

Aus dem  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch und der  
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und  
Tumorimmunologie der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur pathogenetischen Funktion des  
Oberflächenmarkers PDL2 für das PMBL unter Verwendung des  
retroviralen Gentransfers

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gilbert Büchner

aus Berlin

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. P.T. Daniel  
                          2. Priv.-Doz. Dr. I. Tinhofer-Keilholz  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. T. Benter

Datum der Promotion: 3. Juni 2012

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	9
Abbildungsverzeichnis.....	10
1. Einleitung.....	11
1.1 Das primäre mediastinale B-Zell Lymphom .....	11
1.1.1 Klinik.....	11
1.1.2 Pathobiologie.....	11
1.1.3 Therapie .....	13
1.1.4 Fortschritte durch Genexpressionsstudien .....	14
1.2 Die T-Zell Aktivierung und notwendige regulatorische Signale .....	15
1.3 PDL2 - ein neues Mitglied der B7-Familie.....	17
1.4 PDL2 und Tumorentstehung .....	18
1.5 Der Gentransfer mit Hilfe von Retroviren .....	19
1.6 Die Apoptose .....	22
1.7 Der Zellzyklus .....	23
1.8 Lymphommodelle in der Maus .....	25
1.9 Zielsetzung der Arbeit .....	25
2. Material.....	27
2.1 Mäuse .....	27
2.2 Bakterien.....	27
2.3 Zelllinien.....	27
2.4 Plasmide .....	27
2.5 Restriktionsenzyme.....	28
2.6 Molekulargewichtsstandards für DNA .....	28
2.7 Peptide.....	28

---

2.8 Antikörper.....	28
2.8.1 Primärantikörper.....	28
2.8.2 Streptavidinkonjugate.....	29
2.9 Medien.....	29
2.9.1 Bakterienkulturmedien.....	29
2.9.2 Zellkulturmedien.....	30
2.10 Puffer.....	31
2.11 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	31
2.12 Geräte und sonstige Materialien.....	32
2.13 Software.....	33
3. Methoden.....	34
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	34
3.1.1 Bakterienkulturen auf Agarplatten.....	34
3.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> .....	34
3.1.3 Flüssigkulturen.....	34
3.1.4 Lagerung und Reaktivierung von Bakterienkulturen.....	34
3.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	34
3.1.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
3.1.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	35
3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	35
3.2 Zellbiologische Methoden.....	36
3.2.1 Kultivierung von Säugerzellen.....	36
3.2.2 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer.....	36
3.2.3 Durchflusszytometrie und FACS.....	36
3.2.4 Gewinnung retroviraler Überstände.....	38
3.2.5 Transduktion von primären murinen E $\mu$ -myc-Lymphomzellen.....	38
3.2.6 T-Zell-Proliferationsassay.....	40

---

3.3 Tierexperimente .....	41
3.3.1 Tiere und Haltungsbedingungen .....	41
3.3.2 Injektion der Lymphomzellen .....	41
3.3.3 Beurteilung des Krankheitsstadiums .....	41
4. Ergebnisse.....	42
4.1 Gewinnung retroviraler Überstände .....	42
4.2 Gewinnung und Charakterisierung von E $\mu$ -myc-Lymphomzellen.....	42
4.3 Transduktion primärer, muriner E $\mu$ -myc-Lymphomzellen .....	43
4.4 Anreicherung von GFP-exprimierenden Zellen .....	46
4.5 Nachweis der PDL2-Funktion <i>in vitro</i> .....	48
4.6 Das E $\mu$ -myc-Transfermodell .....	51
4.6.1 Wachstumsdynamik und Krankheitsbild der E $\mu$ -myc-Tumoren .....	51
4.6.2 Untersuchung zur immunmodulatorischen Funktion von PDL2 <i>in vivo</i> .....	52
5. Diskussion .....	57
5.1 Das E $\mu$ -myc-Tumormodell .....	57
5.2 Charakterisierung der E $\mu$ -myc-Lymphomzellen .....	60
5.3 Transduktion primärer, muriner E $\mu$ -myc-Lymphomzellen .....	62
5.4 Nachweis der PDL2-Funktion <i>in vitro</i> .....	64
5.5 Wachstumsdynamik und Krankheitsbild der E $\mu$ -myc-Tumoren.....	65
5.6 <i>In vivo</i> Funktion von PDL2 .....	65
5.7 Therapie und Ausblick.....	67
6. Zusammenfassung .....	70
7. Literaturverzeichnis .....	71
8. Danksagung .....	86
9. Lebenslauf .....	88
10. Publikationsliste .....	89
11. Selbstständigkeitserklärung.....	90

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle(n)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CD	Unterscheidungsgruppen ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
cHL	klassische Hodgkin-Lymphom
Cy5	Cyanin 5
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DGHO	deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell Lymphom ( <i>diffuse large b-cell lymphoma</i> )
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FLx-H	Intensität des Fluoreszenzkanals x ( <i>fluorescence channel x height</i> )
FSC-H	Intensität des Vorwärtsstreulichtes ( <i>forward scatter height</i> )
g	Gramm
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle ( <i>internal ribosomal entry site</i> )
Kap.	Kapitel

---

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute(n)
M	Mol pro Liter
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
NHL	Non-Hodgkin Lymphome
nt	Nukleotid
OD <sub>λ</sub>	Optische Dichte (Absorption) bei einer gegebenen Wellenlänge λ
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
Percp	Peridinin Chlorophyll
PD1	Rezeptor 1 für programmierten Zelltod ( <i>programmed death receptor 1</i> )
PDL1	Ligand 1 des Rezeptors für programmierten Zelltod ( <i>programmed death receptor ligand 1</i> )
PDL2	Ligand 2 des Rezeptors für programmierten Zelltod ( <i>programmed death receptor ligand 2</i> )
PMBL	primäres mediastinales B-Zell Lymphom
Rag	Rekombination aktivierendes Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SA	Streptavidin
s.c.	subkutan
SSC-H	Intensität des Seitwärtsstreulichtes ( <i>sideward scatter height</i> )
TGF-β	transformierender Wachstumsfaktor-β ( <i>transforming growth factor-β</i> )
T-TILs	Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten
Tris	Tris- (hydroxymethyl) -aminomethan
U	Einheit(en) ( <i>units</i> )
Upm	Umdrehungen pro Minute

UV	Ultraviolett
VT	Volumenteil
(v/v)	Volumenanteil am Gesamtvolumen
(w/v)	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
WT	Wildtyp

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 verwendete Mausstämme .....	27
Tab. 2 verwendete Bakterienstämme .....	27
Tab. 3 verwendete Zelllinien .....	27
Tab. 4 verwendete Expressionsplasmide .....	27
Tab. 5 verwendete Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs, Schwalbach .....	28
Tab. 6 verwendete Peptide .....	28
Tab. 7 verwendete Primärantikörper für FACS-Analysen .....	28
Tab. 8 Expressionsmuster verschiedener E $\mu$ -myc-Zellklone .....	42
Tab. 9 Chemokinrezeptorexpressionsprofil verschiedener E $\mu$ -myc-Zellklone .....	43
Tab. 10 Darstellung der Transferversuche mit untransduzierten E $\mu$ -myc-Klonen in Wildtyp-Mäusen .....	51
Tab. 11 Darstellung der Transferversuche mit transduzierten E $\mu$ -myc-Klonen in Wildtyp-Mäusen .....	52
Tab. 12 Anzahl der apoptotischen T-Zellen aus den Transferversuchen mit transduzierten E $\mu$ -myc-Klonen .....	56

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der Regulation der T-Zellaktivierung durch Moleküle der B7- und CD28-Familie (aus (60)) .....	17
Abb. 2 Schematische Darstellung eines Retrovirus .....	20
Abb. 3 Schematische Darstellung des Zellzyklus .....	24
Abb. 4 Zeitplan der Transduktion.....	39
Abb. 5 Durchflusszytometrische Analyse nach retroviraler Transduktion von primären, murinen E $\mu$ -myc-Lymphomzellen mit den Konstrukten pMSCV-2.2-IRES-GFP (pMSCV-mock) und pMSCV-2.2-IRES-GFP-PDL2 (pMSCV-PDL2) .....	45
Abb. 6 FACS-Analyse nach Sorten der GFP-positiven transduzierten primären, murinen E $\mu$ -myc-Zellen.....	47
Abb. 7 Durchflusszytometrische Analyse der E $\mu$ -myc-Lymphomzellen vor dem T-Zell-Proliferationsassay auf MHC-II-Expression .....	49
Abb. 8 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen des T-Zell-Proliferationsassay .....	50
Abb. 9 Durchflusszytometrische Analyse der inguinalen Lymphknoten aus einer mit transduzierten (pMSCV-mock bzw. pMSCV-PDL2) Lymphomzellen behandelten erkrankten Maus .....	53
Abb. 10 Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten aus dem inguinalen Lymphknoten einer mit pMSCV-PDL2-transduzierten Lymphomzellen behandelten Maus .....	55

# 1. Einleitung

## 1.1 Das primäre mediastinale B-Zell Lymphom

Das primäre mediastinale B-Zell Lymphom (PMBL) wurde erstmalig in den frühen 80er Jahren beschrieben (1) (2). Es wurde 1994 in die REAL-Klassifikation (*Revised European-American Classification of Lymphoid Tissues*) und 2001 in die WHO-Klassifikation (*World Health Organisation*) als Untergruppe der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome (DLBCLs) aufgenommen (3). Die DLBCLs zählen zu den Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) und sind in dieser Gruppe mit 30-40% der häufigste Subtyp. Das PMBL macht etwa 2% aller NHL und 6-13% der DLBCLs aus (4) (5).

### 1.1.1 Klinik

Das PMBL ist ein schnell und lokal invasiv wachsender, aggressiver Tumor des jungen Erwachsenen. Das Manifestationsalter liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Frauen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer. Der Tumor findet sich zumeist im anterioren Mediastinum. Durch Verdrängung und Invasion der umgebenden Strukturen wie den großen Gefäßen, der Lunge und dem Herzen kommt es zu ersten Symptomen. Eines der häufigsten ist das Vena-Cava-superior-Kompressionssyndrom, bei dem es durch Kompression der oberen Hohlvene zu einem Blutrückstau kommt, der sich durch Gesichtsschwellung und -rötung, sowie erweiterte Halsvenen bemerkbar machen kann. Weitere Symptome des PMBL sind Atemnot, Husten, Brustschmerzen und Schluckstörungen. Das Lymphom ist zu Beginn der Erkrankung auf den Thorax begrenzt, nach einem Rezidiv können Metastasen in der Niere, der Leber oder dem zentralen Nervensystem auftreten (6).

### 1.1.2 Pathobiologie

Histologisch weisen die PMBL-Tumorzellen eine mittlere bis große Zellgröße auf, die bis zum 20-fachen eines normalen Lymphozyten betragen kann. Das Zytoplasma ist klar und die Zellkerne sind häufig irregulär geformt. Die Zellen zeigen ein diffuses Wachstumsmuster. Im Tumorstroma sind meist Sklerosierungen unterschiedlicher Ausprägung nachweisbar (7).

Immunhistologische Untersuchungen konnten für das PMBL eindeutig einen B-Zell-Ursprung nachweisen. So exprimieren die Lymphomzellen B-Zelllinien-spezifische Oberflächenmoleküle wie zum Beispiel CD19, CD20 und CD22 (8).

Weiterhin konnten in PMBL-Zellen Immunglobulinen-Rearrangements und auf der Zelloberfläche das Immunglobulin-assoziierte Molekül CD79a nachgewiesen werden. In Diskrepanz hierzu steht eine geringe bis fehlende Expression von Immunglobulin (9). Dieser Gegensatz kann heute noch nicht erklärt werden (10) (11) (7). Es wird unter anderem vermutet, dass die Expression von Immunglobulin durch extrinsische Faktoren gehemmt wird. Für Interleukin-4 konnte eine solche hemmende Wirkung nachgewiesen werden (12). Neben diesen Entdeckungen konnte gezeigt werden, dass die PMBL-Zellen keine T-Zell-spezifischen Antigene exprimieren (8) (7).

Die mediastinale Lage des PMBL und das Vorhandensein von Thymusepithelstrukturen im Tumorgewebe führten zu der Hypothese, dass dieser B-Zell-Tumor thymischen Ursprungs ist (13). Dies war eine revolutionäre These, da der Thymus bis dato ausschließlich einen Ort der T-Zellreifung darstellte und somit dort keine B-Zellen vermutet wurden. Nur kurze Zeit später wurde diese Hypothese durch die Entdeckung thymischer Zellen mit B-Zell-Expressionsmuster verifiziert. Diese in der Medulla des Thymus gelegenen Zellen weisen ähnlich den PMBL-Zellen eine Expression von CD19, CD20 und CD22 sowie eine Immunglobulin-G-Defizienz auf (14) (15). Die Gemeinsamkeiten in Lage und Immunphänotyp unterstützen die Annahme, dass die thymischen B-Zellen die Ursprungszellen des Tumors sein könnten (7).

Betrachtet man die Ausstattung der PMBL-Zellen mit MHC-Molekülen, so ist häufig ein Defekt in der Expression von MHC-Klasse I und/oder MHC-Klasse II nachweisbar. Das Fehlen der MHC-Klasse-I-Moleküle ist möglicherweise auf die allgemein geringe  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Konzentration zurückzuführen, die im Serum von PMBL-Patienten nachgewiesen wurde (16) (17).

Einer der wichtigsten zytogenetischen Marker für das PMBL ist die Amplifikation der chromosomalen Region 9p. Das bis zu 75% der PMBL-Patienten dieses Merkmal aufweisen, wurde mit Hilfe von vergleichenden Genom-Hybridisierungs (CGH)- und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs (FISH)-Analysen gezeigt. Diese karyotypische Abnormalität wird selten in anderen DLBCLs gefunden (18) (19).

Interessanterweise ist das einzige Lymphom, welches ebenfalls diese Amplifikation aufweist, das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL) (20). Das cHL weist histologisch klare Unterschiede zum PMBL auf. Es zeigt in der Regel ein polymorphes, entzündliches Infiltrat, welches reich an Plasmazellen, Neutrophilen und Eosinophilen

ist (21). Ein solches entzündliches Infiltrat sieht man beim PMBL für gewöhnlich nicht (22) (23). Dennoch sind andere PMBL-spezifische Charakteristika im cHL wieder zu finden: a) die Erkrankung tritt bei jungen Patienten auf, b) der Tumor ist häufig im anterioren Mediastinum lokalisiert und das Tumorgewebe weist Sklerosierungen auf, c) auf den cHL-Zellen sind ebenfalls keine Immunglobuline nachweisbar (4).

Neben diesen Gemeinsamkeiten gibt es Patienten, die an Tumoren erkranken, die histologische Eigenschaften beider Tumorentitäten aufweisen. Da sie sich weder eindeutig dem PMBL noch dem cHL zuordnen lassen, werden sie als „graue Zonen“-Lymphome bezeichnet (24) (25). So wird über wenige cHL-Fälle berichtet, in denen sich nach einer Therapie ein PMBL entwickelte (26). All diese Überschneidungen lassen vermuten, dass das PMBL und das cHL pathogenetisch miteinander verwandt sind und eventuell einen gemeinsamen Zellursprung haben (27) (6).

Es wird deutlich, dass das PMBL ein charakteristisches klinisches und pathobiologisches Bild aufweist. Es gibt dennoch diagnostische Schwierigkeiten. Das größte Problem stellt die Abgrenzung des PMBL zu den anderen, histomorphologisch ähnlichen DLBCLs mit mediastinaler Lokalisation dar. Weiterhin sind auch die Grenzbereiche zwischen dem PMBL und dem cHL schlecht differenzierbar, worauf der Name „graue Zonen“-Lymphome hinweist (4). Da eine gute Diagnostik, sprich die frühe und eindeutige Identifizierung von PMBL-Patienten, die wichtigste Voraussetzung für eine Therapie ist, müssen bessere diagnostische Marker für das PMBL gefunden werden.

### **1.1.3 Therapie**

In Ermangelung spezifischer PMBL-Therapiemethoden wird das PMBL ähnlich anderer DLBCL-Subtypen chemotherapeutisch behandelt. Die derzeitige in der Literatur beschriebene und von der deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) empfohlene Standardtherapie besteht in der Applikation des CHOP-Regimes (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison), einem Standard-Dosis-Regime in Kombination mit dem seit 1997 zugelassenen, gegen CD20 gerichteten, monoklonalen Antikörper Rituximab (28). In der DLBCL-Therapie erweist sich der Einsatz von CHOP in Kombination mit Rituximab gegenüber einer alleinigen CHOP-Therapie als überlegen (29) (30). Ob Rituximab einen ähnlichen additiven Effekt in der PMBL-Therapie zeigt, ist noch unklar (4). Retrospektive Langzeitstudien deuten

darauf hin, dass intensivierete Dosis-Regime wie MACOP-B (Methotrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison, Bleomycin) oder VACOP-B (Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison, Bleomycin) im Vergleich zu CHOP besser wirken könnten (31) (32).

Die Chemotherapie wird häufig durch eine Radiotherapie des Mediastinums ergänzt. Sie schließt sich an eine Chemotherapie an, um noch verbliebene Tumorreste zu zerstören. Ihr Einsatz wird jedoch in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. In mehreren klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine routinemäßige Radiotherapie nach der Chemotherapie das Überleben der Patienten nicht verbessert (4) (33). Die aktuellen Leitlinien der DGHO empfehlen für das PMBL eine konsolidierende Strahlentherapie des Mediastinums im Anschluss an die Chemotherapie bei lokalem Tumorbefall (28).

Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die Hoch-Dosis-Chemotherapie mit anschließender autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation dar (6). Laut DGHO-Leitlinien ist sie bei einem Rezidiv die Therapie der Wahl.

Trotz aller Therapieoptionen versterben noch immer mehr als 30% der Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre an dieser Krankheit (34). Diese Anzahl verleiht dem erforderlichen Bemühen Nachdruck, effektivere Therapieverfahren zu finden. Ziel der Forschung ist es, spezifische Medikamente für die PMBL-Therapie zu entwickeln.

#### **1.1.4 Fortschritte durch Genexpressionsstudien**

In den letzten Jahren konnte mit Hilfe von Genexpressionsanalysen ein spezifisches Genexpressionsprofil für das PMBL ermittelt werden (34) (22). Die Daten der Genchipanalysen zeigen, dass sich das PMBL anhand seiner genetischen Eigenheiten eindeutig von anderen DLBCLs abgrenzen lässt. Von besonderer Relevanz ist ein Gen, das auf der chromosomalen Region 9p24 lokalisiert ist. Es weist von allen untersuchten Genen die höchste Spezifität auf und war im Durchschnitt in PMBL-Zellen 5,6-fach höher exprimiert als in anderen DLBCL-Zellen (34). Dieses Gen kodiert für das Molekül PDL2 (*programmed death receptor ligand 2*).

Die charakteristische Amplifikation der 9p-Region im PMBL scheint jedoch nicht allein die Ursache für die Überexpression von PDL2 zu sein, da auch in PMBL-Fällen ohne diese Amplifikation eine Überexpression zu beobachten ist. Demzufolge scheint zusätzlich eine erhöhte Transkription dieses Gens im PMBL vorzuliegen (34).

Auf der Grundlage der Genexpressionsstudien könnte das PDL2-Gen als diagnostischer Marker Eingang in die Therapie von Tumorpatienten finden. Außerdem ist das kodierte Protein von besonderem immunologischen Interesse, da es eine entscheidende Rolle in der Regulation der T-Zell-Aktivierung spielt (35) (36). Es könnte einen möglichen Angriffspunkt für PMBL-spezifische Therapien darstellen.

## **1.2 Die T-Zell Aktivierung und notwendige regulatorische Signale**

Reife, naive T-Lymphozyten verlassen nach Abschluss ihrer Entwicklung den Thymus und gelangen mit dem Blutstrom in periphere lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten (37) (38) (39) (40) (41). Um an einer Immunantwort teilnehmen zu können, müssen die naiven T-Zellen aktiviert werden. Diese Aktivierung wird durch die Interaktion von T-Zellen und professionellen Antigen-präsentierenden-Zellen (APZ), wie dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen, initiiert. Hierzu bindet die naive T-Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor an den spezifischen MHC-Peptid-Komplex auf der APZ. Dass diese Bindung allein nicht ausreichend ist, um eine T-Zelle zu aktivieren, sondern vielmehr zu einem Zustand der antigen-vermittelten funktionellen Inaktivität, auch Anergie genannt, führt, konnte 1987 erstmals gezeigt werden (42).

Vier Jahre später machte eine Reihe von Veröffentlichungen deutlich, dass zur Aktivierung der T-Zelle ein zweites, ko-stimulatorisches Signal notwendig ist. Dieses kritische ko-stimulatorische Signal resultiert aus der Bindung des CD28-Moleküls auf einer T-Zelle an die Liganden B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) auf einer APZ. Durch die Kostimulation wird die T-Zelle vollständig aktiviert, so dass sie nun ausreichend Interleukin-2 (IL-2) produzieren und in den Zell-Zyklus eintreten kann (43) (44). Die Anergie wird verhindert (45).

