bemerkenswert ist, dass *LTi* Zellen die Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 exprimieren und in den TLT der *Rip-CXCL13^{+/-}* *Langerhans* Inseln nachgewiesen wurden [26]. Überdies konnten *Luther und Kollegen* zeigen, dass die *LTi* Zellen eine wichtige Quelle für die *LTα1β2* Produktion darstellen, die für die Ausbildung von SLO und TLT unabdingbar ist [26]. Die anzahlreduzierten lymphozytären Infiltrate im *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreas zeigten vorrangig B220 positive B-Zellen. Ihre Entstehung trotz Depletion reifer Lymphozyten könnte auf das Wirken von *LTi* Zellen zurückgeführt werden, denn Eigenschaften von TLT wie die Ausbildung von HEV können auch in Abwesenheit reifer Lymphozyten existieren [23].

Perivaskuläre Lymphomzellinfiltrate (PLI) in *tx Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata überstiegen das Vorkommen von PLI in *tx Rip-CXCL13^{+/-}* Pankreata statistisch signifikant um ein Vielfaches. Durch das gestörte *Homing* in Abwesenheit reifer B- und T-Lymphozyten werden die SLO in *Rag1^{-/-}* Mäusen spärlich besiedelt. Denkbar wäre, dass durch intravenösen Lymphomzelltransfer bei mangelnden *Homing*-Signalen in SLO in *Rag1^{-/-}* Mäusen ein relatives leukämisches bzw. pankreatisches Überangebot an Lymphomzellen entstand.

4.5. ÜBERLEBEN

Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc Mäuse fielen durch ein signifikant geringeres medianes Überleben im Vergleich zu WT *Eμ-Myc* Geschwistern auf (Abb. 22). Eine naheliegende Erklärung wären der mit der frühen Lymphomzellmigration verbundene Untergang der *Langerhans* Inseln und die

Ausbildung einer endokrinen Insuffizienz oder aber andere lokale Phänomene wie Tumorthrombosen und ähnliches. Zwar ist die Gruppe der *CXCR5^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Mäuse verhältnismäßig klein, dennoch war bemerkenswert, dass durch die CXCR5 Deletion das Überleben signifikant verbessert werden konnte (Abb. 22).

4.6. ZNS MODELL

Durch Aussparung des Zentralen Nervensystems [62] eignete sich das *Eμ-Myc* Modell für die vorliegende *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Studie. Streng genommen kann die *Gfap-CXCL13 Eμ-Myc* Maus nicht uneingeschränkt als Modell für humane PCNSL gelten, da für die Diagnose ein isolierter ZNS Befall vorliegen muss. Somit kann das *Eμ-Myc* transgene Mausmodell für die Induktion und Analyse von ZNS-Lymphomen herangezogen und nur bedingt auf humane PCNSL übertragen werden.

Zunächst wurde die *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Maus näher charakterisiert. Molekulargenetisch zeigte sich in den *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* und WT *Eμ-Myc* Cerebra ein niedriges CXCL13 mRNA Expressionslevel im Bereich der GAPDH mRNA Expression, wenngleich sie im *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* signifikant höher war als im WT *Eμ-Myc* Cerebrum (Abb. 23). Erwartungsgemäß war die CXCL13 Proteinexpression schwach bis nicht detektierbar.

Ein Modell, in dem intracerebrale Lymphome in Analogie zu humanen PCNSL induziert werden, existiert bislang nicht. Eine spezifische Lymphomzellmigration ins *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Cerebrum konnte in der vorgelegten Arbeit nicht induziert werden (Abb. 24). Vermutlich ist neben der niedrigen CXCL13 Expression die Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine effektive Migrationsbarriere für Lymphozyten und Lymphomzellen, wenngleich Chemokine und Chemokinrezeptoren im ZNS exprimiert sind [48, 74]. Die Expression von homöostatischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren ist in humanen PCNSL vielfach nachgewiesen [40, 45, 75]. In der vorliegenden Arbeit konnte keine relevante CXCL13 Expression in *Eμ-Myc* und *Gfap-CXCL13^{+/-}Eμ-Myc* Cerebra nachgewiesen werden (Abb. 23, 24).