Mit dem zytotoxischen T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4) wurde ein zweiter T-Zell-ständiger Bindungspartner für B7-1 und B7-2 entdeckt, der im Gegensatz zu CD28 einen negativen Regulator der T-Zell-Aktivierung darstellt und somit ein inhibitorisches ko-stimulatorisches bzw. ko-inhibitorisches Signal liefert (46). Die Notwendigkeit einer regulierten Inhibition der T-Zell-Aktivierung wurde in einem Mausmodell deutlich. CTLA-4-defiziente Mäuse weisen eine massive lymphoproliferative Erkrankung auf, die innerhalb der ersten drei Lebenswochen letal ist (47).

Die T-Zell-Aktivierung ist somit von ko-stimulatorischen und ko-inhibitorischen Signalen abhängig, wobei das dominierende Signal ausschlaggebend ist (48).

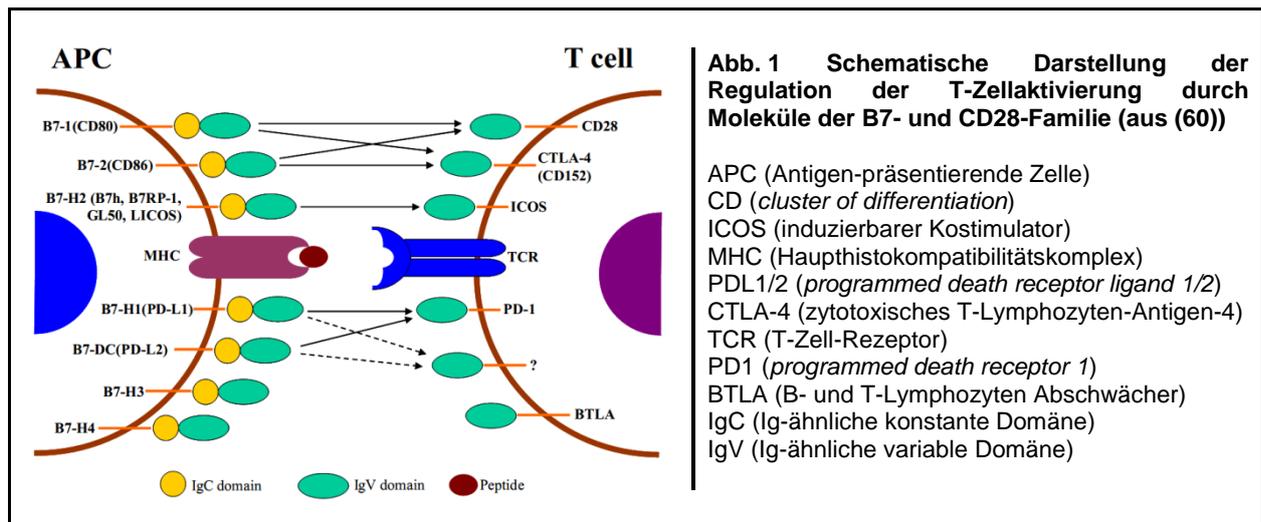
Die Entdeckung von Genen, die für Proteine mit struktureller Homologie zu CD28/CTLA-4 und B7-1/-2 kodieren, erweiterte das Konzept der T-Zellaktivierung in den letzten Jahren. So umfasst die CD28-Rezeptorfamilie inzwischen neben CD28 und CTLA-4 drei neu identifizierte Mitglieder: PD1 (*programmed death receptor 1*), ICOS (induzierbarer Kostimulator) und BTLA (B- und T-Lymphozyten-Abschwächer). Für alle konnte eine ko-stimulatorische bzw. ko-inhibitorische Funktion in der T-Zellaktivierung nachgewiesen werden.

Strukturell stellt die CD28-Rezeptorfamilie Typ-I-Transmembranproteine mit einer einzelnen extrazellulären IgV-Domäne (Ig-ähnliche variable Domäne) dar. Ihre Aminosäuresequenzhomologie beträgt 20-30%.

Neue Mitglieder der B7-Familie stellen B7-H1 (PDL1), B7-DC (PDL2), B7-H3, B7-H4 und B7-H2 (B7h, ICOS-Ligand, B7RP-1, GL50) dar (49) (50) (35) (36) (51) (52) (53) (54) (55) (56).

Auch die Mitglieder der B7-Familie sind Typ-I-Transmembranproteine. Sie alle sind charakterisiert durch ein amino-terminales Signalpeptid und einen zytoplasmatischen Schwanz. Ihre Sequenzidentität in den extrazellulären Domänen beträgt 20-30%. Sie besitzen neben einer IgV- zusätzlich noch eine extrazelluläre IgC-Domäne (Ig-ähnliche konstante Domäne), wobei die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand vorrangig über die IgV-Domänen vermittelt wird (57) (58).

Die Expression von Rezeptoren und Liganden wird fein reguliert. So wird zum Beispiel CD28 konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert, mit nur leicht ansteigender Expression infolge der T-Zellaktivierung, während CTLA-4 nicht auf naiven T-Zellen detektierbar ist. Nach der T-Zellaktivierung findet jedoch innerhalb von 24 bis 48 h eine rasche Hochregulation der CTLA-4-Expression statt (59). Das ermöglicht ein abgestimmtes Zusammenspiel zwischen Signalen, die zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Immunantwort führen (57).



### 1.3 PDL2 - ein neues Mitglied der B7-Familie

PDL2 wurde 2001 nach PDL1 (*programmed death receptor ligand 1*) als zweiter Ligand von PD1 identifiziert (35). Es ist ein Transmembranprotein vom Typ I mit einer Länge von 248 Aminosäuren. Sein kodierendes Gen ist in der chromosomalen Region 9p24 lokalisiert und weist eine Exon-Organisation auf, bestehend aus einer 5' untranslatierten Region, einer Signalsequenz, einer IgV-, einer IgC- und einer Transmembrandomäne, zwei zytoplasmatischen Exons und einer 3' untranslatierten Region. Murines und humanes PDL2 sind zu 70% identisch. PDL2 wird in der Plazenta hoch exprimiert. Eine niedrige Expression findet sich in Milz, Lymphknoten und Thymus (35). Auf Zellebene konnte eine PDL2-Expression hauptsächlich auf dendritischen Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden. Auf ruhenden oder aktivierten B- und T-Zellen ist es kaum nachweisbar (61).

PD1 ist bis heute der einzige identifizierte Rezeptor von PDL2 (58). Er wurde 1992 mit Hilfe der Subtraktions-Hybridisierungstechnik in Zelllinien nachgewiesen. In diesen Zelllinien wurde der programmierte Zelltod induziert, daher der Name „programmed death receptor 1“ (62).

PD1 ist ein Transmembranprotein vom Typ I mit einem Molekulargewicht von 50-55 kDa, welches in aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten induziert wird (63). Die zytoplasmatische Domäne von PD1 enthält ein ITSM-Motiv (Immuno-Rezeptor-Tyrosin-basiertes-schaltendes-Motiv), welches an der Rekrutierung zytoplasmatischer Phosphatasen beteiligt ist und die Grundlage für die inhibierende Funktion von PD1 bildet (64) (65). Das PD1-Gen liegt in der chromosomalen Region 2q37 (66) und ist

somit auf demselben Chromosom lokalisiert wie auch die Gene für CD28, CTLA-4 und ICOS (2q33) (67).

Einen ersten Hinweis auf die Funktion von PD1 brachte die Generierung von PD1-defizienten Mäusen. Die Tiere entwickelten ein lupus-ähnliches Syndrom mit Arthritis und Glomerulonephritis (68). Dies ließ vermuten, dass PD1 die Immunantwort negativ reguliert und Autoimmunität verhindert.

Durch weitere Erforschung von PD1 konnte der Rezeptor, ähnlich wie CTLA-4, eindeutig als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung identifiziert werden (65).

Bindet PDL2 an seinen Rezeptor PD1, so wird die T-Zell-Aktivierung inhibiert. Die Proliferation sowie die Zytokin-Produktion der T-Zellen wird vermindert bzw. bleibt aus (35). Im Kontrast dazu zeigen einige Studien, dass PDL2 die tumorspezifische T-Zellantwort verstärken kann. Interessanterweise konnte dieser Effekt auch in PD1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass diese Funktion auf einem PD1-unabhängigen Mechanismus basiert (69).

Noch lassen sich die kontroversen Beobachtungen, dass PDL2 sowohl positiver als auch negativer Regulator ist, nicht erklären. Es gibt Hinweise dafür, dass es neben PD1 noch einen anderen Rezeptor für PDL2 gibt (58). Außerdem wird angenommen, dass es einen bidirektionalen Signalweg in PDL2-exprimierenden Zellen gibt. So führt die Bindung von PDL2 auf DCs zur Stimulation der DC Funktionen (70) (71).

## **1.4 PDL2 und Tumorentstehung**

Der menschliche Körper, sowie nahezu alle Tiere sind zeitlebens auf Zellteilung angewiesen. Bei diesem Prozess kann es zu genetischen Veränderungen kommen, welche Ursache einer Tumorentstehung sein können.

Schon Paul Ehrlich nahm an, dass eine Tumorkontrolle durch das Immunsystem stattfindet, da Tumoren ansonsten wesentlich häufiger auftreten müssten (72). In den 50er Jahren wurde dieser Ansatz von Macfarlane Burnet und Lewis Thomas aufgenommen. Burnet nahm an, dass tumorspezifische Antigene eine effektive Immunantwort induzieren können, die Tumorzellen eliminiert (73). Thomas, von einem evolutionsbiologischen Standpunkt ausgehend, postulierte, dass komplexe, lang lebende Organismen einen Mechanismus besitzen müssen, der sie vor Tumorentstehung schützt und welcher ähnlich dem Vorgang der Allograft-Transplantatabstoßung abläuft (74). In den Folgejahren konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit syngenem Tumoren möglich ist. Diese

Experimente erbrachten den funktionellen Beweis für die Existenz von tumorspezifischen Antigenen (75) (76). Auf Grundlage dieser Hypothesen und Entdeckungen formulierte Burnet im Jahre 1970 die „Immunsurveillance“-Hypothese, welche besagt, dass bestimmte Wächterzellen das Körpergewebe ständig nach entarteten Zellen absuchen, um diese zu inaktivieren oder zu eliminieren (77).

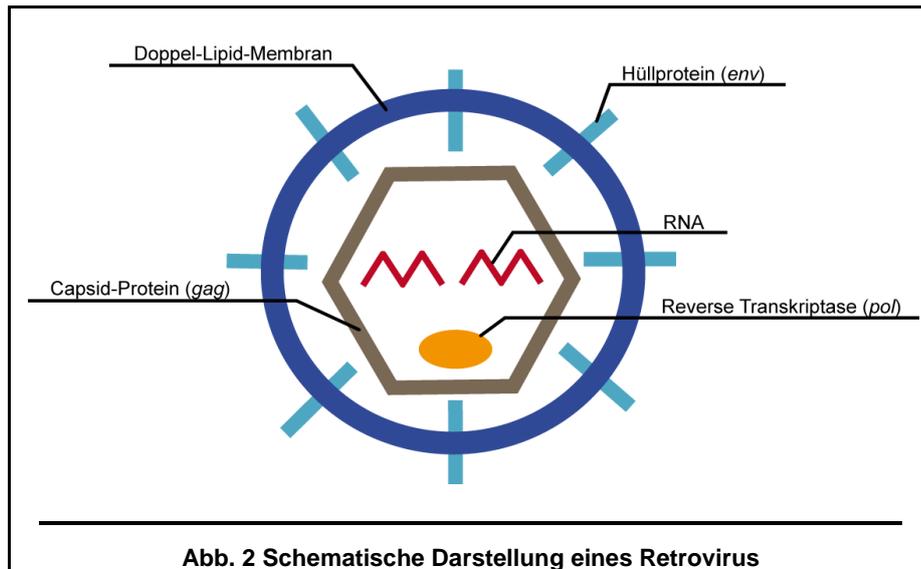
Tumorzellen werden meist erst klinisch relevant, wenn sie Mechanismen entwickeln um dem Immunsystem zu entfliehen, sogenannte „Tumor-Escape“-Mechanismen. Beispiele hierfür sind eine Herunterregulation der MHC-Klasse-I-Expression (78) (79), die Sekretion von immun-suppressiven Faktoren (z.B. TGF- $\beta$ ) (80), die Induktion von Toleranz durch Präsentation von Tumor-Antigenen (81) und das Fehlen der T-Zell-Kostimulation (82). Der negative regulatorische Effekt von PDL2 auf die T-Zellfunktion könnte einen Mechanismus darstellen, den Tumorzellen nutzen, um ko-stimulatorische Signale herunter zu regulieren. Auf diese Weise könnten sie der tumorspezifischen T-Zellantwort durch tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (T-TILs) entgehen. Es wäre weiterhin möglich, dass PDL2 Apoptose oder Zellzyklusarrest in T-TILs induziert.

Neben dem PMBL wird PDL2 auch auf anderen nicht-lymphatischen Tumoren exprimiert. Zu diesen Tumoren zählen das Ösophaguskarzinom (83), das Ovariakarzinom (84) und das Pankreaskarzinom (85). Das PMBL stellt im Vergleich zu diesen soliden Tumoren eine der ersten hämatopoetischen Neoplasien dar, für die eine Überexpression von PDL2 nachgewiesen werden konnte. Jedoch fehlt bis heute jeglicher funktioneller Nachweis.

## **1.5 Der Gentransfer mit Hilfe von Retroviren**

PDL2 scheint eine wichtige Rolle in der PMBL-Pathogenese zu spielen. Um seine Relevanz für die Genese dieser Erkrankung zu erforschen, wird eine experimentelle Methode benötigt, die die Veränderung von lymphoiden Zellen hinsichtlich der PDL2-Expression ermöglicht. Der Gentransfer mit Hilfe von Retroviren stellt eine geeignete Methode dar, um die PDL2-Expression lymphoider Zellen unter klar definierbaren Bedingungen zu beeinflussen.

Retroviren gehören zur Familie der RNA-Viren. Aufgrund ihrer geringen Größe von 80-140 nm wird ein einzelnes Retrovirus auch als Viruspartikel bezeichnet.



Das Viruspartikel zeigt einen typischen Aufbau (siehe Abb. 2). Es ist von einer Doppel-Lipid-Membran umgeben. In der Membran sind spezifische Hüllproteine verankert, die die Bindung an Rezeptoren auf der Zielzelle ermöglichen. Nach innen schließt sich das Capsid, eine Proteinhülle, an. Das Capsid enthält zwei Kopien des RNA-Genoms, welches als Positiv-Strang vorliegt.

Bindet sich das Viruspartikel über seine Hüllproteine an die Zielzelle, so verschmilzt die virale Membran mit der Membran der Zelle und das Capsid gelangt in das Zellinnere (86). Hier im Zytosol der Zelle schreibt die mitgeführte Reverse Transkriptase das RNA-Genom des Virus in eine DNA-Kopie um. Die DNA integriert sich nun ohne jegliche Sequenzspezifität in das Genom der Zielzelle. Diese integrierte Form des Retrovirus wird auch als Provirus bezeichnet. Die virale DNA muss zur Integration vom Zytosol in den Zellkern gelangen, also die Kernmembran überwinden. Dies ist der Grund dafür, dass bei vielen Retroviren nur dann eine erfolgreiche Integration stattfinden kann, wenn sich die Zielzelle in der Mitose, der Zellteilung, befindet. In dieser Phase des Zellzyklus wird die Kernmembran aufgelöst und neu gebildet, so dass sie für die virale DNA kein Hindernis darstellt.

Die virale DNA wird von der Zelle wie eigene DNA behandelt und somit bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Das Provirus nutzt die Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Zelle, um neue Kopien des retroviralen Genoms zu produzieren und die retroviralen Proteine zu bilden. Proteine und Genom setzen sich zu neuen infektiösen retroviralen Partikeln zusammen und verlassen die Zelle (87).

Das eingesetzte murine Retrovirus bindet ausschließlich an kationische Aminosäuretransporter, die auf Maus- und Rattenzellen, jedoch nicht auf humanen Zellen exprimiert werden (88). Viren, die diese Spezifität aufweisen, werden als ekotrop bezeichnet. Da ein funktioneller Kontakt zwischen Virus und humanen Zellen somit nicht möglich ist, besteht nicht die Gefahr der Gesundheitsschädigung durch Toxizität oder Kanzerogenität.

Das Virusgenom hat eine Größe von 7-12 kb und enthält hauptsächlich die 3 Gene gag, pol und env. Diese kodieren Enzyme, die für die reverse Transkription und Integration benötigt werden (pol), sowie Proteine, die das retrovirale Capsid (gag) und das glykosylierte Hüllenprotein (env) bilden. Weitere essentielle Elemente des Genoms stellen LTR- (*long terminal repeat*) Sequenzen an den Enden des integrierten Provirus sowie die  $\Psi$ -Sequenz am 5'-Ende von gag dar. Die LTRs enthalten Promotoren und Enhancer, die die Transkription des Provirus vorantreiben. Die  $\Psi$ -Sequenz ist dagegen ein Verpackungssignal, welches spezifisch von den retroviralen Proteinen erkannt wird. Sie vermittelt die Verpackung der Virus-RNA in ein neues Viruspartikel (87).

Um murine Retroviren für experimentelle Zwecke nutzbar zu machen, hat man die Gene gag, pol und env aus dem viralen Genom entfernt. Aufgrund des Fehlens der retroviralen Gene sind die Viren nicht mehr replikationskompetent. Anstelle der retroviralen Gene können nun andere Gene, sogenannte Zielgene, in das Genom kloniert werden. Diese veränderten murinen Retroviren werden als retrovirale Vektoren bezeichnet.

Zur Retrovirusproduktion wird die retrovirale-Vektor-DNA als Plasmid durch Transfektion in eine Verpackungszelllinie gebracht. Verpackungszellen sind durch eine stabile oder transiente Expression der retroviralen Gene gag, pol und env charakterisiert (87). Diese wurden zuvor in der Regel getrennt über Helferplasmide in die Verpackungszelllinie eingeführt, was die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination der viralen Gene reduziert (89). Die fehlenden Strukturgene des retroviralen Vektors werden also durch die Verpackungszelllinie bereitgestellt.

In der Verpackungszelle wird die retrovirale-Vektor-DNA transkribiert. Da das gebildete RNA-Transkript am 5'-Ende die retrovirale  $\Psi$ -Sequenz enthält, wird es spezifisch zu einem Retroviruspartikel verpackt, welches in den Zellkulturüberstand abgegeben wird.

Mit diesen Retroviren können anschließend Zielzellen transduziert werden. In ihnen kommt es zur Überexpression des Zielgens, jedoch nicht zur Bildung weiterer Viruspartikel aufgrund der fehlenden retroviralen Strukturgene.

Zur Identifikation retroviral transduzierter Zielzellen werden häufig bicistronische retrovirale Vektoren verwendet, die neben dem eigentlichen Zielgen zusätzlich ein Markergen enthalten. Das Markergen kann zum Beispiel ein Antibiotikum-Resistenzgen (90) oder ein Fluoreszenzprotein-kodierendes Gen (91) sein. Durch Einführung einer IRES-site (*internal ribosomal entry site*) zwischen dem Zielgen und dem Markergen ist es möglich, dass ein einzelnes RNA-Transkript mit beiden Genen gebildet wird, jedoch auf Translationsebene zwei getrennte Proteine produziert werden (92).

Retrovirale Vektoren stellen ein sehr effizientes Mittel dar, um in primären murinen Lymphozyten Zielgene, wie PDL2, zu überexprimieren.

## 1.6 Die Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde 1972 eingeführt, um eine Form des Zelltodes zu beschreiben (93). Die damalige Auffassung, dass es sich um einen Mechanismus handelt, der in Ausnahmesituationen eintritt und der Zerstörung von Zellen dient, also eine potentielle Gefahr für den Organismus darstellt, hat sich im Lauf der Jahre geändert. Die Apoptose wird heute als ein Teil der zellulären Homöostase des Immunsystems gesehen (94).

Der Prozess der Apoptose kann über verschiedene Wege eingeleitet werden. Es werden zwei Hauptwege unterschieden.

Der extrinsische Aktivierungsweg wird durch die Bindung von Todes-Rezeptoren an spezifische Liganden gestartet. Die Interaktion führt zur Apoptose in der rezeptortragenden Zelle.

Der intrinsische Aktivierungsweg wird durch Stimuli wie Ultraviolette Strahlung, chemotherapeutische Medikamente oder den Entzug von Wachstumsfaktoren aktiviert und führt zur Apoptose der betroffenen Zelle.