4.7. AUSBLICK

Perspektivisch wird das Hauptaugenmerk auf die Identifikation der auslösenden molekularen Interaktion zu therapeutischen Zwecken gelegt. Dabei ist zu beachten, dass ein therapeutisch effektives *Targeting* von Chemokinrezeptoren wiederum u.a. aufgrund ihrer synergistischen, daher redundanten Funktion eine große Herausforderung darstellt [76]. Dabei bietet die hier

gezeigte Kombination aus dem Rip-Cxcl13 und E μ -Myc Mausmodell bei bekannt kurzer *in vivo* Regenerationszeit der E μ -Myc Lymphome von lediglich zwei Wochen die Möglichkeit, den Einfluss genetischer Veränderungen auf das Disseminationsverhalten von Lymphomzellen zeiteffektiv zu untersuchen.

ZUSAMMENFASSUNG

Non Hodgkin Lymphome können primär oder sekundär in nicht lymphatischen Organen auftreten. Die Rekrutierungsmechanismen, die die Lymphomzelldissemination vermitteln, sind unbekannt. Aus diesem Grunde fehlen *targeted therapy* Strategien bislang gänzlich. Um perspektivisch molekulare Interaktionen als mögliche therapeutische Angriffspunkte identifizieren und nutzen zu können, bedarf es der Analyse der Lymphomzellmigration *in vivo*, für die ein geeignetes Modell bislang fehlt. In einem natürlichen Lymphommodell (*E μ -Myc*) konnte in der vorliegenden Arbeit durch Einkreuzen der ektope CXCL13 Expression (*Rip-CXCL13*) die Migration von Lymphomzellen in die β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas induziert werden. Die CXCR5-CXCL13 Signalkaskade ist zwar unerlässlich für die Migration der Lymphozyten in die Langerhans-Inseln des Pankreas im *Rip-CXCL13* Mausmodell. Bezüglich der pankreatischen Migration der *E μ -Myc* Lymphomzellen allerdings konnte ein direkter Einfluss dieser Chemokinrezeptor und Chemokin-Interaktion nicht nachgewiesen werden, da die *E μ -Myc* Lymphomzellen CXCR5 nicht auf ihrer Oberfläche tragen und die isolierte CXCL13 Expression keine Inselinfiltrate hervorrief. Zudem migrierten die WT *E μ -Myc* und *CXCR5^{-/-}E μ -Myc* Lymphomzellen nach adoptivem Transfer in *Rip-CXCL13^{+/-}* Empfänger in vergleichbarer Weise spezifisch ins Pankreas, so dass eine direkte Abhängigkeit vom homöostatischen Chemokinrezeptor CXCR5 zumindest funktionell ausgeschlossen wurde. Es zeigte sich dahingegen eine direkte Abhängigkeit der spezifischen Lymphommigration von den lymphozytären Inselinfiltraten, da durch die Depletion von reifen Lymphozyten die Rate an pankreatischer Lymphomzelldissemination in *Rag1^{-/-}Rip-CXCL13^{+/-}* Empfängern um 96% signifikant reduziert werden konnte. Durch die gezielte Lymphomzellrekrutierung in Langerhans-Inseln des Pankreas wiesen die *Rip-CXCL13^{+/-}E μ -Myc* Tiere im Vergleich zu WT *E μ -Myc* Geschwistern ein signifikant reduziertes Überleben in Tagen nach Geburt auf. In einem bislang nicht charakterisierten ZNS Modell für ektope CXCL13 Expression (*Gfap-CXCL13*) konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden, da womöglich bei niedriger CXCL13 mRNA und Proteinexpression der nötige Chemokingradient zur Attraktion der Lymphozyten vor dem Hintergrund der BHS nicht aufgebaut werden konnte.

In der Zusammenschau der hier dargelegten Ergebnisse konnte erstmalig ein natürliches Mausmodell generiert werden, in dem die spezifische extranodale Dissemination von Lymphomzellen induziert wurde, das mit einem verschlechterten Überleben der Tiere assoziiert war. Durch chronische Antigenstimulation rekrutierte Lymphozyten sind dabei ein

entscheidender Aspekt in der Migration von Lymphomzellen. Die Aufdeckung der zu Grunde liegenden molekularen Interaktion wird perspektivisch neue gezielte Therapiestrategien ermöglichen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Buonamici, S., et al., *CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1000-4.
2. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
3. Bachelierie, F., et al., *International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors*. Pharmacological reviews, 2014. **66**(1): p. 1-79.
4. Miyasaka, M. and T. Tanaka, *Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas*. Nature reviews Immunology, 2004. **4**(5): p. 360-70.
5. Pelletier, A.J., et al., *Presentation of chemokine SDF-1 alpha by fibronectin mediates directed migration of T cells*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2682-90.
6. Clore, G.M. and A.M. Gronenborn, *Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1995. **9**(1): p. 57-62.
7. Covell, D.G., et al., *Analysis of hydrophobicity in the alpha and beta chemokine families and its relevance to dimerization*. Protein science : a publication of the Protein Society, 1994. **3**(11): p. 2064-72.
8. Laurence, J.S., A.C. LiWang, and P.J. LiWang, *Effect of N-terminal truncation and solution conditions on chemokine dimer stability: nuclear magnetic resonance structural analysis of macrophage inflammatory protein 1 beta mutants*. Biochemistry, 1998. **37**(26): p. 9346-54.
9. Chen, J., et al., *CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3*. Cancer Cell, 2011. **19**(4): p. 541-55.
10. De Clercq, E., *The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil)*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(11): p. 1655-64.
11. Wood, A. and D. Armour, *The discovery of the CCR5 receptor antagonist, UK-427,857, a new agent for the treatment of HIV infection and AIDS*. Prog Med Chem, 2005. **43**: p. 239-71.
12. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annual review of immunology, 1997. **15**: p. 675-705.
13. Bromley, S.K., S.Y. Thomas, and A.D. Luster, *Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 895-901.
14. Debes, G.F., et al., *Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 889-94.

15. Sallusto, F., et al., *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2760-9.
16. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
17. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
18. Gunn, M.D., et al., *Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization*. J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 451-60.
19. Kurebayashi, S., et al., *Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10132-7.
20. Sun, Z., et al., *Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2369-73.
21. Eberl, G., et al., *An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 64-73.
22. Yoshida, H., et al., *IL-7 receptor alpha+ CD3(-) cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 643-55.
23. Kratz, A., et al., *Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1461-72.
24. Luther, S.A., et al., *BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis*. Immunity, 2000. **12**(5): p. 471-81.
25. Marchesi, F., et al., *CXCL13 expression in the gut promotes accumulation of IL-22-producing lymphoid tissue-inducer cells, and formation of isolated lymphoid follicles*. Mucosal Immunol, 2009. **2**(6): p. 486-94.
26. Luther, S.A., K.M. Ansel, and J.G. Cyster, *Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in lymph node development*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1191-8.
27. Brass, A. and E.D. Brenndorfer, *The role of chemokines in hepatitis C virus-mediated liver disease*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(3): p. 4747-79.
28. Wotherspoon, A.C., et al., *Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori*. Lancet, 1993. **342**(8871): p. 575-7.
29. Wotherspoon, A.C., et al., *Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma*. Lancet, 1991. **338**(8776): p. 1175-6.