Beide Wege weisen eine gemeinsame Endstrecke auf. Sie münden in der Aktivierung von spezifischen Proteasen, den sogenannten Caspasen. Die aktivierten Caspasen leiten die Schädigung der Zelle ein, indem sie eine Reihe von wichtigen Zellproteinen

proteolytisch spalten. Sie aktivieren außerdem Endonukleasen, welche wiederum die DNA zerstückeln. Im Endeffekt stirbt die Zelle.

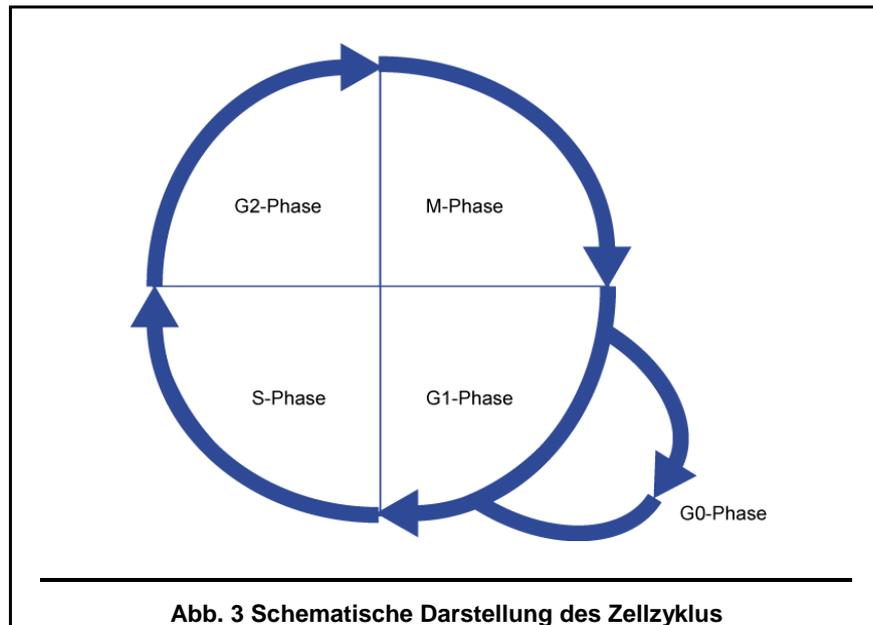
Die Apoptose ist in viele lebenswichtige Prozesse involviert. Eine wichtige Rolle spielt sie bei der Beendigung von Immunantworten. Infektionen rufen eine Aktivierung und damit verbundene massive Proliferation von T- und B-Zellen hervor. Die entstandenen Zellklone müssen nach Abwehr der Infektion eliminiert werden. Dies geschieht durch Apoptoseinduktion in einem Prozess der als Aktivierungs-induzierter-Zelltod (AICD) bezeichnet wird. Eine Fehlregulation dieses Vorgangs würde bei jeder Immunantwort zu einer ungehemmten Proliferation von Immunzellen führen (94). Eine weitere wichtige Aufgabe der Apoptose ist es, autoreaktive und funktionsunfähige Lymphozyten zu zerstören. Dieser Prozess findet im Thymus und im Knochenmark statt und wird als negative Selektion bezeichnet (95) (96). Bei Störungen im Ablauf der Apoptose und damit verbundenem Vorhandensein von autoreaktiven Lymphozyten kommt es zu Autoimmunerkrankungen, was im Mausmodell gezeigt wurde (97).

Apoptotische Zellen weisen morphologische Eigenheiten auf. Sie sind durch ein Schrumpfen der Zelle, kondensiertes Chromatin und Bläschenbildung der Zellmembran gekennzeichnet. Auf molekularer Ebene kommt es im frühen Stadium der Apoptose zu Veränderungen in der Zellmembran (94). Die Translokation des Phosphatidylserins von der Innenseite der Membran auf die Außenseite ist eine davon. Das exponierte Phosphatidylserin dient nun nicht nur Makrophagen als ein wichtiges Signal zur Phagozytose (98), es kann auch zur Identifizierung apoptotischer Zellen herangezogen werden. Annexin V ist ein phospholipidbindendes Protein, welches eine hohe Affinität und Spezifität gegenüber Phosphatidylserin aufweist (99).

Für PDL1 konnte eine Apoptoseinduktion in T-Zellen nachgewiesen werden (100). Ob PDL2 im Kontext des PMBL einen Einfluss auf die Apoptose hat, wurde noch nicht erforscht.

## **1.7 Der Zellzyklus**

Eine wichtige Grundlage menschlichen Lebens bildet die Eigenschaft eukaryonter Zellen sich teilen zu können. Die Neubildung von Gewebe, wie auch der Ersatz von gealterten Zellstrukturen wäre ohne Zellteilung nicht möglich. Der Zeitraum von einer Zellteilung bis zur nächsten wird als Zellzyklus bezeichnet und wird in einzelne, unterschiedlich lange Phasen unterteilt (siehe Abb. 3).



Die eigentliche Teilung der Zelle findet in der kurzen Mitose (M-Phase) statt. Der übrige, längere Teil des Zellzyklus wird als Interphase bezeichnet. Wichtigstes Ereignis in der Interphase ist die Verdopplung der DNA, welche sich in der S-Phase (Synthesephase) vollzieht. Die zwischen Mitose und S-Phase einerseits und zwischen S-Phase und nächster Mitose andererseits verbleibenden Perioden sind die G-Phasen G1 und G2. In der G1-Phase findet ein intensives Zellwachstum statt. Die G2-Phase dient der Vorbereitung der nachfolgenden Mitose.

Normalerweise erfolgt der Fortgang des Zellzyklus ohne Unterbrechungen. Nicht alle Zellen sind jedoch fortwährend zur Teilung bereit. Einige Zellen, beispielsweise ausdifferenzierte Gehirnzellen, bleiben zwar vital, teilen sich aber nicht mehr. Sie befinden sich in einer Ruheperiode, der G0-Phase, die auch als Zellzyklusarrest bezeichnet wird. Dennoch besteht unter gewissen Umständen die Möglichkeit des Wiedereintritts in den Zellzyklus.

Tumorzellen, die in der Lage wären in den Zellzyklus von T-TILs einzugreifen und so deren Vermehrung zu stoppen, hätten einen starken Wachstumsvorteil. Es konnte gezeigt werden, dass PDL2-exprimierende CHO- (*Chinese Hamster Ovary*) Zellen in der Lage sind PD1-exprimierende T-Zellen in den Zellzyklusarrest zu drängen (35). Ob PDL2-exprimierende PMBL-Zellen in den Zellzyklus von T-TILs eingreifen können, wurde noch nicht erforscht.

## 1.8 Lymphommodelle in der Maus

Um pathogenetische Mechanismen bei der Lymphomentstehung nachahmen zu können, wurden zahlreiche transgene Mausmodelle etabliert (101) (102) (103).

E $\mu$ -myc-transgene Mäuse sind für das Onkogen c-myc transgen und liegen im Inzuchtstamm C57Bl/6 vor. c-myc ist ein Transkriptionsfaktor, der in den meisten Zelltypen Zellwachstum und Proliferation stimuliert, terminale Differenzierung inhibiert und Zellen gegenüber Apoptosesignalen sensitiviert (104). In den E $\mu$ -myc-transgenen Mäusen wird c-myc konstitutiv in der B-Zellreihe überexprimiert. Diese Überexpression ist B-Zell-restringiert, da das c-myc Gen an den für B-Zellen charakteristischen Immunglobulin-schwere-Ketten-Enhancer E $\mu$  gekoppelt ist.

Die Mäuse entwickeln innerhalb einiger Monate nach der Geburt B-Zell-Lymphome, die mit relativ hoher Reinheit aus den Lymphknoten isoliert und *ex vivo* manipuliert werden können (105) (106). Somit stellt der E $\mu$ -myc-transgene Mausstamm ein Basismodell dar, um experimentell verschiedene genetische Faktoren der Lymphomentstehung weiter zu untersuchen.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Für das PMBL konnte mit Hilfe von Genchipsanalysen ein spezifisches Genexpressionsprofil ermittelt werden (34) (22). Hierbei wurde für das Molekül PDL2 eine stark erhöhte Expression nachgewiesen. Aufgrund seiner Relevanz für die T-Zell-Aktivierung ist PDL2 von besonderem immunologischen Interesse und steht im Mittelpunkt der vorliegenden Doktorarbeit.

Ziel der Arbeit ist es, Retroviren mit dem Zielgen PDL2 zur Transduktion von primären B-Lymphomzellen herzustellen. Diese retroviral modifizierten Lymphomzellen sollen dann *in vitro* und *in vivo* in Maus-Transfermodellen hinsichtlich ihres Einflusses auf Proliferation und Apoptose erforscht werden. Bei Verifizierung pathogenetischer Eigenschaften könnten die erarbeiteten Daten als Grundlage für die gezielte Entwicklung therapeutisch nutzbarer Inhibitoren dienen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden folgende Ziele gesetzt:

- Produktion von Retroviren mit Hilfe der Verpackungszelllinie Plat-E
- Etablierung der Transduktion von primären, murinen B-Lymphomzellen aus E $\mu$ -myc-transgenen Mäusen

- Nachweis der Transduktion mit Hilfe des GFP-Nachweises in der Durchflusszytometrie
- *in vitro* Untersuchungen zur immunmodulatorischen Funktion von PDL2
- *in vivo* Lymphommodell

## 2. Material

### 2.1 Mäuse

Tab. 1 verwendete Mausstämme

Mausstamm	Beschreibung
C57Bl/6 Wildtyp	
E $\mu$ -myc-Maus	transgene C57Bl/6-Maus mit dem Transgen c-myc, das an den Immunglobulin-schwere-Ketten-Enhancer E $\mu$ gekoppelt ist, IgH-myc (Jackson Labs)
OTII-Rag2 <sup>-/-</sup> -Maus	transgene C57Bl/6-Maus im Rag2 <sup>-/-</sup> ( <i>recombination activating gene</i> ) Hintergrund, deren CD4-T-Zellen einen ovalbuminpeptid-spezifischen T-Zell-Rezeptor tragen; durch die Rag2-Defizienz fehlen bis auf den CD4-Subtyp alle T- und B-Zellen

### 2.2 Bakterien

Tab. 2 verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1 blue (Stratagene)	supE44, hsdR17 recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lacF'[proAB+, lacIq, lacZ $\Delta$ M15, Tn10 (tetr)]

### 2.3 Zelllinien

Tab. 3 verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
NIH3T3	murine Fibroblasten-Zelllinie <sup>1</sup>
Plat-E	retrovirale Verpackungszelllinie, basierend auf der 293T-Zelllinie, die stabil mit den viralen Genen gag, pol und env transfiziert wurde. <sup>2</sup> 293T-Zellen stellen eine Variante von HEK293 – humane embryonale Nierenzellen – dar, die stabil mit dem SV-40 großen T-Antigen transfiziert wurden (107).

<sup>1+2</sup>Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wolfgang Uckert (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch)

### 2.4 Plasmide

Tab. 4 verwendete Expressionsplasmide

Expressionsplasmid	Beschreibung
pMSCV-2.2-IRES-GFP	retroviraler Leervektor („mock“), Ampicillinresistenz, Größe: 6500 bp
pMSCV-2.2-IRES-GFP-PDL2	murine PDL2-cDNA (744 bp) im retroviralen Vektor pMSCV-2.2-IRES-GFP

## 2.5 Restriktionsenzyme

Tab. 5 verwendete Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzym	5' → 3' Erkennungssequenz	spezifische Aktivität
Bgl II	A <sup>▼</sup> GATCT	10 U/μl
EcoR I	G <sup>▼</sup> AATTC	20 U/μl
Nco I	C <sup>▼</sup> CATGG	10 U/μl
Sal I	G <sup>▼</sup> TCGAC	20 U/μl

## 2.6 Molekulargewichtsstandards für DNA

1 kb DNA Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)

GeneRuler 1 kb DNA Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

## 2.7 Peptide

Tab. 6 verwendete Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Molekulargewicht
Ovalbuminpeptid (323-339)	ISQAVHAAHAEINEAGR	1773,93

## 2.8 Antikörper

### 2.8.1 Primärantikörper

Für durchflusszytometrische Analysen wurden folgende Primärantikörper in einer Verdünnung von 10 - 20 μg/ml bei  $1 \times 10^5$  -  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt:

Tab. 7 verwendete Primärantikörper für FACS-Analysen

Antikörper	Antigen	Spezies und Subtyp	Referenz
<b>Isotypkontrollen</b>			
IgG Biotin		Maus IgG, Isotypkontrolle, Biotin-konjugiert	CALTAG Laboratories
IgG2bk FITC		Maus IgG2bk, Isotypkontrolle, FITC-konjugiert	BD Biosciences
IgG2ak Biotin		Ratte IgG2ak, Isotypkontrolle, Biotin-konjugiert	BD Biosciences
IgG2a FITC		Ratte IgG 2a, Isotypkontrolle, FITC-konjugiert	CALTAG Laboratories
IgG APC		Armenischer Hamster IgG, Isotypkontrolle, APC-konjugiert	Biologend
<b>Hamster anti Maus</b>			
Anti-Maus CD3ε APC	CD3ε	Armenischer Hamster IgG, monoklonal, APC-konjugiert	Biologend
<b>Maus anti Maus</b>			
Anti-Maus I-Ab FITC	I-Ab	Maus IgG, monoklonal, FITC-konjugiert	BD Biosciences
Anti-Maus I-Ab PE	I-Ab	Maus IgG, monoklonal, PE-konjugiert	BD Biosciences
<b>Ratte anti Maus</b>			
Anti-Maus CD4 PE	CD4	Ratte IgG, monoklonal, PE-konjugiert	Biologend
Anti-Maus PD1 PE	PD1	Ratte IgG, monoklonal, PE-konjugiert	Biologend
Anti-Maus PDL1 PE	PDL1	Ratte IgG, monoklonal, PE-konjugiert	eBioscience
Anti-Maus PDL2 PE	PDL2	Ratte IgG, monoklonal, PE-konjugiert	eBioscience
Anti-Maus PDL2 Biotin	PDL2	Ratte IgG, monoklonal, Biotin-konjugiert	eBioscience

**Tab. 7 verwendete Primärantikörper für FACS-Analysen (Fortsetzung)**

Antikörper	Antigen	Spezies und Subtyp	Referenz
<b>Ratte anti Maus</b>			
Anti-Maus CXCR4 Biotin	CXCR4	Ratte IgG, monoklonal, Biotin-konjugiert	BD Biosciences
Anti-Maus CXCR5 PE	CXCR5	Ratte IgG, monoklonal, PE-konjugiert	BD Biosciences
Anti-Maus CCR7 PE	CCR7	Ratte IgG, monoklonal, PE-konjugiert	Abcam, England
Anti-Maus CCR7 APC	CCR7	Ratte IgG, monoklonal, APC-konjugiert	Biologend
Anti-Maus ICOS PE	ICOS	Ratte IgG, monoklonal, PE-konjugiert	BD Biosciences
Anti-Maus CD86 FITC	CD86	Ratte IgG, monoklonal, FITC-konjugiert	BD Biosciences
Anti-Maus B220 FITC	B220	Ratte IgG, monoklonal, FITC-konjugiert	BD Biosciences
Anti-Maus B220 APC	B220	Ratte IgG, monoklonal, APC-konjugiert	CALTAG Laboratories
Anti-Maus B220 Biotin	B220	Ratte IgG, monoklonal, Biotin-konjugiert	BD Biosciences

### 2.8.2 Streptavidinkonjugate

Für durchflusszytometrische Analysen wurden folgende Streptavidin- (SA) Konjugate in einer Verdünnung von 5 µg/ml bei  $1 \times 10^5$  -  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt:

SA-PE (Jackson Immunoresearch, Baltimore)

SA-Percp (Jackson Immunoresearch, Baltimore)

SA-APC (Jackson Immunoresearch, Baltimore)

SA-Cy5 (Jackson Immunoresearch, Baltimore)

SA-Alexa-488 (Invitrogen, Karlsruhe)

## 2.9 Medien

### 2.9.1 Bakterienkulturmedien

LB-Medium | 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O

LB-Agar | 1,5% (w/v) Agar-Agar in LB-Medium

Zur Herstellung von Selektionsmedien wurde das Medium mit Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration) versetzt.

## 2.9.2 Zellkulturmedien

DC-Medium	500 ml RPMI 1640 mit 4,5 g/l Glucose (PAA, Cölbe) 50 ml FKS (Cambrex, Belgien, inaktiviert für 20 min bei 55°C) 5 ml 200 mM L-Glutamin (PAA, Cölbe) 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ml; PAA) 500 µl 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco/BRL) GM-CSF, murin 20 ng/ml (PEPRO-TECH, UK) LPS 1 µg/ml (Sigma Aldrich)
NIH3T3-Medium	500 ml D-MEM mit 4,5 g/l Glukose (PAA, Cölbe) 50 ml FKS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml 200 mM L-Glutamin 5 ml 100 mM Natriumpyruvat
Plat-E-Medium	DMEM + 10% FKS inaktiviert + L-Glut 2 mM Zur Passagierung von Plat-E: + 1 µg/ml Puromycin + 10 µg/ml Blasticidin
Eµ-myc-Lymphomzellmedium	225 ml IMDM ohne L-Glutamin (PAA, Cölbe) 225 ml RPMI-1640 mit L-Glutamin 50 ml FKS 5 ml Penicillin/Streptomycin 10 ml 200 mM L-Glutamin 5 ml Na-Pyruvat 5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren 250 µl 50 mM β-Mercaptoethanol 50 U/ml IL-7 (PEPRO-TECH, UK)
Pulse-Medium	485 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin 10 ml FKS
Einfriermedium	90% FKS, 10% DMSO

## 2.10 Puffer

FACS-Puffer	0,5% BSA, 0,05% NaN <sub>3</sub> in PBS
Lysepuffer	8,29 g NH <sub>4</sub> Cl, 1g KHCO <sub>3</sub> , 37,2 mg EDTA, pH 7,3, ad 1000 ml
PBS (T)	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ad pH 7,2 (0,05% Tween-20)
TAE (50x)	2 M Tris, 5,71% (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA pH 8,0
TE	10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, HCl ad pH 8,0

## 2.11 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Agar-Agar (Roth, Karlsruhe)
- Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf)
- Ampicillin (Roth, Karlsruhe)
- APC BrdU Flow Kit (BD Biosciences)
- Beta-Mercaptoethanol (GIBCO/BRL)
- Blasticidin (Roth, Karlsruhe)
- Calciumchlorid (Fluka Chemie AG, Neu-Ulm)
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Roth, Karlsruhe)
- Essigsäure (Roth, Karlsruhe)
- Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)
- Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA (Roth, Karlsruhe)
- fötales Kälberserum, FKS (Cambrex Bio Science, Veviers, Belgien)
- Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, GM-CSF, murin (PEPRO-TECH, UK)
- Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe)
- HEPES (Roth, Karlsruhe)
- Hexadimethrinbromid, Polybren (Sigma Aldrich)
- Interleukin-7, IL-7, murin (PEPRO-TECH, UK)
- Isopropanol (Roth, Karlsruhe)
- JETstar 2.0 Plasmid Purification Midi/ Maxi Kit (Genomed, Bad Oeyenhausen)
- Kaliumhydroxyd, KOH (Merck, Darmstadt)
- Kaliumacetat (Sigma Aldrich)
- Kaliumchlorid (Roth, Karlsruhe)

- Kaliumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
- L-Glutamin (PAA, Cölbe),
- Lipopolysaccharid (Sigma Aldrich)
- Methanol (Roth, Karlsruhe)
- Natriumacetat (Roth, Karlsruhe)
- Natriumazid (Roth, Karlsruhe)
- Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)
- Natriumdesoxycholat (Roth, Karlsruhe)
- Natriumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
- Natriumhydroxid (Roth, Karlsruhe)
- Natriumpyruvat (GIBCO/BRL)
- Pepton (Roth, Karlsruhe)
- Penicillin/Streptomycin (PAA, Cölbe)
- Pipes (Roth, Karlsruhe)
- Puromycin (Roth, Karlsruhe)
- QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden)
- Rinderserumalbumin, BSA (Roth, Karlsruhe)
- Salzsäure (Roth, Karlsruhe)
- Tris (Roth, Karlsruhe)
- Trypsin (PAA, Cölbe)
- Tryptanblau (Sigma Aldrich)
- Tween-20 (Roth, Karlsruhe)

## **2.12 Geräte und sonstige Materialien**

- Bakterien-Schüttler (Buchner Laborservice)
- Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Glasflaschen, Glaspipetten (Schott)
- Blutbestrahlungsgerät OB29 ,Cs<sub>137</sub>-Quelle (STS GmbH Braunschweig)
- Brutschränke (Heraeus, Hanau)
- Deckgläser, Neubauer-Zählkammer (C. Roth)
- Durchflusszytometer FACSCalibur, FACSAria (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)
- Einfrierröhrchen 1 ml, 96-Loch Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden)
- Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRBE (Leica, Bensheim)
- Gelelektrophorese-Kammern (MWG Biotech)

- Kanülen (Braun AG)
- Microtom, Einbettkassetten (Microm Laborgeräte GmbH)
- Objektträger SuperFrostPlus (Menzel Gläser)
- Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Reinluftbank für die Zellkultur (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH)
- Zellkulturschalen und -flaschen, sterile 10 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen (TPP)
- Zentrifugen (Beckman Instruments GmbH, Heidelberg; Heraeus, Hanau)

### **2.13 Software**

- Axiovision 2.0.5 (Carl Zeiss Vision GmbH)
- FlowJo (Tree Star, Inc.)
- GraphPad Prism 2.00 (GraphPad-Software Inc.)

## 3. Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Bakterienkulturen auf Agarplatten

Für die Plattenkulturen wurde das LB-Medium zusammen mit 15 g/l Agar-Agar autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C wurde Ampicillin 100 µg/ml zugegeben und die Flüssigkeit in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren erfolgte die Lagerung bei 4°C.

#### 3.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* XL1-blue-Zellen erfolgte nach dem Hitzeschock-Verfahren. Hierfür wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 0,5 - 1 µg DNA gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 45 s bei 42°C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Etwa 100 µl dieser Zellsuspension wurden anschließend auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit Ampicillin 100 µg/ml ausplattiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Im Anschluss konnten Einzelkolonien von der Platte isoliert werden.

#### 3.1.3 Flüssigkulturen

Zur Herstellung von Flüssigkulturen für die DNA-Maxi-Präparationen (siehe Kap. 3.1.5) wurde das mit Ampicillin versetzte LB-Medium mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur steril angeimpft und über Nacht bei 37°C im Warmluft-Rundschüttler geschwenkt.

#### 3.1.4 Lagerung und Reaktivierung von Bakterienkulturen

Um Dauerkulturen von *E. coli* anzulegen, wurden 0,7 ml Flüssigkultur mit 0,3 ml sterilem 50%igen Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert. Zur Reaktivierung des Bakterienwachstums wurden 200 µl der gefrorenen Glycerinkultur zum Animpfen einer 200 ml Flüssigkultur verwendet.

#### 3.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus der über Nacht inkubierten Flüssigkultur wurden Maxi- (200 ml) Präparationen angefertigt. Die Maxi-Präparationen wurden mit Hilfe des

JETstar Plasmid Purification Midi/Maxi Kits von Genomed gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Der Aufschluss der Bakterien erfolgt hierbei durch alkalische Lyse, die Separation der Plasmid-DNA nach dem Prinzip der Anionenaustauscherchromatographie.

Der gewonnene plasmid-haltige Überstand wurde mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt und das Präzipitat 30 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich in 100 - 300 µl entionisiertem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.1.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheitsgrad von Nukleinsäuren wurden UV-spektrometrisch bestimmt. Es wurde die Absorption der nukleinsäurehaltigen Lösung gegen die Absorption des Lösungsmittels H<sub>2</sub>O bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Die Konzentration in µg/ml ergab sich wie folgt:

$$c [\mu\text{g} / \text{ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

(c = Konzentration; OD<sub>260</sub> = optische Dichte bei 260 nm; V = Verdünnungsfaktor; F = Multiplikationsfaktor)

F (doppelsträngige DNA) = 50 µg/ml

F (RNA) = 40 µg/ml

F (einzelnsträngige DNA) = 37 µg/ml

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde das Verhältnis aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren) gebildet. Ein Verhältnis von 1,8 bis 1,9 entspricht einem hohen Reinheitsgrad der doppelsträngigen DNA.

### 3.1.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung der Plasmid-DNA erfolgte mittels Restriktionsverdau. Es wurden 0,3 µg DNA, 2 µl Puffer, 0,5 µl pro Endonuklease, optional BSA und H<sub>2</sub>O ad 20 µl zusammengegeben und für 1 bis 2 h bei 37°C inkubiert. Die DNA des Restriktionsverdauansatzes wurde abschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

### 3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuresträngen nach ihrer Größe wurde mit 1%igen (w/v) Agarose-Gelen durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Das Gemisch härtete dann bei Raumtemperatur in einer Gelkammer mit

Kamm aus. Anschließend wurde die Gelkammer mit TAE-Puffer aufgefüllt und die aus dem Restriktionsverdau gewonnenen DNA-Proben wurden mit 5 µl Orange G versetzt und in die Geltaschen geladen. Orange G ist ein Azofarbstoff, der Nukleinsäuren anfärbt und so den Lauf der DNA-Banden sichtbar macht. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurde ein 1 kb Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung je nach Gelgröße bei 80-200 V. Das Trennergebnis wurde schließlich unter UV-Licht (254-366 nm) fotografiert.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Säugerzellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die für die verschiedenen Zelltypen verwendeten Medien sind in Kap. 2.9.2 beschrieben. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 1:3 bis 1:20 passagiert. Adhärente Zellen wurden hierfür mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C vom Boden abgelöst und ein Mal mit PBS gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Zur Kryokonservierung wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Im Anschluss wurden Sie für 24 h bei -80°C in einer Styroporbox gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Bei Bedarf wurden die in Stickstoff konservierten Zellen bei 37°C aufgetaut, ein Mal mit Medium gewaschen und ausgesät.

### 3.2.2 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt (108). Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und alle vier Großquadrate der Kammer (je 16 Kleinquadrate) unter einem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$\frac{\text{ermittelte Zellzahl}}{4 \times 10^4} = \text{Zellzahl/ml}$$

### 3.2.3 Durchflusszytometrie und FACS

Die Durchflusszytometrie dient dem Nachweis von extra- und intrazellulären Zellbestandteilen. Einzelzellen können so innerhalb einer Zellsuspension charakterisiert werden. Mit Hilfe eines Zellsorters können die Zellen physisch in Zellfraktionen getrennt werden. Das um einen Zellsorter erweiterte Durchflusszytometer wird als FACS (*fluorescent activated cell sorting*) bezeichnet.

Die Vorbereitung der Zellen wurde in 96-Napf-Rundboden-Mikrotiter-Platten durchgeführt. Pro Färbeansatz wurden  $1 \times 10^5$  -  $5 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu\text{l}$  eiskaltem FACS-Puffer aufgenommen und in einen Napf überführt. Im Anschluss folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Rattenserum für 20 min auf Eis. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1200 Upm, RT), ein Mal mit FACS-Puffer gewaschen und mit 100  $\mu\text{l}$  antigenspezifischem Primärantikörper, in einer Verdünnung von 10 - 20  $\mu\text{g/ml}$ , versetzt. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis im Dunkeln. War der Primärantikörper direkt mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (FITC, PE, APC, Alexa oder Cy5), wurden die Zellen nun drei Mal gewaschen und in 250  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen. Bei nicht Fluoreszenz-markierten bzw. bei Biotin-konjugierten Primärantikörpern wurden die Zellen nach der ersten Färbung zwei Mal gewaschen und mit 100  $\mu\text{l}$  Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper (anti-Immunglobulin, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. mit einem Streptavidin-Konjugat (5  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen drei Mal gewaschen und in 250  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg). Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Cell Quest von BD Biosciences oder FlowJo von Tree Star, Inc. ausgewertet.

### 3.2.4 Gewinnung retroviraler Überstände

#### 3.2.4.1 *Transiente Ein-Plasmid-Transfektion zur Retrovirus-Produktion*

Ekotrope Retroviren wurden mit Hilfe der retroviralen Verpackungszelllinie Plat-E hergestellt. Am Tag 0 wurden  $8 \times 10^5$  Plat-E-Zellen pro Napf einer 6-Napf-Zellkulturplatte ausgesät und bei 37°C für ungefähr 24 h kultiviert. Die Zellen wurden dann mit den retroviralen Vektorkonstrukten transient nach der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Hierfür wurden pro Napf 18 µg Plasmid-DNA mit 15 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und sterilem H<sub>2</sub>O ad 150 µl vermischt und tropfenweise mit 150 µl Transferpuffer unter ständigem Mischen versetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz erneut kurz durchgemischt und das gesamte Präzipitat tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter kultiviert. Nach 48 und 72 h wurden die virus-enhaltenden Überstände abgenommen, über einen 0,45 µm Filter gegeben und als 1 ml-Aliquots bei -80°C eingefroren.

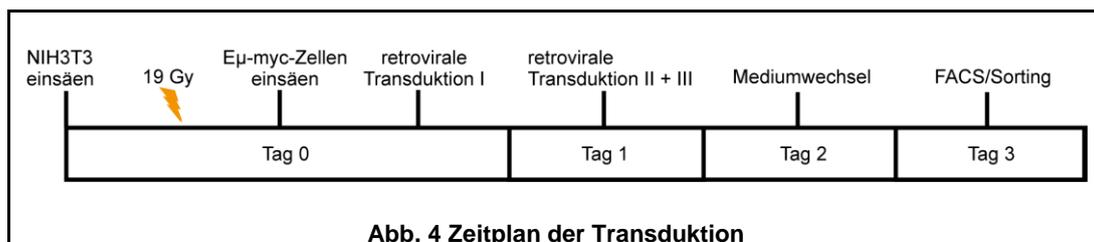
#### 3.2.4.2 *Bestimmung des Retrovirus-Titers*

Zur Bestimmung des Retrovirus-Titers wurden NIH3T3-Zellen als Indikatorzellen genutzt.  $4 \times 10^4$  Zellen in 1 ml NIH3T3-Medium wurden pro Napf einer 24-Napf-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 h wurden 0,25 ml bzw. 0,5 ml Virus-Überstand und Medium ad 2 ml hinzugegeben, so dass eine 1:8 bzw. eine 1:4 Verdünnung resultierte. Den Ansätzen wurde zusätzlich 4 µg/ml Polybren zugesetzt. Polybren ist ein Polykation, das den Bindungsvorgang von Viruspartikeln an die Zielzellen unterstützt und somit die Transduktion verbessert (109). Die Transduktion der Indikatorzellen erfolgte für 48 h bei 37°C. Bei der Transduktion überträgt das Retrovirus die GFP-Information auf die Zelle. Die mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse bestimmte Anzahl GFP-positiver, infizierter NIH3T3-Zellen dient als Maß für den Retrovirus-Titer.

### 3.2.5 Transduktion von primären murinen Eµ-myc-Lymphomzellen

Am Tag 0 wurden jeweils  $2,5 \times 10^5$  NIH3T3-Zellen pro Napf einer 6-Napf-Zellkulturplatte in NIH3T3-Medium eingesät. Nach 4 h folgte eine Bestrahlung mit 18,76 Gy Cs<sub>137</sub> (γ-Strahlung), um die Proliferation der Zellen zu inhibieren. In Stickstoff eingefrorene Eµ-myc-Lymphomzellen wurden bei 37°C aufgetaut, in 10 ml Eµ-myc-Lymphomzellmedium aufgenommen und abzentrifugiert (1200 Upm, 8 min, RT). Die Anzahl lebender Zellen wurde mit Hilfe der Neubauerkammer unter Zusatz von

Tryptanblau bestimmt. Das NIH3T3-Medium wurde abgesaugt und anschließend  $1 \times 10^6$  lebende Lymphomzellen pro Napf in 1 ml E $\mu$ -myc-Lymphomzellmedium auf die NIH3T3-Zellen gegeben. Dem Medium wurden 50 U/ml IL-7 zugesetzt, um die Proliferation der Lymphomzellen zu stimulieren. Im Anschluss wurden 1 ml retroviraler Überstand und 8  $\mu$ g/ml Polybren pro Napf hinzugefügt und die Zellkulturplatte zentrifugiert (2500 Upm, 30 min, 32°C). Am Tag 1 wurden im Abstand von 6 h zwei weitere Transduktionen durchgeführt. Es wurden jeweils 1 ml E $\mu$ -myc-Lymphomzellmedium, 1 ml retroviraler Überstand, 50 U/ml IL-7, und 8  $\mu$ g/ml Polybren pro Napf hinzugefügt. Die Kulturplatte wurde im Anschluss zentrifugiert (2500 Upm, 30 min, 32°C). 15 - 20 h nach der letzten Transduktion wurde 1 ml Medium pro Napf abgenommen und 4 ml frisches Medium hinzugegeben. Am Tag 3, etwa 48 h nach der dritten Transduktion, wurden die Zellen im FACS analysiert und gesortet (siehe Kap. 3.2.3).



### 3.2.6 T-Zell-Proliferationsassay

Der Einfluss von transduzierten Lymphomzellen auf die Zellteilung von T-Zellen wurde mit Hilfe des T-Zell-Proliferationsassays bestimmt.

Transduzierte Lymphomzellen wurden gesortet, abzentrifugiert (1000 Upm, 8 min, RT) und das Zellpellet in 10 ml Pulse-Medium (siehe Kap. 2.9.2) aufgenommen und Ovalbuminpeptid (OVA-Peptid) 5 µg/ml hinzugefügt. Die Zellen wurden dann in 6 cm Kulturschalen bei 37°C für 5 h inkubiert und im Anschluss abzentrifugiert (1000 Upm, 8 min, RT) und in Lymphommedium aufgenommen. Während der Inkubation, wird das OVA-Peptid im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekül I-A<sup>b</sup> auf der Oberfläche der Lymphomzellen präsentiert. Dieser Schritt wird auch als „pulsen“ oder „beladen“ bezeichnet.

Noch während der Inkubation wurde eine OTII-Rag2<sup>-/-</sup>-Maus abgetötet und die Milz steril entnommen. Die Milzzellen wurden mit einem Spritzenstempel in eiskaltem PBS vereinzelt, über einen 100 µm Filter gegeben und zentrifugiert (1000 Upm, 8 min, RT). Die Zellen wurden anschließend 5 min bei RT in 5 ml Lysepuffer inkubiert. Durch diesen auf osmotischer Lyse basierenden Schritt werden die Erythrozyten zum Platzen gebracht. Der Lyseprozess wurde durch Zugabe von 5 ml PBS gestoppt und die Zellen abzentrifugiert (1000 Upm, 8 min, RT).

Es folgte die Bestimmung der lebenden Zellen in der Neubauerkammer unter Zusatz von Trypanblau.  $3 \times 10^4$  transduzierte und beladene Lymphomzellen und  $1 \times 10^5$  OTII-Rag2<sup>-/-</sup>-Milzzellen wurden pro Napf einer 96-Napf-Rundboden-Zellkulturplatte in 250 µl Lymphommedium pipettiert. BrdU wurde in einer Konzentration von 10 µM hinzugegeben. Die Zellkulturplatte wurde zentrifugiert (1000 Upm, 2 min, RT) und für 48 h bei 37°C inkubiert.

Die mit dem OVA-Peptid beladenen Lymphomzellen sind in der Lage OVA-peptid-spezifische CD4-T-Zellen aus OTII-Rag2<sup>-/-</sup>-Mäusen zu aktivieren, die daraufhin in die Zellteilung eintreten. BrdU wird als synthetisches Thymidin-Analogon in sich teilende Zellen eingebaut. Anhand der Menge an inkorporiertem BrdU können Aussagen über die Zellteilungsrate getroffen werden. In Kombination mit einem DNA-bindenden Farbstoff wie 7AAD ist eine Zellzyklusanalyse möglich. Zur Messung wurde das APC BrdU Flow Kit der Firma BD Pharmingen gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

### **3.3 Tierexperimente**

#### **3.3.1 Tiere und Haltungsbedingungen**

Weibliche und männliche Mäuse im genetischen Hintergrund von C57BL/6 wurden unter spezifischen pathogen-freien Bedingungen gehalten. Alle Tierversuche wurden am 16.02.2006 in einem Verlängerungsantrag des TVV G0371/05 bewilligt und gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

#### **3.3.2 Injektion der Lymphomzellen**

Die Lymphomzellen wurden ein bis drei Mal in eiskaltem PBS gewaschen (1000 Upm, 8 min, 4°C), anschließend die Anzahl lebender Zellen bestimmt. Im Anschluss wurde die gewünschte Zellkonzentration in PBS eingestellt. Mit Hilfe einer Einmalspritze wurden pro Maus 100 µl Zellsuspension in die Schwanzvene injiziert.

#### **3.3.3 Beurteilung des Krankheitsstadiums**

Alle ein bis zwei Tage wurden die Tiere im Tierstall untersucht und die Lymphknoten jedes Tieres auf Vergrößerung abgetastet. Eine tastbare Größenzunahme wurde als Krankheitsbeginn gewertet. Weitere Krankheitsparameter, die ebenfalls erfasst wurden, waren struppiges Fell, abdominale Schwellung, Lähmungserscheinungen, Diarrhö sowie dauerhaftes Kauern der Tiere.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Gewinnung retroviraler Überstände

Die Gewinnung ekotroper Retroviren erfolgte durch transiente Transfektion von Plat-E Zellen unter Verwendung der Calcium-Phosphat-Methode. Es wurden das retrovirale Konstrukt pMSCV-2.2-IRES-GFP-PDL2 (pMSCV-PDL2) und als mock-Kontrolle pMSCV-2.2-IRES-GFP (pMSCV-mock) eingesetzt. 48 und 72 h nach Transfektion wurde ein Teil der Überstände zur Bestimmung des Virustiters 1:8 und 1:4 in Medium verdünnt und auf NIH3T3-Zellen als Indikatorzellen gegeben. Der restliche retrovirale Überstand wurde bei -80°C eingefroren. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde die Anzahl GFP-exprimierender Zellen als Maß für den Virustiter mit dem FACS bestimmt. Für pMSCV-PDL2 lagen die maximalen Transduktionsraten bei 77% und für pMSCV-mock bei 83%.

### 4.2 Gewinnung und Charakterisierung von E $\mu$ -myc-Lymphomzellen

Als Zielzellen für die retrovirale Transduktion wurden primäre E $\mu$ -myc-B-Lymphomzellen aus transgenen E $\mu$ -myc-Mäusen eingesetzt. Diese wurden aus den Lymphknoten tumortragender Mäuse isoliert, in Gefriermedium aufgenommen und in flüssigem Stickstoff konserviert. Um zu überprüfen, ob diese E $\mu$ -myc-Zellklone bereits endogen PDL2 exprimieren und die gewählte Strategie der Überexpression von PDL2 überhaupt sinnvoll ist, wurden die Zellen mittels FACS analysiert. Zur Charakterisierung der Lymphomzellen wurde außerdem die Oberflächenexpression des ko-inhibitorischen B7-Moleküls PDL1, des B-Zellmarkers B220 sowie des MHC-Klasse-II-Moleküls I-A<sup>b</sup> untersucht. Die Ergebnisse dieser FACS-Analysen sind in Tab. 8 zusammengefasst.

**Tab. 8 Expressionsmuster verschiedener E $\mu$ -myc-Zellklone**

E $\mu$ -myc-Klon	B7-Molekül		MHC-II-Molekül	B-Zellmarker
	PDL1	PDL2	I-A <sup>b</sup>	B220
1	+++	+	n.d.	n.d.
2	+++	+	n.d.	n.d.
3	++	+	n.d.	n.d.
4	++	+	n.d.	+++
5	+++	+	+++	+++
6	+++	+	n.d.	+++
7	++	+	n.d.	n.d.
8	+	+	++	+++
9	+	+	+++	+++

- keine Expression (E.)    + niedrige E.    ++ mittlere E.    +++ hohe E.    n.d. nicht durchgeführt

Alle analysierten Lymphomzellen wiesen eine niedrige PDL2-Expression auf. Für PDL1 konnten niedrige, mittlere und hohe Expressionen gemessen werden. Das MHC-Klasse-II-Molekül I-A<sup>b</sup> war auf den getesteten Lymphomzellen mittel bis hoch und der B-Zellmarker B220 hoch exprimiert.

Weiterhin wurden die Lymphomzellen einzelner E $\mu$ -myc Zellklone auf die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7 untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 dargestellt.

**Tab. 9 Chemokinrezeptorexpressionsprofil verschiedener E $\mu$ -myc-Zellklone**

E $\mu$ -myc-Klon	Chemokinrezeptor		
	CXCR4	CXCR5	CCR7
10	+++	-	++
11	+++	-	+
12	+++	-	+++
13	+++	+	++
14	+++	-	+++
15	+++	-	++

- keine Expression    + niedrige E.    ++ mittlere E.    +++ hohe E.

Das Chemokinrezeptorexpressionsprofil zeigte für CXCR4 eine hohe und CXCR5 eine überwiegend negative Expression. CCR7 wurde durchgehend auf der Zelloberfläche der Lymphomzellen exprimiert, allerdings variierten die Expressionslevel zwischen mittel und hoch von Tier zu Tier.

Für die folgenden Transduktionsexperimente wurden ausschließlich E $\mu$ -myc-Zellklone eingesetzt, deren Lymphomzellen zu weniger als 15% eine endogene PDL2-Expression aufwiesen.