30. Yamamoto, K., et al., *Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by Helicobacter infection*. Mucosal Immunol, 2014.
31. Koo, J., et al., *Increased Lymphocyte Infiltration in Rheumatoid Arthritis Is Correlated with an Increase in LT α -like Cells in Synovial Fluid*. Immune Netw, 2013. **13**(6): p. 240-8.
32. Weiss, J.M., et al., *The thymus in autoimmune Myasthenia Gravis: Paradigm for a tertiary lymphoid organ*. Rev Neurol (Paris), 2013. **169**(8-9): p. 640-9.
33. Astorri, E., et al., *CX3CL1 and CX3CR1 expression in tertiary lymphoid structures in salivary gland infiltrates: fractalkine contribution to lymphoid neogenesis in Sjogren's syndrome*. Rheumatology (Oxford), 2013. **53**(4): p. 611-20.
34. Mathes, A.L., et al., *Global chemokine expression in systemic sclerosis (SSc): CCL19 expression correlates with vascular inflammation in SSc skin*. Ann Rheum Dis, 2013.
35. Biswas, S., et al., *CXCL13-CXCR5 co-expression regulates epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells during lymph node metastasis*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **143**(2): p. 265-76.
36. Guo, N., et al., *Chemokine receptor 7 enhances cell chemotaxis and migration of metastatic squamous cell carcinoma of head and neck through activation of matrix metalloproteinase-9*. Oncol Rep, 2014. **32**(2): p. 794-800.
37. Hopken, U.E., et al., *Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1109-16.
38. Irino, T., et al., *CC-Chemokine receptor CCR7: a key molecule for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 291.
39. Qi, X.W., et al., *Expression features of CXCR5 and its ligand, CXCL13 associated with poor prognosis of advanced colorectal cancer*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(13): p. 1916-24.
40. Smith, J.R., et al., *Expression of B-cell-attracting chemokine 1 (CXCL13) by malignant lymphocytes and vascular endothelium in primary central nervous system lymphoma*. Blood, 2003. **101**(3): p. 815-21.
41. Trentin, L., et al., *Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas*. Blood, 2004. **104**(2): p. 502-8.
42. Zhou, S., et al., *CCR7 expression and intratumoral FOXP3⁺ regulatory T cells are correlated with overall survival and lymph node metastasis in gastric cancer*. PLoS One, 2014. **8**(9): p. e74430.
43. Jahnke, K., et al., *Expression of the chemokine receptors CXCR4, CXCR5, and CCR7 in primary central nervous system lymphoma*. Blood, 2005. **106**(1): p. 384-5.
44. Rubenstein, J.L., et al., *CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma*. Blood, 2014. **121**(23): p. 4740-8.

45. Smith, J.R., et al., *Malignant B cells from patients with primary central nervous system lymphoma express stromal cell-derived factor-1*. *Am J Clin Pathol*, 2007. **127**(4): p. 633-41.
46. Neumann, H. and H. Wekerle, *Brain microglia: watchdogs with pedigree*. *Nat Neurosci*, 2013. **16**(3): p. 253-5.
47. Proding, C., et al., *CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system*. *Acta Neuropathol*, 2011. **121**(4): p. 445-58.
48. Williams, J.L., D.W. Holman, and R.S. Klein, *Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 154.
49. Hochberg, F.H. and D.C. Miller, *Primary central nervous system lymphoma*. *J Neurosurg*, 1988. **68**(6): p. 835-53.
50. Jahnke, K., et al., *Detection of subclinical systemic disease in primary CNS lymphoma by polymerase chain reaction of the rearranged immunoglobulin heavy-chain genes*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(29): p. 4754-7.
51. Liu, J., et al., *CCR6 Is a Prognostic Marker for Overall Survival in Patients with Colorectal Cancer, and Its Overexpression Enhances Metastasis In Vivo*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e101137.
52. Panjideh, H., et al., *Immunotherapy of B-cell non-Hodgkin lymphoma by targeting the chemokine receptor CXCR5 in a preclinical mouse model*. *Int J Cancer*, 2014.
53. Somovilla-Crespo, B., et al., *Anti-CCR7 therapy exerts a potent anti-tumor activity in a xenograft model of human mantle cell lymphoma*. *J Hematol Oncol*, 2014. **6**: p. 89.
54. Su, M.L., et al., *Inhibition of Chemokine (C-C Motif) Receptor 7 Sialylation Suppresses CCL19-Stimulated Proliferation, Invasion and Anti-Anoikis*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98823.
55. Widney, D.P., et al., *Levels of murine, but not human, CXCL13 are greatly elevated in NOD-SCID mice bearing the AIDS-associated Burkitt lymphoma cell line, 2F7*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72414.
56. Rubenstein, J., A.J. Ferreri, and S. Pittaluga, *Primary lymphoma of the central nervous system: epidemiology, pathology and current approaches to diagnosis, prognosis and treatment*. *Leuk Lymphoma*, 2008. **49 Suppl 1**: p. 43-51.
57. Sierra del Rio, M., et al., *Primary CNS lymphoma in immunocompetent patients*. *Oncologist*, 2009. **14**(5): p. 526-39.
58. Korfel, A. and U. Schlegel, *Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma*. *Nat Rev Neurol*, 2013. **9**(6): p. 317-27.
59. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Analytical biochemistry*, 1985. **150**(1): p. 76-85.