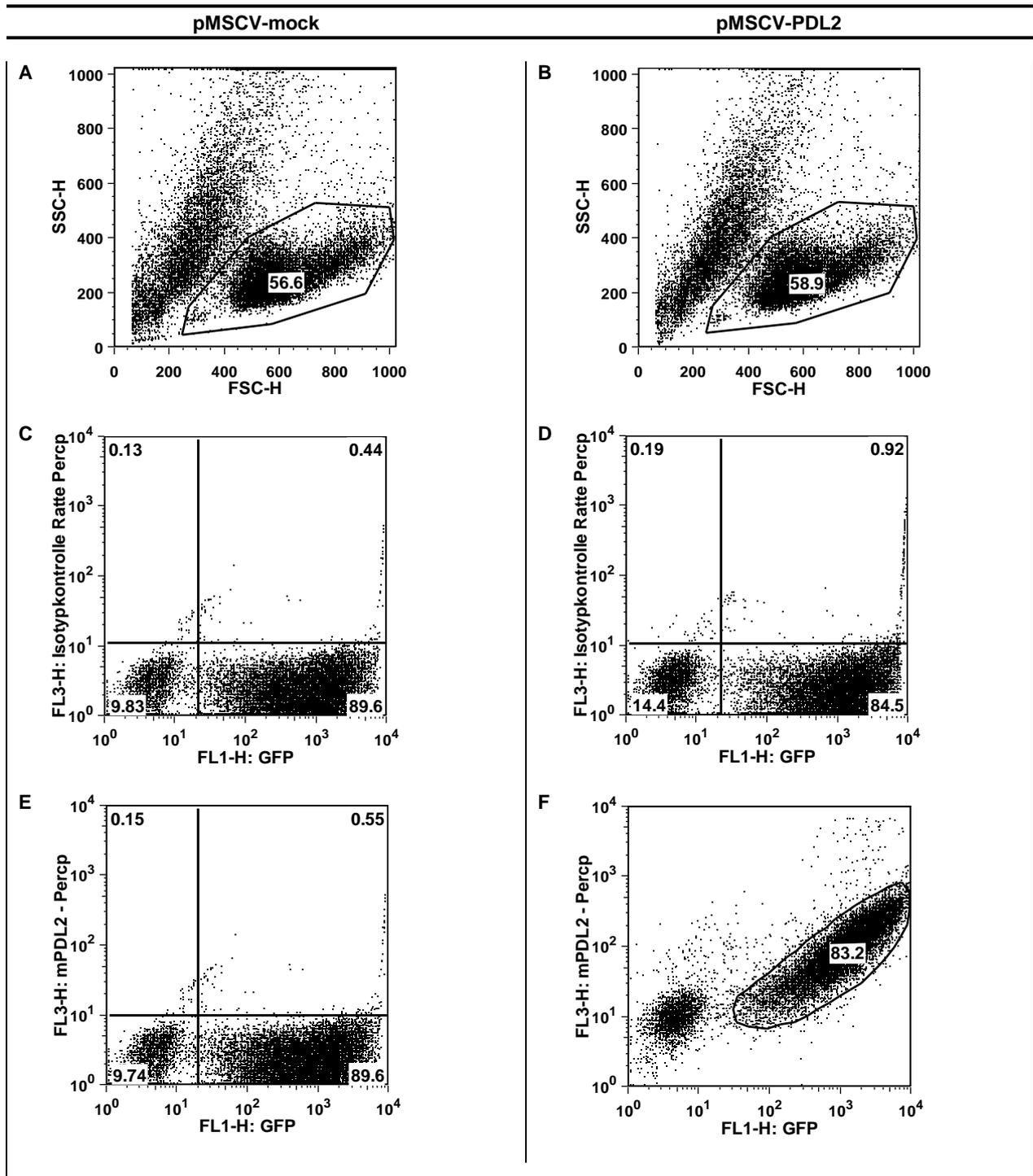
### 4.3 Transduktion primärer, muriner E $\mu$ -myc-Lymphomzellen

Die gewonnenen retroviralen Überstände für das pMSCV-mock- und das pMSCV-PDL2-Konstrukt wurden zur Transduktion der Lymphomzellen eingesetzt. Das Transduktionsprotokoll ist in Kap. 3.2.5 beschrieben. Werden E $\mu$ -myc-Lymphomzellen kultiviert, so wird ein Großteil der Zellen innerhalb der ersten 24 bis 48 h apoptotisch. Um die Kultivierungsbedingungen zu verbessern wurden NIH3T3-Zellen als „Fütterungs“-Zellen für die Lymphomzellen genutzt. Die durch  $\gamma$ -Strahlung proliferationsinaktivierten NIH3T3-Zellen lieferten den Lymphomzellen überlebenswichtige Zytokine und Zell-Zell-Kontakte. Weiterhin wurde der hämatopoetisch wirksame Wachstumsfaktor IL-7 hinzugefügt und ein spezielles B-Zell-Medium (IMDM) verwendet.

Zentrifugationsschritte und der Zusatz des Polykations Polybren erhöhten den Kontakt zwischen Viruspartikeln und Lymphomzellen.

Es zeigte sich, dass die Transduktionseffektivität wesentlich vom Virustiter des Überstandes und vom Transduktionsprotokoll abhängig war. Maßgeblich für die Optimierung des Protokolls waren die Steigerung der Zentrifugationsgeschwindigkeit und -dauer, der Einsatz von mehr retroviralem Überstand sowie die Reduzierung der Anzahl der zu transduzierenden Zellen. Es wurden drei Transduktionsschritte durchgeführt. 48 h nach der letzten Transduktion wurde mittels einer durchflusszytometrischen Analyse die Anzahl infizierter, GFP-positiver Lymphomzellen sowie deren spezifische PDL2-Expression ermittelt (siehe Abb. 5).

Lagen die Transduktionseffizienzen für beide Konstrukte anfänglich noch unter 30%, so konnten nach Optimierung des Protokolls für pMSCV-mock 90% GFP-positiver Zellen erzielt werden, für das pMSCV-PDL2-Konstrukt waren es 85%. Die Anzahl PDL2-exprimierender Zellen korrelierte hierbei eng mit der Anzahl GFP-positiver Zellen.

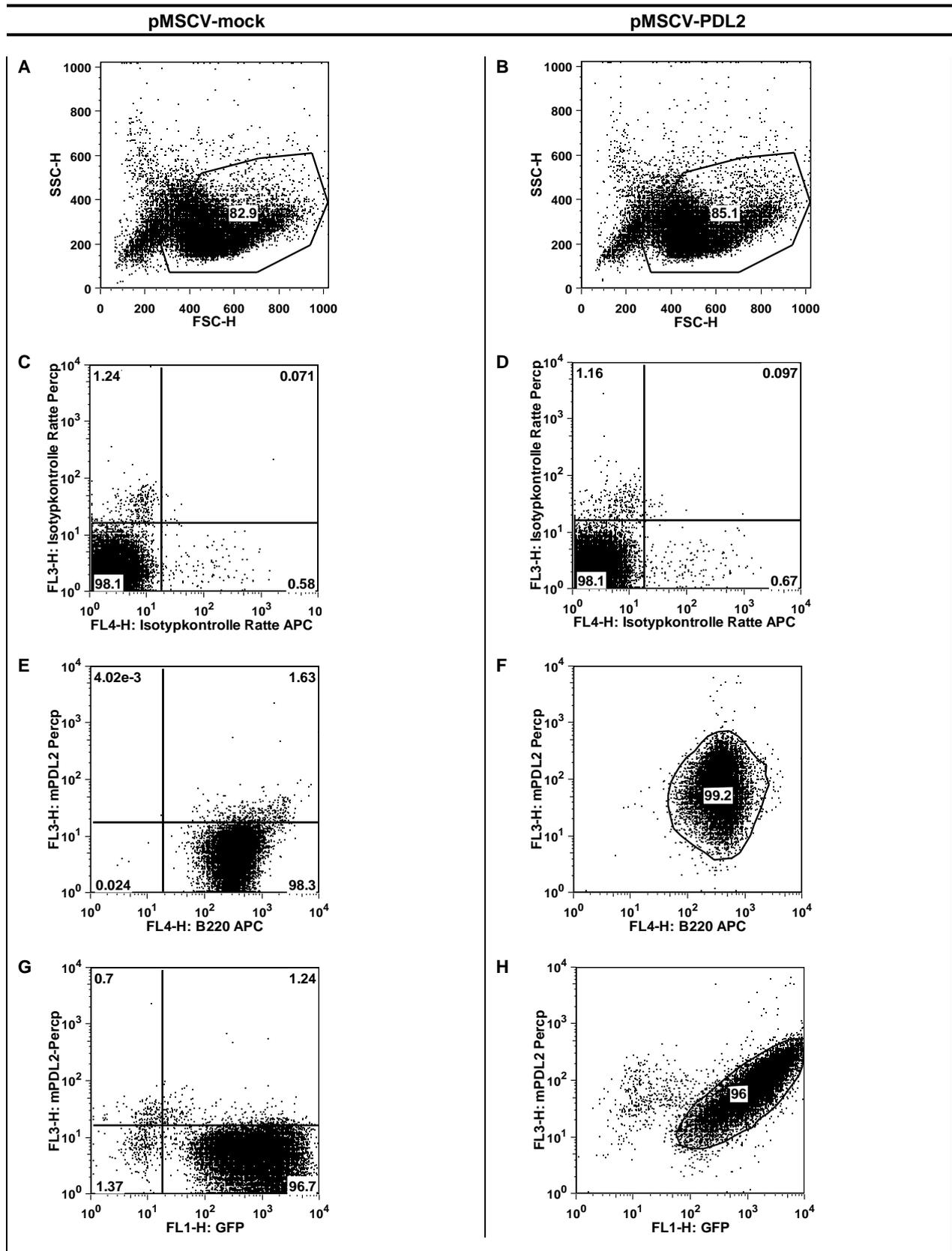


**Abb. 5 Durchflusszytometrische Analyse nach retroviraler Transduktion von primären, murinen E $\mu$ -myc-Lymphomzellen mit den Konstrukten pMSCV-2.2-IRES-GFP (pMSCV-mock) und pMSCV-2.2-IRES-GFP-PDL2 (pMSCV-PDL2)**

Dargestellt sind in der linken Spalte pMSCV-mock-transduzierte Zellen, in der rechten Spalte pMSCV-PDL2-transduzierte Zellen. Die Auftragung von Größe (FSC) gegen Granularität (SSC) zeigte etwa 40% tote Zellen (A,B). Gemessen wurde innerhalb der gesetzten Gates. Die Transduktionseffizienz, ersichtlich aus der Anzahl GFP-positiver-Zellen in den Abb. C und D, betrug 89,6% für das pMSCV-mock-Konstrukt und 84,5% für das pMSCV-PDL2-Konstrukt. Der spezifische Antikörpernachweis für PDL2 (E,F) zeigte, dass die pMSCV-mock-transduzierten GFP-positiven-Zellen kein PDL2 exprimierten. Alle pMSCV-PDL2-infizierten GFP-positiven-Zellen wiesen eine starke PDL2-Expression auf.

#### **4.4 Anreicherung von GFP-exprimierenden Zellen**

Nach der Transduktion der Lymphomzellen wurden die GFP-exprimierenden Zellen mit Hilfe eines Zellsorters angereichert. Dieser Schritt wurde angewendet, da die Transduktionsraten für pMSCV-mock und pMSCV-PDL2 häufig große Unterschiede aufwiesen und somit eine ungleichmäßige Provirusintegration bestand. Um vergleichbare Gruppen zu erhalten, wurden mit Hilfe des Sorters reine GFP-positive Zellpopulationen erzeugt. Hinzu kam, dass während der Transduktion E $\mu$ -myc-Lymphomzellen abstarben und somit viele Zelltrümmer vorlagen. Diese hätten zu Problemen bei der Injektion führen können. Beim Sorten wurden diese toten Zellen abgetrennt. Zur Validierung wurde nach dem Sorting eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt (siehe Abb. 6). Hierbei wurden die GFP-Expression, die Expression des B-Zell-Markers B220 und die PDL2-Expression überprüft. Die pMSCV-mock-transduzierten Lymphomzellen exprimierten zu annähernd 100% B220 und GFP, jedoch kein PDL2. Die pMSCV-PDL2-transduzierten Zellen hingegen exprimierten vollständig B220, GFP und PDL2.



**Abb. 6 FACS-Analyse nach Sorten der GFP-positiven transduzierten primären, murinen  $\mu$ -myc-Zellen**

Dargestellt sind in der linken Spalte gesortete pMSCV-mock-transduzierte Zellen, in der rechten Spalte gesortete pMSCV-PDL2-transduzierte Zellen. Gemessen wurde innerhalb der gesetzten Gates (A,B). Nahezu alle pMSCV-mock- und -PDL2-transduzierten Zellen waren positiv für den B-Zellmarker B220 (E,F). Nach dem Sorten lagen 96,7% GFP-positiv und PDL2-negativ pMSCV-mock-transduzierte Zellen und 96% GFP-positiv und PDL2-positiv pMSCV-PDL2-transduzierte Zellen vor (G,H).

#### 4.5 Nachweis der PDL2-Funktion *in vitro*

Die Funktion der PDL2/PD1-Interaktion im E $\mu$ -myc-Lymphommodell wurde mittels 48-stündigem T-Zell-Proliferationsassay (siehe Kap. 3.2.6) nachgewiesen. Hierzu wurden neben den transduzierten E $\mu$ -myc-Lymphomzellen auch Lymphozyten aus OTII-RAG2 $^{-/-}$ -Mäusen eingesetzt.

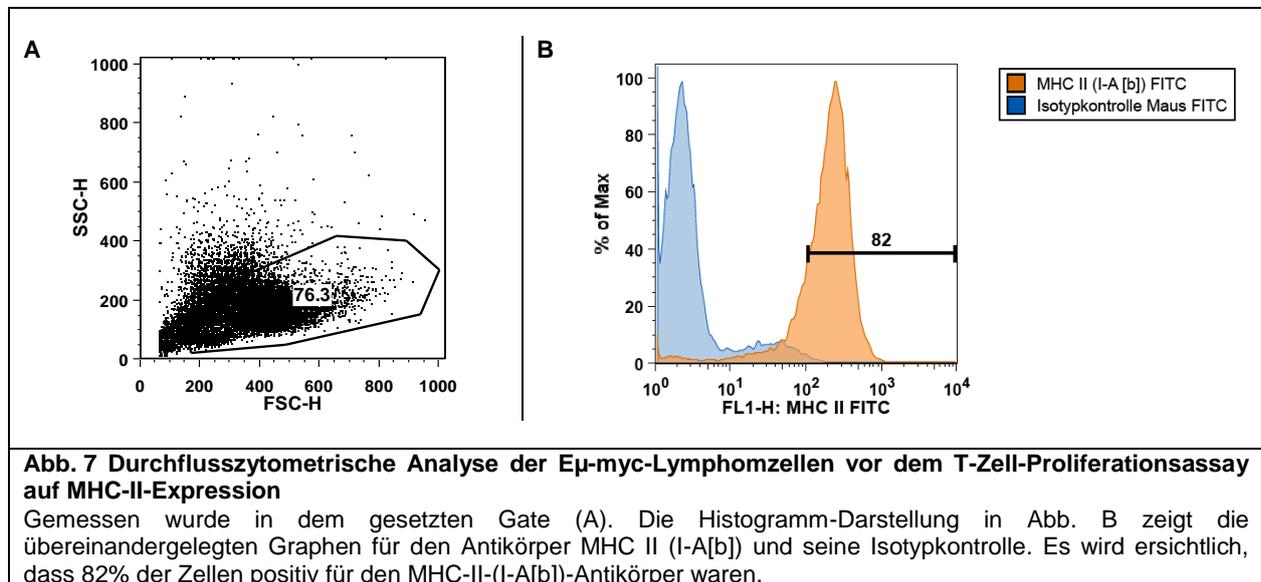
Die RAG-1- und -2-Gene (Rekombination aktivierende Gene) spielen eine entscheidende Rolle in der Lymphozytenentwicklung. Sie sind an der Aktivierung eines Prozesses beteiligt, der als somatische Rekombination bezeichnet wird und eine Voraussetzung für die Bildung reifer B- und T-Zellen ist (110) (111) (112) (113).

Die eingesetzte Knock-out-Maus zeichnet sich durch eine Defizienz im RAG2-Gen aus. Weiterhin trägt sie ein Transgen, das für einen von CD4-T-Zellen exprimierten T-Zell-Rezeptor codiert, welcher spezifisch für das OVA-Peptid ist. Somit weisen diese Mäuse bis auf die Population transgener CD4-T-Zellen nahezu keine weiteren reifen T- und B-Zellen auf (114).

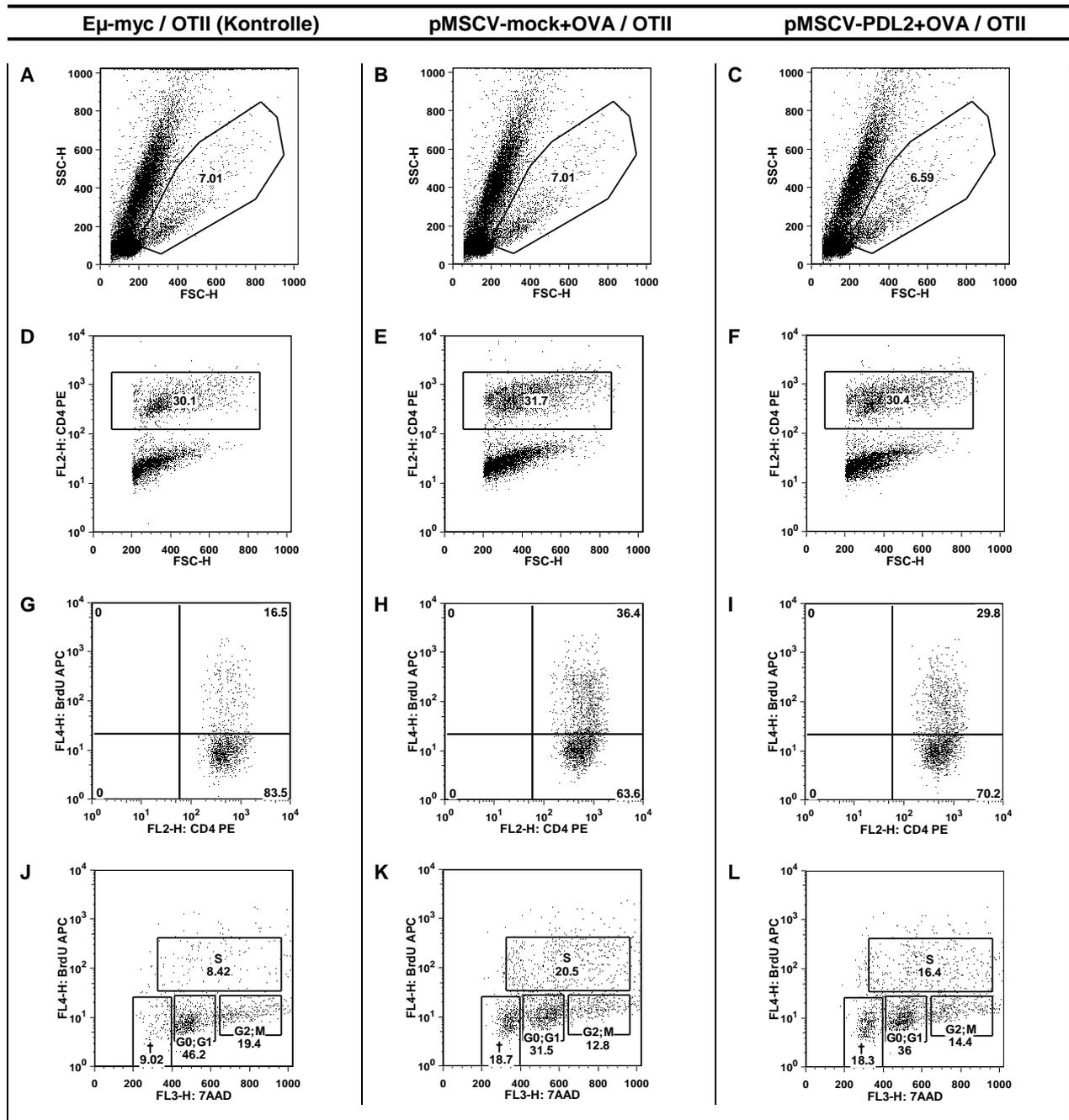
Für das *in vitro* Experiment wurden pMSCV-PDL2- und pMSCV-mock-transduzierte und gesortete Lymphomzellen mit OVA-Peptid beladen. Im Anschluss wurden die Lymphomzellen gemeinsam mit Lymphozyten aus OTII-RAG2 $^{-/-}$ -Mäusen für 48 h inkubiert.