60. Hanahan, D., E.F. Wagner, and R.D. Palmiter, *The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer*. Genes & development, 2007. **21**(18): p. 2258-70.
61. Brinster, R.L., et al., *Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors*. Cell, 1984. **37**(2): p. 367-79.
62. Harris, A.W., et al., *The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells*. J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 353-71.
63. Bouchard, C., et al., *Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27*. The EMBO journal, 1999. **18**(19): p. 5321-33.
64. Adams, J.M., et al., *The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice*. Nature, 1985. **318**(6046): p. 533-8.
65. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2002. **42**: p. 469-99.
66. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
67. Fischer, L., et al., *CXCL13 and CXCL12 in central nervous system lymphoma patients*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 5968-73.
68. Rehm, A., et al., *Identification of a chemokine receptor profile characteristic for mediastinal large B-cell lymphoma*. Int J Cancer, 2009. **125**(10): p. 2367-74.
69. Corcione, A., et al., *CCL19 and CXCL12 trigger in vitro chemotaxis of human mantle cell lymphoma B cells*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 964-71.
70. Husson, H., et al., *Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays*. Blood, 2002. **99**(1): p. 282-9.
71. Husson, H., et al., *CXCL13 (BCA-1) is produced by follicular lymphoma cells: role in the accumulation of malignant B cells*. Br J Haematol, 2002. **119**(2): p. 492-5.
72. Trentin, L., et al., *The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 115-21.
73. Rehm, A., et al., *Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs*. Blood, 2011.
74. Engelhardt, B., *Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines*. Journal of the neurological sciences, 2008. **274**(1-2): p. 23-6.
75. Venetz, D., et al., *Perivascular expression of CXCL9 and CXCL12 in primary central nervous system lymphoma: T-cell infiltration and positioning of malignant B cells*. Int J Cancer, 2010. **127**(10): p. 2300-12.

76. Schall, T.J. and A.E. Proudfoot, *Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(5): p. 355-63.

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Frank Heppner für die Einstellung als Doktoranden vor vielen Jahren, das großzügige Überlassen der Thematik und ihrer Bearbeitung, für viele geistreiche Diskussionen und die volle Unterstützung.

Ich danke Frau Prof. Renate Arnold für die geistige Unterstützung und Förderung während der schriftlichen Anfertigung und Einreichung der Dissertation.

Ich danke ganz besonders Herrn Dr. Gordon Wilke für die Hilfestellung während der Durchflusszytometrie sowie Frau Claire Gehlhaar für die labortechnische Einweisung und Frau Petra Matylewski für die Hilfestellung bei der automatisierten immunhistochemischen Färbung. Herrn Dr. Gordon Wilke und Frau Lisa Wagner danke ich für den Lymphomzelltransfer in die *Rag1* defizienten Empfänger und für die Anfertigung der Gewebeschnitte.

Ich danke allen Freunden und Kollegen aus dem Bereich der Forschung und Diagnostik des Instituts für Neuropathologie für ihre fachliche Unterstützung und eine intensive Zeit voller lehrreicher Erfahrungen.

Ich danke meiner Familie und meinen engsten Freunden für die Unterstützung.

EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Elif Gül, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die CXCL13 induzierte ektope Entstehung lymphatischen Gewebes dirigiert die Dissemination von Lymphomzellen der *E μ -Myc* transgenen Maus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.