Die beladenen Lymphomzellen präsentierten das OVA-Peptid im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche und waren in der Lage OVA-Peptid-spezifische CD4-T-Zellen zu aktivieren. Das Ausmaß der Aktivierung konnte anhand der Proliferation der T-Zellen ermittelt werden. Die Proliferationsmessung erfolgte mit Hilfe von BrdU, einem nicht radioaktiven, synthetischen Thymidin-Analogon, das in sich teilende Zellen eingebaut wird. Kombiniert man die BrdU-Färbung mit einem DNA-bindenden Farbstoff wie 7AAD ist eine Zellzyklusanalyse mit Hilfe der FACS-Technik möglich. Durch Vergleich der OVA-peptid-spezifischen CD4-T-Zellen, die mit pMSCV-mock-transduzierten bzw. pMSCV-PDL2-transduzierten Lymphomzellen inkubiert wurden, konnte ein Einfluss von PDL2 auf die T-Zell-Aktivierung messbar gemacht werden.

Zuerst wurde überprüft, ob die Lymphomzellen ausreichend MHC-Klasse-II-Molekül I-A<sup>b</sup> exprimierten. Abb. 7 zeigt, dass sich 82% der Lymphomzellen mit dem spezifischen Antikörper MHC II (I-A [b]) im Vergleich zur Isotypkontrolle anfärben lassen. Die Voraussetzung für das Experiment war somit gegeben.



In der folgenden Abb. 8 ist die Auswertung eines repräsentativen Proliferationsassays dargestellt. Die FACS-Messung zeigte, dass CD4-T-Zellen mit Kontakt zu pMSCV-PDL2-transduzierten Lymphomzellen weniger proliferierten und in größerer Zahl in der G0/G1-Phase des Zellzyklus nachzuweisen waren als CD4-T-Zellen mit Kontakt zu pMSCV-mock-transduzierten Lymphomzellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass PDL2 hemmend auf die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen wirkt. Der Nachweis der proliferationshemmenden Funktion von PDL2 im Kontext von Eμ-myc war die Grundlage der im Anschluss durchgeführten *in vivo* Versuche.



**Abb. 8 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen des T-Zell-Proliferationsassay**

In der linken Spalte sind die Zellen aus dem Kontrollansatz (untransduzierte  $E\mu$ -myc-Zellen und OTII-Zellen (Lymphozyten aus OTII-RAG2<sup>-/-</sup>-Mäusen)), in der mittleren Spalte die Zellen aus dem mock-Ansatz (pMSCV-mock-transduzierte, OVA-beladene  $E\mu$ -myc-Zellen und OTII-Zellen) und in der rechten Spalte die Zellen aus dem PDL2-Ansatz (pMSCV-PDL2-transduzierte, OVA-beladene  $E\mu$ -myc-Zellen und OTII-Zellen) zu sehen. In den Abb. A,B,C sind die Zellen in Größe (FSC) gegen Granularität (SSC) aufgetragen. Die sich anschließenden Messungen erfolgten in den gesetzten Gates.

Die Abb. D,E,F zeigten, dass 30-32% der Zellen von dem T-Zell-spezifischen CD4-Antikörper angefärbt wurden. Die folgenden Darstellungen beziehen sich auf die CD4-positiven Zellen in den gesetzten Gates. Die Darstellung von BrdU-Färbung gegen CD4-Färbung in G,H,I zeigt, wie viele der CD4-T-Zellen proliferierten. Zellen aus dem Kontrollansatz proliferierten schwach mit 17% (H), wohingegen der mock-Ansatz 36% (I) und der PDL2-Ansatz 30% (J) proliferierende CD4-T-Zellen aufwies. In den Abb. J,K,L wird der Proliferationsmarker BrdU gegen den DNA-Farbstoff 7AAD dargestellt. Hieraus ist ersichtlich in welcher Phase des Zellzyklus sich die CD4-T-Zellen befinden. Im Kontrollansatz waren 46% der CD4-T-Zellen in der G0- oder G1-Phase (G0;G1) und 8% in der S-Phase (S). 9% der Zellen waren apoptotisch (+) und 19% in der G2-Phase oder der Mitose (M). Der mock-Ansatz zeigte 32% Zellen in der G0- oder G1-Phase und 21% Zellen in der S-Phase. Im PDL2-Ansatz waren 36% der Zellen in der G0- oder G1-Phase und 16% in der S-Phase. CD4-T-Zellen aus dem PDL2-Ansatz proliferierten weniger stark und waren zu einem höheren Anteil in der G0- oder G1-Phase als Zellen aus dem mock-Ansatz.

## 4.6 Das E $\mu$ -myc-Transfermodell

Um die *in vitro* nachgewiesene proliferationshemmende Funktion von PDL2 *in vivo* zu bestätigen, wurde ein Transfermodell etabliert. Hierzu wurden die aus transgenen E $\mu$ -myc-Mäusen gewonnenen primären E $\mu$ -myc-B-Lymphomzellen untransduziert (siehe Kap. 4.6.1) bzw. transduziert (siehe Kap. 4.6.2) gesunden Wildtyp-Mäusen vom Stamm C57Bl/6 subkutan (s.c.) oder intravenös (i.v.) injiziert.

### 4.6.1 Wachstumsdynamik und Krankheitsbild der E $\mu$ -myc-Tumoren

Die Wachstumsdynamik der E $\mu$ -myc-Tumoren wurde in männlichen und weiblichen Mäusen vom Stamm C57Bl/6 getestet. Es wurden all die E $\mu$ -myc-Zellklone einbezogen, die eine niedrige PDL2-Expression aufwiesen. Hierzu wurden die Tumorzellen untransduziert in unterschiedlicher Anzahl injiziert. Die E $\mu$ -myc-Mäuse aus denen die Lymphomzellen gewonnen wurden, waren stets vom gleichen Geschlecht wie die Empfängertiere. Die Tumorzellen wurden entweder s.c. oder i.v. injiziert. Als Krankheitsbeginn wurde bei s.c.-Injektion ein tastbarer Tumor am Injektionsort gewertet, bei i.v.-Injektion tastbare vergrößerte inguinale Lymphknoten. Es zeigte sich, dass die Wachstumsgeschwindigkeit eines Klones sehr stabil ist, es jedoch starke Unterschiede zwischen den Klonen gibt. So lagen die Inkubationszeiten zwischen 14 und 23 Tagen. Schon geringe Zellzahlen von  $2.5 \times 10^4$  führten zu Ausreifung des Tumors. Bei i.v.-Injektion waren initial vergrößerte inguinale Lymphknoten tastbar, später auch vergrößerte axilläre und zervikale Lymphknoten, sowie eine vergrößerte Milz. In späten Krankheitsstadien wiesen die Tiere weiterhin eine verminderte Mobilität auf, und das Fell war struppig. In sehr seltenen Fällen konnte eine Paralyse der Extremitäten oder auch eine Schwellung im Schädelbereich beobachtet werden. Bei s.c.-Injektion bildete sich am Injektionsort ein lokaler Tumor. Im späteren Verlauf traten ähnliche Symptome wie bei i.v.-Injektion auf.

Tab. 10 Darstellung der Transferversuche mit untransduzierten E $\mu$ -myc-Klonen in Wildtyp-Mäusen

E $\mu$ -myc-Klon	Geschlecht	Injektionsmodus	Zellzahl	Krankheitsbeginn
1	männlich	i.v.	$1 \times 10^5$	17
2	männlich	i.v.	$1 \times 10^5$	18
3	weiblich	i.v.	$1 \times 10^5$	17
5	weiblich	i.v.	$5 \times 10^4$	21
5	weiblich	s.c.	$1 \times 10^5$	14
6	weiblich	i.v.	$5 \times 10^4$	12
6	weiblich	s.c.	$1 \times 10^5$	14
9	weiblich	i.v.	$2.5 \times 10^4$	23

Um auch geringe Unterschiede im Wachstumsverhalten der pMSCV-mock- bzw. pMSCV-PDL2-transduzierten Lymphomzellen *in vivo* differenzieren zu können, wurden E $\mu$ -myc-Zellklone, die ein aggressives Wachstum zeigten (<17 Tage), ausgeschlossen. Ausgewählt wurden die von weiblichen Spendertieren stammenden Klone 5 und 9 und der von einem männlichen Spendertier stammende Klon 1. Diese wurden für die weiteren Experimente verwendet.

#### 4.6.2 Untersuchung zur immunmodulatorischen Funktion von PDL2 *in vivo*

Insgesamt wurden vier Experimente mit den verschiedenen E $\mu$ -myc-Zellklonen durchgeführt. Hierzu wurden die pMSCV-mock- bzw. pMSCV-PDL2-transduzierten und gesorteten Lymphomzellen in gesunde C57Bl/6 Empfängertiere intravenös injiziert. So erhielt man zwei Behandlungsgruppen, die mock-Gruppe und die PDL2-Gruppe. Die injizierten E $\mu$ -myc-Zellklone waren stets vom gleichen Geschlecht wie die Empfängertiere. Es wurde je ein Experiment mit dem Zellklon 1, 5 und 9 durchgeführt. Im Experiment II wurden die Zellklone 5 und 9 zu gleichen Anteilen gemischt und injiziert.

##### 4.6.2.1 Klinischer Verlauf

Nach Injektion der Lymphomzellen wurden die Tiere alle ein bis zwei Tage begutachtet und nach Lymphknotenschwellungen abgetastet. Tastbare Lymphknotenschwellungen wurden als Krankheitsbeginn gewertet. Bei Vergleich der mock- und PDL2-Gruppe zeigte sich kein Unterschied im medianen Überleben, die Tiere erkrankten zeitgleich. Es konnte somit in diesem Modell kein Einfluss von PDL2 auf den Krankheitsverlauf festgestellt werden.

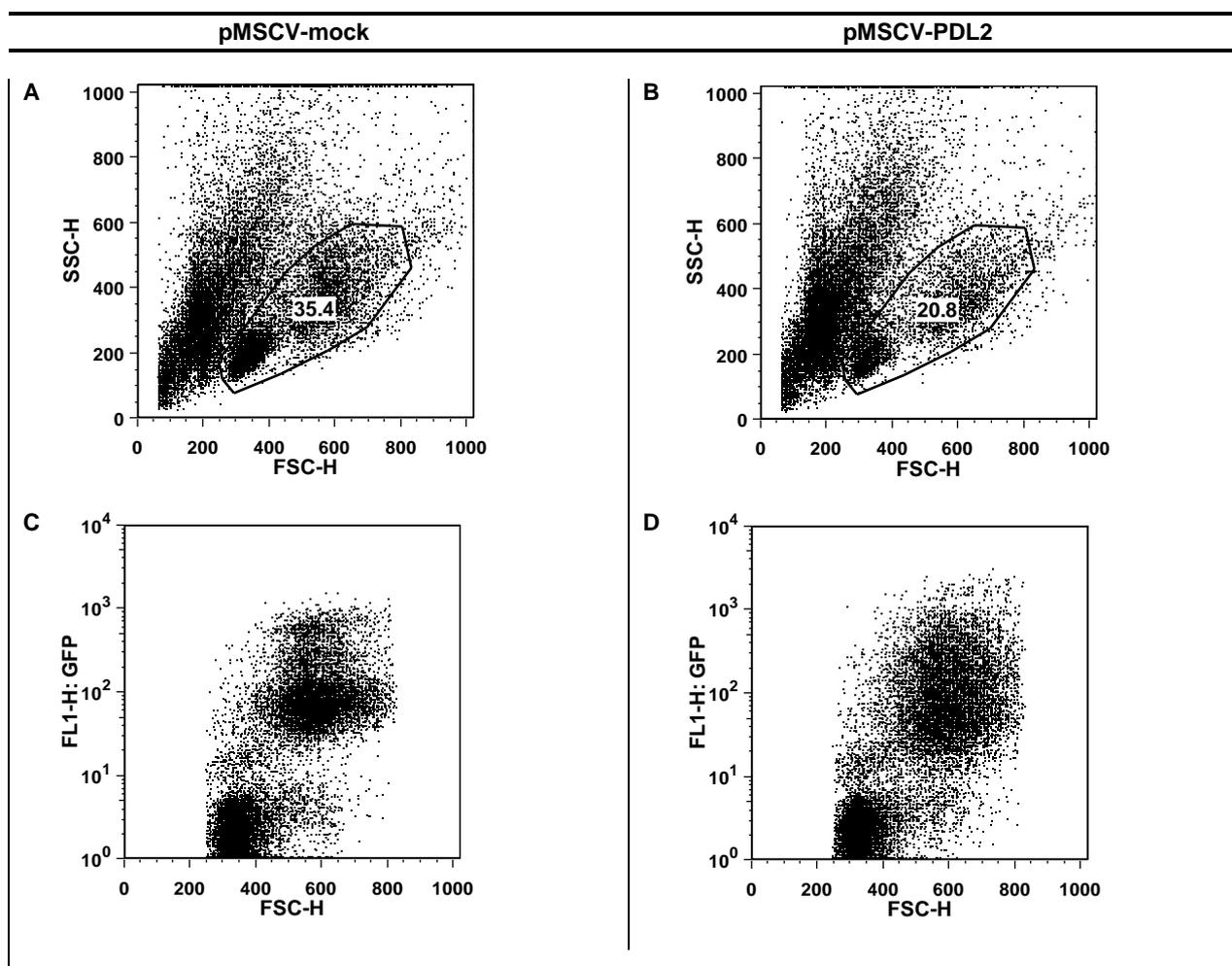
**Tab. 11 Darstellung der Transferversuche mit transduzierten E $\mu$ -myc-Klonen in Wildtyp-Mäusen**

Experiment Nummer (Zellklon)	Konstrukt	medianes Überleben (Tage)	Tieranzahl	Zellzahl
I (1)	mock	13	9	5x10 <sup>4</sup>
	PDL2	13	10	
II (5/9)	mock	19	10	2,5x10 <sup>4</sup>
	PDL2	19	8	
III (9)	mock	19	13	1x10 <sup>4</sup>
	PDL2	19	9	
IV (9)	mock	16	10	2x10 <sup>4</sup>
	PDL2	16	14	

#### 4.6.2.2 Charakterisierung der Lymphozyten in den Lymphknoten

Nach dem Auftreten von Lymphknotenschwellungen wurden die erkrankten Tiere abgetötet und ein inguinaler Lymphknoten entnommen. Aus diesem wurden die Lymphozyten gewonnen und eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt (Abb. 9).

Die pMSCV-mock- bzw. pMSCV-PDL2-transduzierten E $\mu$ -myc-Lymphomzellen konnten eindeutig an ihrer starken GFP-Expression nachgewiesen werden. Anhand ihrer Zellgröße ließen sich die lymphoblastischen Lymphomzellen in der FSC/SSC-Darstellung gut von den restlichen Lymphozyten abgrenzen.



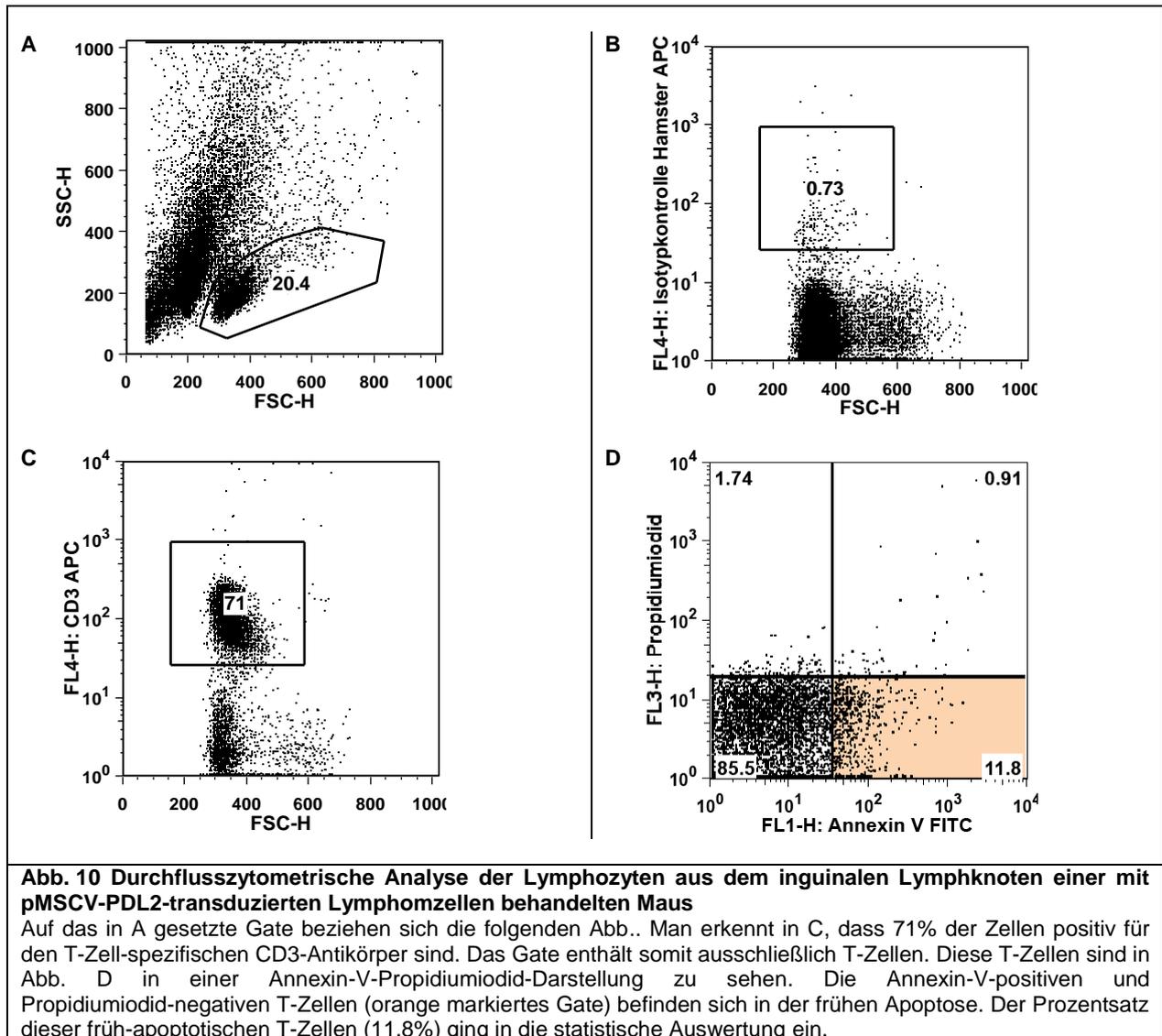
**Abb. 9 Durchflusszytometrische Analyse der inguinalen Lymphknoten aus zwei mit transduzierten (pMSCV-mock bzw. pMSCV-PDL2) Lymphomzellen behandelten erkrankten Mäusen**

In der linken Spalte sind die Daten einer mit pMSCV-mock-transduzierten Lymphomzellen behandelten Maus dargestellt. Die rechte Spalte zeigt die Daten einer mit pMSCV-PDL2-transduzierten Lymphomzellen behandelten Maus. In der Darstellung für Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen sind innerhalb der gesetzten Gates zwei Zellpopulationen zu sehen (A,B). In den Abb. C,D sind die Zellen aus den definierten Gates dargestellt. Es wird deutlich, dass die größeren Zellen (FSC 500-800) GFP-positiv sind. Es handelt sich um die injizierten transduzierten und gesorteten Zellen.

#### **4.6.2.3 Nachweis von apoptotischen T-Zellen in den Lymphknoten**

Die aus den inguinalen Lymphknoten der erkrankten Tiere gewonnenen Lymphozyten wurden auf Apoptose untersucht. Hierzu wurde mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse eine Dreifachfärbung durchgeführt. Die Zellen wurden zuerst mit einem für T-Zellen spezifischen CD3-Antikörper inkubiert und im Anschluss mit dem Antikörper Annexin V und dem DNA-bindenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt. Annexin V bindet spezifisch an Zellen, die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden (siehe Kap. 1.6). PI hingegen färbt Zellen an, die sich in der späten Phase der Apoptose oder der Nekrose befinden (115). Es war so möglich, Aussagen über den Prozentsatz apoptotischer T-Zellen in den inguinalen Lymphknoten erkrankter Mäuse zu treffen.

Exemplarisch für die gewonnenen Daten ist die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten aus dem inguinalen Lymphknoten einer mit pMSCV-PDL2-transduzierten Lymphomzellen behandelten Maus in Abb. 10 dargestellt.



Es wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Jeweils 50% der Tiere der mock- und der PDL2-Gruppe eines Experimentes wurden am ersten Tag abgetötet, die verbleibenden Tiere am zweiten Tag. Die ermittelten prozentualen Werte wurden mit dem Programm Graphpad Prism ausgewertet. Um statistisch relevante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu ermitteln, wurden die Werte mit dem ungepaarten T-Test verglichen. Signifikanz wurde mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  definiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 dargestellt.

**Tab. 12 Anzahl der apoptotischen T-Zellen aus den Transferversuchen mit transduzierten E $\mu$ -myc-Klonen**

Experiment-Nummer (Zellklon)	Konstrukt	apoptotische T-Zellen (%) Tag 1		apoptotische T-Zellen (%) Tag 2	
		Mittelwert $\pm$ Standardabweichung		Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	
I (1)	mock	7,4 $\pm$ 0,6		12,3 $\pm$ 2,3	
	PDL2	6,6 $\pm$ 1,8		19,9 $\pm$ 9,3	
II (5/9)	mock	6,6 $\pm$ 0,6*		4,5 $\pm$ 0,9	
	PDL2	9 $\pm$ 0,7*		5,9 $\pm$ 0,2	
III (9)	mock	10 $\pm$ 1,2		11,9 $\pm$ 0,7	
	PDL2	9,6 $\pm$ 1		8,9 $\pm$ 1,6	
IV (9)	mock	13,23 $\pm$ 1,4		/	
	PDL2	12,60 $\pm$ 1,1		/	

Die T-Zellen aus Tieren der mock-Gruppe weisen ähnlich hohe Apoptoseraten auf wie T-Zellen aus Tieren der PDL2-Gruppe. Bis auf Tag 1 des Experimentes II konnte kein signifikanter Unterschied (\*) zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

## 5. Diskussion

Das PMBL wurde 2001 aufgrund seiner charakteristischen klinischen und molekularen Eigenschaften als eigenständige Entität innerhalb der DLBCLs identifiziert (3).

Da es bis heute noch keine spezifischen Therapiemethoden gibt, wird das PMBL ähnlich den anderen DLBCLs behandelt. Dass diese unselektive Therapie nur teilweise effektiv ist, wird daran deutlich, dass immer noch mehr als 30% der Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre nach der Therapie an dieser Krankheit versterben (34).

Ziel der Forschung ist es PMBL-spezifische Therapien zu entwickeln. Voraussetzung hierfür sind genaue Kenntnisse über fehlregulierte tumorspezifische Genfunktionen, welche die Pathogenese des PMBL begründen. Basierend auf Genexpressionsanalysen konnten für das PMBL solche tumorspezifischen Genfunktionen identifiziert werden (34). Das fehlregulierte Gen mit der höchsten Spezifität kodiert für das Molekül PDL2, welches im zentralen Interesse der vorliegenden Arbeit stand.

Für PDL2 wird eine pathogenetische Funktion im PMBL aufgrund verschiedener Beobachtungen vermutet. Beispiele hierfür sind die Überexpression von PDL2 auf einigen soliden Tumoren *in situ* (116) (83) sowie sein inhibitorischer Effekt auf T-Zellfunktionen *in vitro* (siehe Kap. 1.3). Ein funktioneller Nachweis hinsichtlich der Pathogenese des PMBL *in vivo* wurde für PDL2 bis dato nicht erbracht.

Zur Analyse der Funktion von PDL2 wurde in dieser Arbeit die effektive Methode der retrovirus-vermittelten Überexpression der Genfunktion in primären B-Lymphomzellen von transgenen E $\mu$ -myc-Mäusen gewählt (87).

### 5.1 Das E $\mu$ -myc-Tumormodell

Als *in vivo* Modell diente eines der ersten und deshalb gut erforschten transgenen Lymphom-Mausmodelle – das E $\mu$ -myc-Tumormodell. Hierbei wird durch die Kopplung des Onkogens c-myc mit dem Immunglobulin-schwere-Ketten-Enhancer E $\mu$  eine konstitutive, auf die B-Zellreihe beschränkte, c-myc-Expression erzielt. Das Kennzeichen der Erkrankung, die E $\mu$ -myc-Mäuse ausbilden, ist eine massive Vergrößerung der Lymphknoten und der Milz (105).

Die Arbeit mit den Tieren zeigte, dass sich die ausbildenden Lymphome schon im Anfangsstadium gut palpieren lassen, was die Diagnostik und Verlaufsbeobachtung

erleichterte. Weiterhin ließen sich die nahezu reinen Tumorzellen gut aus den vergrößerten Lymphknoten isolieren um dann *ex vivo* studiert oder zum Transfer in gesunde Mäuse eingesetzt zu werden.

Einer der Hauptgründe für die Wahl dieses Tumormodells war eine partielle Gemeinsamkeit zwischen der E $\mu$ -myc-induzierten Lymphomentstehung und der Tumorgenese des PMBL. Diese besteht in der pathogenetischen Rolle des Onkogens c-myc. So konnten in einigen PMBLs Rearrangements des c-myc-Gens sowie Sequenzvariationen im c-myc-P2-Promotor identifiziert werden (117). Diese strukturellen Veränderungen ähneln Translokationen des c-myc-Gens, die charakteristisch für andere B-Zell-Lymphome, wie beispielsweise das Burkitt-Lymphom, sind. Es wird daher vermutet, dass eine Überexpression des c-myc-Gens für die Pathogenese des PMBL relevant sein könnte (118).

Prinzipiell sollten alle B-Zellen der transgenen E $\mu$ -myc-Mäuse das c-myc-Onkogen von Geburt an überexprimieren und somit frühzeitig entarten. Es scheint jedoch so, dass in Anlehnung an das Mehrstufenmodell der Tumorentstehung neben der konstitutiven c-myc-Expression weitere genetische Aberrationen in der B-Zellentwicklung notwendig sind, um Tumorwachstum in E $\mu$ -myc-Mäusen zu induzieren. Für einige genetische und/oder epigenetische Aberrationen, vor allem Ras- und p53-Mutationen, konnte ein solcher synergistischer Effekt nachgewiesen werden (119) (120) (106) (121). Ein Hinweis für die Heterogenität der beteiligten genetischen Aberrationen könnte das breite Zeitfenster von 32 bis zu 600 Tagen bis zum Auftreten von E $\mu$ -myc-Tumoren sein (122).

Neben diesen Forschungsergebnissen auf molekularer Ebene sprechen noch weitere Argumente für einen mehrstufigen Prozess der Tumorentstehung. So sind die Tumoren nicht von Geburt an vorhanden, sondern treten, wie erwähnt, in den E $\mu$ -myc-Mäusen erst nach 32 bis 600 Tagen auf. Dass die transgenen E $\mu$ -myc-Zellen vor Auftreten der Tumoren noch nicht maligne sind, sondern vielmehr einem präneoplastischen Stadium entsprechen, konnte mit Hilfe von Transferversuchen gezeigt werden. Hierbei führte der Transfer von reifen, lymphoiden Zellen aus jungen, tumorfreien transgenen E $\mu$ -myc-Mäusen in gesunde Mäuse in der Mehrzahl der Fälle zu keinem Tumorwachstum (123). Hingegen zeigten die Versuche im Rahmen dieser Arbeit, dass es bei Transfer von Lymphomzellen aus erkrankten E $\mu$ -myc-Mäusen in gesunde

Wildtyp-Mäuse in nahezu 100% zu dem typischen Krankheitsbild kam (siehe Kap. 4.6). In den Transferversuchen zeigte sich auch die hohe Aggressivität des Tumors, denn schon die Injektion geringer Zellzahlen von  $2,5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  war ausreichend, um innerhalb kurzer Zeit (12-23 Tage) eine Erkrankung auszulösen.

Weiterhin weisen die jungen, noch nicht erkrankten E $\mu$ -myc-Mäuse in Knochenmark und Milz im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Mäusen die 4-5-fache Anzahl an unreifen B-Zellen bei einer geringeren Anzahl an reifen B-Zellen auf. Dies lässt sich mit der durch c-myc induzierten verstärkten Zellteilung und verzögerter Zelldifferenzierung erklären (123). Interessanterweise sind diese unreifen B-Zellen aus den jungen E $\mu$ -myc-Mäusen polyklonal, wohingegen es sich bei den ausgebildeten Tumoren der E $\mu$ -myc-Mäuse zumeist um monoklonale Zellansammlungen handelt (105).

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine E $\mu$ -myc-B-Zelle in ihrer Entwicklung höchstwahrscheinlich spontan genetische Aberrationen erfährt, durch die sie eine dominante Proliferation entwickelt, sodass das Entstehen weiterer Lymphome durch andere B-Zell-Klone unterdrückt wird und monoklonales Wachstum resultiert.

Die beschriebene Heterogenität der erworbenen genetischen und/oder epigenetischen Aberrationen bedingt eine Vielzahl möglicher E $\mu$ -myc-Klone und dementsprechend Unterschiede in den resultierenden B-Zell-Tumoren. Diese Eigenschaft spiegelt die Bandbreite menschlicher B-Zell-Lymphome wider, erschwert jedoch andererseits die Zuordnung der entstehenden B-Zell-Tumore zu einem bestimmten B-Zell-Subtyp.

Eine aktuelle Publikation greift eben diesen Punkt des E $\mu$ -myc-Tumormodells auf und ordnet die in den E $\mu$ -myc-Mäusen entstehenden Tumoren unterschiedlichen Zeitfenstern zu (122). Die entstandenen zwei Gruppen „früh auftretenden Tumore“ (Erkrankung innerhalb von 80 Tagen) und „spät auftretenden Tumore“ (Erkrankung nach 250 Tagen) wurden mittels Genexpressionsanalysen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Gruppe der „früh auftretenden Tumore“ charakteristische Eigenschaften des Burkitt-Lymphoms, welches zu den NHL zählt und hauptsächlich bei Kindern auftritt, aufweist (124). Die Gruppe der „spät auftretenden Tumore“ hingegen weist eindeutig Eigenschaften der DLBCLs auf, zu denen auch das PMBL zählt. Es scheint somit einen Zusammenhang zwischen dem zeitlichen Auftreten der Tumoren und den Tumoreigenschaften zu geben (122).

Eine Auswahl der E $\mu$ -myc-Klone nach eben jenen zeitlichen Gesichtspunkten könnte das E $\mu$ -myc-Tumormodell für die zukünftige PMBL-Forschung noch attraktiver machen, da somit ein PMBL-spezifischeres Tumormodell zur Verfügung stünde.

## 5.2 Charakterisierung der E $\mu$ -myc-Lymphomzellen

Zur Charakterisierung der E $\mu$ -myc-Lymphomzellen wurden FACS-Analysen durchgeführt. Vorrangig galt es die endogene Expression von PDL2 zu überprüfen und festzustellen, ob die gewählte Strategie der Überexpression von PDL2 überhaupt sinnvoll ist (siehe Tab. 8). Die PDL2-Expression der Lymphomzellen der getesteten E $\mu$ -myc-Klone lag stets unter 24%, jedoch wurden für die durchgeführten Transduktionsexperimente ausschließlich E $\mu$ -myc-Klone ausgewählt deren Lymphomzellen zu weniger als 15% PDL2-positiv waren. Es war somit gewährleistet, dass die endogene PDL2-Expression ausreichend gering war.

Um die endogene Expression von PDL2 in den Lymphomzellen weiter zu reduzieren, könnte die sogenannte RNA-Interferenz eingesetzt werden. Hiermit wird ein Vorgang bezeichnet, bei dem die Expression eines Zielgens durch doppelsträngige RNA-Moleküle sequenzspezifisch inhibiert werden kann. Diese Herabregulation wird als Knock-down des Zielgens bezeichnet (125) (126). Unter Anwendung dieser Technik bestünde die Möglichkeit, die Unterschiede hinsichtlich der PDL2-Expression im Vergleich von pMSCV-mock- und pMSCV-PDL2-transduzierten Lymphomzellen zu maximieren und somit den *in vivo* Nachweis der PDL2-Funktion zu erleichtern.

Bei der Charakterisierung der E $\mu$ -myc-Lymphomzellen wurde auch das Molekül der B7-Familie, PDL1, einbezogen. Auf den getesteten Lymphomzellen konnte für PDL1 eine überwiegend mittlere bis hohe Expression nachgewiesen werden. Da PDL1 neben PDL2 ein weiterer Bindungspartner von PD1 ist und ebenfalls ko-inhibitorische Eigenschaften besitzt, könnte die hohe PDL1-Expression einen Wachstumsvorteil für die Lymphomzellen darstellen und eine Ursache für die Aggressivität des Tumors sein.

Weiterhin wurde die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren geprüft. Hierbei zeigten CXCR4 und CCR7 eine mittlere bis hohe und CXCR5 eine überwiegend negative Expression.

CXCR4, CXCR5 und CCR7 sind wichtige homöostatische Chemokinrezeptoren, die unter anderem für die Rekrutierung zirkulierender T- und B-Lymphozyten in sekundäre

lymphoide Organe verantwortlich sind (127) (128) (129). Daneben scheinen Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle für die Ausbreitung und Metastasierung von Tumoren zu spielen (130) (131) (132). Verschiedene klinische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Chemokinrezeptoren und dem Befall der Lymphknoten bei B-Zell NHL und cHL nachweisen (133) (134). In einem Maustumor-Modell konnte gezeigt werden, dass die Infiltration von Brustkrebszellen in bestimmte Organe über die lokal exprimierten Chemokine CXCL12 und CCL21 gesteuert wird (130). So könnte die Interaktion von Chemokinrezeptoren auf Tumorzellen und den entsprechenden Chemokinen in Zielorganen Tumoren die Gewebeeinfiltration ermöglichen bzw. für das spezifische Metastasierungsmuster verschiedener Tumortypen mitverantwortlich sein (135) (136).

Der auf den E $\mu$ -myc-Zellen hoch exprimierte Chemokinrezeptor CXCR4 wird auch auf einer Reihe humaner Tumoren exprimiert. Sein Ligand, das homöostatische Chemokin CXCL12 wird unter anderem in den Lymphknoten gebildet (128). Der Chemokinrezeptor CCR7 bindet die homöostatischen Chemokine CCL19 und CCL21, welche konstitutiv in Lymphknoten und Milz exprimiert werden (127). Die mittlere bis hohe Expression von CXCR4 und CCR7 auf den E $\mu$ -myc-Zellen könnte die Einwanderung der Lymphomzellen in sekundäre lymphoide Organe ermöglichen und somit ein Grund für das durch den Lymphknoten- und Milzbefall dominierte Krankheitsbild der E $\mu$ -myc-Tumoren sein.

Auch für das typische Wachstumsmuster des PMBL, das sich bei Diagnosestellung zumeist durch Befall des anterioren Mediastinums unter Ausschluss nodaler Strukturen auszeichnet, scheint ein kürzlich identifiziertes spezifisches Chemokinrezeptorexpressionsprofil verantwortlich zu sein. Dieses zeichnet sich durch die überwiegend niedrige Expression der homöostatischen Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 aus (137).

Da CXCR5 mit Ausnahme von Plasmablasten und Plasmazellen (138) auf allen reifen rezirkulierenden B-Zellen exprimiert wird (127), ist die niedrige CXCR5-Expression auf den E $\mu$ -myc-Zellen auffällig und könnte Ausdruck der Unreife bzw. des Vorläufer-B-Zell Differenzierungsstadium der E $\mu$ -myc-B-Lymphomzellen sein.

### 5.3 Transduktion primärer, muriner Eμ-myc-Lymphomzellen

Ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit war die Transduktion der Eμ-myc-Lymphomzellen. Zunächst mussten die relevanten Größen innerhalb des Protokolls erkannt und evaluiert werden. Zu den vorgegebenen festen Größen zählt beispielsweise die Größe der retroviralen Konstrukte. So ist das pMSCV-PDL2-Konstrukt um 744 Basenpaare größer als pMSCV-mock. Da die Größe des retroviralen Konstruktes reziprok mit der Integrationswahrscheinlichkeit korreliert, wurden mit dem pMSCV-mock-Konstrukt stets höhere Transduktionsraten erreicht (siehe Kap. 4.1).

Zu den beeinflussbaren Größen des Transduktionsprotokolls zählen die Zentrifugationsbedingungen, das retrovirale Überstandsvolumen, die Transduktionsdauer und die Kulturbedingungen. Diese Parameter wurden zur Optimierung des Protokolls verändert. Hierbei war ein Kompromiss zwischen optimalen Transduktionsbedingungen und minimaler Schädigung der Lymphomzellen erforderlich. Hohe und lang andauernde Zentrifugationskräfte schädigen die Zellen mechanisch, andererseits intensivieren sie den Kontakt zwischen Viren und Lymphomzellen und erhöhen somit, unterstützt durch das Polybren, die Integrationswahrscheinlichkeit. Da die Zentrifugation unter Raumlufbedingungen und nicht unter Inkubatorbedingungen durchgeführt werden konnte, ist auch von einer metabolischen Schädigung auszugehen.

Die Erhöhung des Volumenanteils an retroviralem Überstand führte ebenfalls zu einer metabolischen Schädigung, da sich der Überstand aus verbrauchtem Plat-E-Medium zusammensetzt und weiterhin toxische Effekte durch das hohe Retrovirusangebot eine Rolle spielen können.

Die Aufnahme des Virus und die damit verbundene Integration in das Genom setzt eine Zellproliferation voraus. In Zellen, die eine hohe Proliferationsaktivität aufweisen, ist die Integrationswahrscheinlichkeit höher, da durch den Zusammenbruch der Kernmembran während der Mitose die Virus-DNA besser in das Genom eingebaut werden kann. Unter dem Mikroskop wurde deutlich, dass die Proliferationsaktivität der frisch aufgetauten Lymphomzellen relativ gering ist, um dann langsam über ein bis zwei Tage anzusteigen. Das Protokoll wurde dementsprechend angepasst und die Transduktion über einen Zeitraum von drei Tagen durchgeführt. So war es möglich, die

Lymphomzellen in einem Zustand hoher Proliferation zu transduzieren und die Wahrscheinlichkeit der Virus-Aufnahme zu erhöhen.

Ein Merkmal der E $\mu$ -myc-Lymphomzellen, welches auf das c-myc-Onkogen zurückzuführen ist, scheint die hohe Apoptoserate der Lymphomzellen zu Beginn einer jeden Kultivierung zu sein. Dies lässt sich dadurch erklären, dass c-myc nicht nur die Proliferation stimuliert (139) (140), sondern auch ein starker Induktor der Apoptose ist (141) (142). Dies erscheint zunächst widersprüchlich, jedoch konnte gezeigt werden, dass während des durch c-myc vermittelten Eintritts in den Zellzyklus die Zelle gegenüber apoptotischen Signalen sensitiviert wird (143) (144) (105). Es kommt zur Kopplung proliferativer und apoptotischer Signalwege. Solange der Zelle ausreichend Überlebensfaktoren zur Verfügung stehen, unterdrücken die anti-apoptotischen die pro-apoptotischen Signale (104). Das während der Transduktion zugesetzte IL-7 zählt zu den anti-apoptotischen Signalen und reduzierte somit die Anzahl apoptotischer E $\mu$ -myc-Lymphomzellen.

Neben diesem Aspekt ist der Erfolg der Transduktion auf zwei weitere Punkte im Transduktionsprotokoll zurückzuführen, welche ebenfalls zur Erhöhung der Vitalität der Zellen in der Zellkultur beitragen. Hierzu zählt, dass die B-Lymphomzellen mit einem speziellen B-Zell-Medium versorgt wurden. Weiterhin schafften die als Feederzellen eingesetzten NIH3T3-Zellen durch das Bereitstellen von Zytokinen günstige Kulturbedingungen. Bei mikroskopischer Betrachtung wurde deutlich, dass lebende Lymphomzellen vor allem auf den NIH3T3-Zellen lokalisiert waren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die in Suspension wachsenden Lymphomzellen offensichtlich die adhärennten Kontakte zu den NIH3T3-Zellen benötigen. Dies könnte modellhaft der *in vivo* Situation entsprechen, da es auch hier essentielle Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem sie umgebenden Stroma gibt (145).

Die Ergebnisse für die pMSCV-PDL2-transduzierten Zellen (siehe Kap. 4.3) zeigten, dass die Anzahl PDL2-exprimierender Zellen eng mit der Anzahl GFP-positiver Zellen korrelierte. Vor dem Hintergrund, dass während der Transkription von GFP und PDL2 ein gemeinsames RNA-Produkt gebildet wird, welches durch denselben Promotor angetrieben wird, erscheint dies nicht verwunderlich. Dennoch wird die Translation beider Proteine unterschiedlich induziert. Während die Translation des PDL2-Gens 5'-Cap-abhängig initiiert wird, erfolgt die Translationsinitiation des GFP-Gens

5'-Cap-unabhängig über die IRES-site (87). Die IRES-site im RNA-Produkt bildet eine komplexe Sekundärstruktur aus, die mit verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren, wie zum Beispiel eIF4B und eIF4G, interagiert. Die Translationsinitiation beider Gene erfolgt somit unabhängig voneinander und kann daher unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Die FACS-Ergebnisse und die Literatur zeigen jedoch, dass die IRES-abhängige GFP-Expression nur selten geringer als die 5'Cap-abhängige PDL2-Expression ist (92). Dies stellte eine wichtige Voraussetzung für die Anreicherung der Zellen mittels FACS-Sorter dar, da hierbei vorrangig nach dem Merkmal GFP sortiert wurde und somit eine enge Korrelation von GFP und PDL2 für alle nachfolgenden Schritte relevant war.

#### **5.4 Nachweis der PDL2-Funktion *in vitro***

Der erste Nachweis der Funktion von PDL2 im E $\mu$ -myc-Modell wurde *in vitro* geführt. Die Ergebnisse des Proliferationsassays zeigten, dass PDL2-exprimierende Lymphomzellen in der Lage sind, antigenspezifische T-Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen.

CD4-T-Zellen mit Kontakt zu pMSCV-PDL2-transduzierten Lymphomzellen proliferierten weniger stark und waren in größerer Zahl in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus nachzuweisen als CD4-T-Zellen mit Kontakt zu pMSCV-mock-transduzierten Lymphomzellen. Dieser durch PDL2 erzeugte Zellzyklusarrest könnte einen Wachstumsvorteil darstellen, da in der G<sub>0</sub>-Phase befindliche ruhende CD4-Zellen keine effektive Immunantwort induzieren können.

In dem Proliferationsassay wurden primäre Lymphozyten aus OTII-RAG2<sup>-/-</sup>-Mäusen und keine transformierten T-Zelllinien eingesetzt. Dies geschah unter anderem vor dem Hintergrund einiger Veröffentlichungen der vergangenen Jahre. Diese machten deutlich, dass T-Zelllinien neben dem Vorteil der leichten Kultivierbarkeit auch einige Nachteile haben, insbesondere für die Erforschung der T-Zell Aktivierung (146). So weist beispielsweise die Jurkat-Zelllinie einen Defekt in der Expression der Lipidphosphatase PTEN auf, welche einen Regulator der Zellproliferation darstellt (147) (148). Dieser Defekt könnte ein vermindertes Ansprechen der Zelllinie auf ko-stimulatorische Signale bedingen. So konnte für die Jurkat-Zelllinie im Vergleich mit primären T-Zellen eine reduzierte Ansprechbarkeit auf das ko-stimulatorische Molekül CD28 gezeigt werden (149). Dementsprechend scheint für die Erforschung der T-Zell-Aktivierung die Nutzung primärer T-Zellen von Vorteil zu sein (150).

Die Anzahl geschädigter Zellen im Proliferationsassay war relativ hoch. Dies lag daran, dass die Inkubation der Lymphomzellen mit OVA-Peptid über 5 h in einem nährstoffarmen Pulse-Medium durchgeführt wurde. Weiterhin wurden für den Proliferationsassay keine NIH3T3-Zellen als Feederzellen für die Lymphomzellen eingesät. Dieser Entscheidung lag die Überlegung zu Grunde, dass die NIH3T3-Zellen einen möglichen Störfaktor darstellen würden und somit die Interpretation der Ergebnisse des Proliferationsassays erschweren könnten.

## **5.5 Wachstumsdynamik und Krankheitsbild der E $\mu$ -myc-Tumoren**

Um das Wachstum und das Krankheitsbild der E $\mu$ -myc-Tumoren zu charakterisieren, wurden Transferversuche durchgeführt. Hierfür wurden die aus transgenen E $\mu$ -myc-Mäusen gewonnenen primären E $\mu$ -myc-Lymphomzellen untransduziert gesunden Wildtyp-Mäusen vom Stamm C57Bl/6 s.c. oder i.v. injiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass es sich um eine aggressive Erkrankung handelt, welche in der Mehrzahl der Fälle initial mit der Vergrößerung der inguinalen, später auch der axillären und zervikalen, Lymphknoten einherging. Dieser dominante Lymphknotenbefall könnte durch das in Kap. 5.2 diskutierte Chemokinrezeptorexpressionsprofil der E $\mu$ -myc-Tumoren bedingt sein. Eine ausgeprägte Milzvergrößerung war weiterhin charakteristisch. In sehr seltenen Fällen wurden eine Paralyse der Extremitäten oder auch eine Schwellung im Schädelbereich beobachtet, was auf eine zelluläre Infiltration des ZNS schließen lässt.

Nach Injektion der Zellen eines E $\mu$ -myc-Klones erkrankten die Wildtyp-Mäuse nahezu zeitgleich (siehe Kap. 4.6.1). Es ist somit wahrscheinlich, dass die E $\mu$ -myc-Lymphomzellen aus den E $\mu$ -myc-transgenen-Mäusen in den Wildtyp-Mäusen keine weiteren genetischen und/oder epigenetischen Aberrationen erfahren, die das Wachstum beschleunigen oder hemmen.

## **5.6 *In vivo* Funktion von PDL2**

Um den *in vitro* gezeigten Einfluss von PDL2 auf T-Zellen *in vivo* zu bestätigen, wurden Transferversuche durchgeführt. Hierzu wurden die aus transgenen E $\mu$ -myc-Mäusen gewonnenen primären E $\mu$ -myc-Lymphomzellen transduziert und gesortet und im Anschluss gesunden Wildtyp-Mäusen vom Stamm C57Bl/6 i.v. injiziert.

Die *in vivo* Versuche zeigten, dass die i.v.-Injektion der transduzierten E $\mu$ -myc-Lymphomzellen rasch zu dem typischen Krankheitsbild und in der Folge zum Tod der Tiere führte. Dieser rasante Verlauf wird durch die hohe Teilungsrates der E $\mu$ -myc-Lymphomzellen verursacht. Das hohe Wachstumspotential der E $\mu$ -myc-Tumoren in den Wildtyp-Mäusen gründet einerseits auf der tumorspezifischen Kopplung des Onkogens c-myc mit dem Immunglobulin-schwere-Ketten-Enhancer E $\mu$  (siehe Kap. 5.1). Andererseits ist aber eben auch die zusätzliche Anreicherung von spontanen genetischen und/oder epigenetischen Aberrationen in den E $\mu$ -myc-transgenen-Mäusen ursächlich. Diese erworbenen Aberrationen scheinen so potent zu sein, dass die putativ immun-suppressive Eigenschaft von PDL2 in den durchgeführten *in vivo* Versuchen nicht nachweisbar war. Mit anderen Worten: der Zeitraum von der Injektion der Tumorzellen bis zum Tod der Tiere könnte in diesem Tumormodell zu kurz sein, um einen durch PDL2 induzierten negativen regulatorischen Effekt auf die T-Zellfunktion oder eine Apoptoseinduktion in T-TILs nachweisen zu können.

Um dieser These nachzugehen, müsste ein anderes, weniger rasch wachsendes Tumormodell eingesetzt werden. Es würde sich das E $\mu$ -N-myc-Mausmodell anbieten. Hierbei erkranken gesunde Wildtyp-Mäuse erst 3 - 4 Monate nach i.v.-Injektion der Lymphomzellen. Weiterhin sind E $\mu$ -N-myc-transgene-Mäuse für das Onkogen N-myc transgen und liegen im Inzuchtstamm C57Bl/6 vor. N-myc ist ein Transkriptionsfaktor, dessen onkogenes Potential für verschiedene humane Tumoren nachgewiesen wurde. Durch die Kopplung des Onkogens N-myc mit dem Immunglobulin-schwere-Ketten-Enhancer E $\mu$  wird eine konstitutive, auf die B-Zellreihe beschränkte, N-myc-Expression erzielt. Die B-Zell-Entwicklung wird aufgrund einer nur gering erhöhten N-myc-Expression nur leicht gestört und es resultiert im Gegensatz zum E $\mu$ -myc-Mausmodell ein niedrig maligner B-Zell-Tumor. Wesentliche Kennzeichen der resultierenden Tumorerkrankung sind die Vergrößerung von Lymphknoten und Milz (151).

Dem Immunsystem von Wildtyp-Mäusen, die mit dem weniger aggressiven E $\mu$ -N-myc-Tumor konfrontiert werden, stünde mehr Zeit für die Auseinandersetzung mit tumorspezifischen Antigenen und den Aufbau einer effektiven Immunantwort zur Verfügung. Es könnten unter Umständen mehr tumorspezifische T-Zellen gebildet werden und in das Tumorgewebe vordringen. Eine stärkere Immunantwort würde im

Umkehrschluss das Potential einer durch PDL2 induzierten Inhibition des Immunsystems erhöhen und somit PDL2 bedingte Effekte besser messbar machen.

## 5.7 Therapie und Ausblick

In den vergangenen Jahren hat sich die Sichtweise der Tumorforschung, bei der die entartete Tumorzelle im Fokus der Betrachtung stand, gewandelt. Klar wurde, dass ein maligner Tumor nicht nur eine Ansammlung genetisch, phänotypisch und funktionell pathologisch veränderter Zellen darstellt, sondern ein komplexes Gewebe ist, dessen zelluläre Komponenten miteinander und mit dem umliegenden Gewebe in ständiger Wechselwirkung stehen. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff Tumormikroumgebung oder -milieu geprägt. Die Tumormikroumgebung setzt sich aus Tumorzellen, Immunzellen, Stromazellen und extrazellulärer Matrix zusammen und bildet den Ort an dem der neoplastische Prozess vorrangig abläuft. Hervorzuheben ist, dass es sich eben nicht um ein unidirektionales System handelt in dem die in der Tumorzelle ablaufenden Prozesse allein für die Tumorentstehung verantwortlich sind. Es wurde vielmehr gezeigt, dass Entzündungszellen und das umgebende Stroma eine entscheidende Rolle für die Karzinogenese spielen. So können sie beispielsweise für die Bildung von Blutgefäßen und Wachstumsfaktoren verantwortlich sein und das Tumorwachstum fördern (152) (153) (154).

Ein Weg, über den Tumorzellen ihre Tumormikroumgebung beeinflussen, ist die Expression von ko-inhibitorischen B7-Molekülen. Über diese können sie T-Zell-Antworten abschwächen oder begrenzen und so eine Anti-Tumor-Antwort des Immunsystems unterdrücken (155) (48) (156). Im Rahmen dieser Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass von E $\mu$ -myc-Lymphomzellen exprimiertes PDL2 hemmend auf die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen wirkt.

Da ko-inhibitorische B7-Moleküle somit eine relevante Rolle für die Tumorentstehung *in vivo* spielen könnten, stellen sie einen potentiell wichtigen Angriffspunkt in der Immuntherapie von Tumoren dar. So könnte eine Immuntherapie basierend auf Antikörpern gegen ko-inhibitorische B7-Moleküle bzw. gegen ihre entsprechenden Rezeptoren aus der CD28-Familie einen vielversprechenden Versuch darstellen, um Immunantworten gegen Tumorgewebe zu verstärken bzw. „Tumor-Escape“-Mechanismen zu brechen. Unter der Maßgabe, hocheffektive aber dennoch sichere Therapiemethoden zu etablieren, haben zwei vielversprechende

präklinische Ansätze Eingang in aktuelle klinische Studien gefunden. Hierzu zählen die zwei gegen den Rezeptor CTLA-4 gerichteten humanen Antikörper MDX-010 (Ipilimumab) der Firma Medarex/Bristol-Myers Squibb (New York, USA) und CP-675,206 (Tremelimumab) der Firma Pfizer (New York, USA). Ihre Wirkung wurde an verschiedenen Humantumoren getestet. Unter anderem konnten Phase-I- und -II-Studien feststellen, dass eine anti-CTLA-4-Therapie bei malignem Melanom zu teilweisem (*partial response*) bzw. vollständigem Ansprechen (*complete response*) der Tumoren führen kann (157) (158).

Weiterhin ist der gegen den Rezeptor PD1 gerichtete Antikörper CT-011 der Firma CureTech Ltd. (Yavne, Israel) zu nennen. In einer kürzlich veröffentlichten Phase-I-Studie wurden Pharmakokinetik und Sicherheit dieses humanisierten monoklonalen IgG1-Antikörpers dargestellt. Die Studiauswertung ergab, dass der Antikörper gut verträglich ist, zu einem nachhaltigen Anstieg der CD4-T-Zellen im Blut der Patienten führte sowie bei einem der 17 Patienten eine komplette Remission bewirkte (159). Aktuell befindet sich eine Phase-II-Studie zur Sicherheit und Effektivität von CT-011 bei Patienten mit DLBCL nach autologer Stammzelltransplantation im Aufbau. Da auch PMBL-Patienten eingeschlossen werden, wird das Ergebnis der Studie auch zeigen, ob diese Patientengruppe von einer Therapie mit CT-011 profitieren kann. Dennoch bleibt es zukünftigen groß angelegten randomisierten Studien vorbehalten, genaue Aussagen über die Wirksamkeit der genannten Antikörper zu treffen.

Das ein gegen PDL2 gerichteter Antikörper Tumorstadium hemmen könnte, lässt sich aus den *in vitro* erbrachten Ergebnissen schließen. Erste Hinweise auf die Effektivität eines solchen Ansatzes in der Behandlung von Tumorstadium könnte eine aktuell im Aufbau befindliche Phase-I-Studie mit dem gegen PDL2 gerichteten Antikörper rHIgM12B7 zur Therapie des malignen Melanoms liefern. Wie in Phase-I-Studien üblich wird hierbei insbesondere auf Verträglichkeit und Sicherheit des Antikörpers geachtet werden. Denn auch wenn der milde Phänotyp von PDL2-Knock-out-Mäusen das Auftreten von schweren Autoimmunerkrankungen unwahrscheinlich macht, muss diese potentielle Nebenwirkung einer Antagonisierung von PDL2 aufgrund des wegfallenden inhibitorischen Einflusses auf das Immunsystem in klinischen Studien ausgeschlossen werden (160) (161) (162) (163). Weiterhin ist noch nicht klar, inwieweit die kontroversen Beobachtungen, dass PDL2 eben nicht nur ko-inhibitorische Eigenschaften, sondern

vermutlich über einen bisher noch nicht identifizierten PD1-unabhängigen Rezeptor ko-stimulatorisch wirkt, zu deuten sind (69) (162) (36) (160).

Aktuelle Arbeiten zeigen, dass es neben den genannten ko-inhibitorischen B7-Molekülen bzw. ihren entsprechenden Rezeptoren aus der CD28-Familie ein Netzwerk inhibierender Mechanismen gibt, die in der Summe möglicherweise die Ausbildung einer Anti-Tumor-Antwort verhindern und Tumorwachstum letztlich ermöglichen (164). Dementsprechend erscheint es für eine effektive Therapie sinnvoll in mehrere inhibierende Signalwege einzugreifen. Um die Nebenwirkungen einer solchen kombinierten Immuntherapie gering zu halten und den therapeutischen Nutzen zu maximieren, muss der Individualität eines jeden Patienten, aber auch der jeder Tumorentität große Beachtung geschenkt werden. So wird es von Nöten sein, für jeden Patienten die für die Abschwächung der anti-Tumor-T-Zell-Antwort relevanten Signalwege einerseits und die Unterschiede in der Dominanz einzelner „Tumor-Escape“-Mechanismen in Abhängigkeit vom Tumortyp andererseits vor Therapiebeginn zu definieren (165).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass das ko-inhibitorische B7-Molekül PDL2 für das PMBL einen wichtigen „Tumor-Escape“-Mechanismus darstellen könnte. In einem gegen PDL2 gerichteten Antikörper könnte dementsprechend für PMBL-Patienten großes therapeutisches Potential liegen. Eine Bestätigung hierfür müssen zukünftige klinische Studien erbringen.

## 6. Zusammenfassung

Für das primäre mediastinale B-Zell-Lymphom (PMBL) konnte mit Hilfe von Genchipanalysen ein spezifisches Genexpressionsprofil ermittelt werden. Hierbei wurde für das Molekül PDL2 eine stark erhöhte Expression nachgewiesen.

Für PDL2 ist ein negativer regulatorischer Effekt auf die T-Zellfunktion beschrieben. Diesen könnten Tumorzellen nutzen, um einer tumorspezifischen T-Zellantwort Tumor-infiltrierender T-Zellen (T-TILs) zu entgehen. Ob PDL2-exprimierende PMBL-Zellen in den Zellzyklus von T-TILs eingreifen können und möglicherweise Apoptose oder Zellzyklusarrest in T-TILs induzieren, wurde noch nicht erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Retroviren mit dem Zielgen PDL2 zur Transduktion von primären B-Lymphomzellen hergestellt. Die transduzierten Lymphomzellen wurden *in vitro* und *in vivo* in Maus-Transfermodellen erforscht.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten mit den retroviralen Konstrukten pMSCV-2.2-IRES-GFP (Leervektor „mock“) und pMSCV-2.2-IRES-GFP-PDL2 retrovirale Überstände mit Hilfe der Verpackungszelllinie Plat-E gewonnen werden. Mit diesen wurden primäre E $\mu$ -myc-Lymphomzellen erfolgreich und reproduzierbar transduziert. Die spezifische Überexpression von PDL2 und GFP in den transduzierten Zellen wurde im FACS nachgewiesen.

*In vitro* wurde gezeigt, dass PDL2 hemmend auf die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen wirkt. Die *in vivo* Versuche zeigten, dass das E $\mu$ -myc-Tumormodell aufgrund der hohen Teilungsrate der E $\mu$ -myc-Lymphomzellen ungeeignet ist, um einen durch PDL2 induzierten negativen regulatorischen Effekt oder eine Apoptoseinduktion in T-TILs nachweisen zu können.

Die hier dargestellten vielversprechenden Ergebnisse der *in vitro* Versuche könnten für eine mögliche Entwicklung therapeutisch einsetzbarer Inhibitoren relevant sein.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Lichtenstein AK, Levine A, Taylor CR, Boswell W, Rossman S, Feinstein DI, et al. Primary mediastinal lymphoma in adults. *Am J Med.* 1980 Apr;68(4):509-14.
2. Miller JB, Variakojis D, Bitran JD, Sweet DL, Kinzie JJ, Golomb HM, et al. Diffuse histiocytic lymphoma with sclerosis: a clinicopathologic entity frequently causing superior venacaval obstruction. *Cancer.* 1981 Feb 15;47(4):748-56.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994 Sep 1;84(5):1361-92.
4. Savage KJ. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Oncologist.* 2006 May;11(5):488-95.
5. Mazzarotto R, Boso C, Vianello F, Aversa MS, Chiarion-Sileni V, Trentin L, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma: results of intensive chemotherapy regimens (MACOP-B/VACOP-B) plus involved field radiotherapy on 53 patients. A single institution experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Jul 1;68(3):823-9.
6. Boleti E, Johnson PW. Primary mediastinal B-cell lymphoma. *Hematol Oncol.* 2007 Dec;25(4):157-63.
7. Barth TF, Leithauser F, Joos S, Bentz M, Moller P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? *Lancet Oncol.* 2002 Apr;3(4):229-34.
8. Moller P, Moldenhauer G, Momburg F, Lammler B, Eberlein-Gonska M, Kiesel S, et al. Mediastinal lymphoma of clear cell type is a tumor corresponding to terminal steps of B cell differentiation. *Blood.* 1987 Apr;69(4):1087-95.
9. Kanavaros P, Gaulard P, Charlotte F, Martin N, Ducos C, Lebezu M, et al. Discordant expression of immunoglobulin and its associated molecule mb-1/CD79a is frequently found in mediastinal large B cell lymphomas. *Am J Pathol.* 1995 Mar;146(3):735-41.
10. Ritz O, Leithauser F, Hasel C, Bruderlein S, Ushmorov A, Moller P, et al. Downregulation of internal enhancer activity contributes to abnormally low immunoglobulin expression in the MedB-1 mediastinal B-cell lymphoma cell line. *J Pathol.* 2005 Feb;205(3):336-48.

11. Moller P, Bruderlein S, Strater J, Leithauser F, Hasel C, Bataille F, et al. MedB-1, a human tumor cell line derived from a primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2001 May 1;92(3):348-53.
12. Leithauser F, Bauerle M, Huynh MQ, Moller P. Isotype-switched immunoglobulin genes with a high load of somatic hypermutation and lack of ongoing mutational activity are prevalent in mediastinal B-cell lymphoma. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2762-70.
13. Menestrina F, Chilosi M, Bonetti F, Lestani M, Scarpa A, Novelli P, et al. Mediastinal large-cell lymphoma of B-type, with sclerosis: histopathological and immunohistochemical study of eight cases. *Histopathology*. 1986 Jun;10(6):589-600.
14. Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet*. 1987 Dec 26;2(8574):1488-91.
15. Hofmann WJ, Momburg F, Moller P. Thymic medullary cells expressing B lymphocyte antigens. *Hum Pathol*. 1988 Nov;19(11):1280-7.
16. Moller P, Lammler B, Herrmann B, Otto HF, Moldenhauer G, Momburg F. The primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type has variable defects in MHC antigen expression. *Immunology*. 1986 Nov;59(3):411-7.
17. Lazzarino M, Orlandi E, Astori C, Paulli M, Magrini U, Bernasconi C. A low serum beta 2-microglobulin level despite bulky tumor is a characteristic feature of primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: implications for serologic staging. *Eur J Haematol*. 1996 Oct;57(4):331-3.
18. Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Bruderlein S, du Manoir S, Bentz M, et al. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood*. 1996 Feb 15;87(4):1571-8.
19. Bentz M, Barth TF, Bruderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, et al. Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001 Apr;30(4):393-401.
20. Joos S, Kupper M, Ohl S, von Bonin F, Mechttersheimer G, Bentz M, et al. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res*. 2000 Feb 1;60(3):549-52.

21. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4283-97.
22. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):3871-9.
23. Calvo KR, Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Jaffe ES. Molecular profiling provides evidence of primary mediastinal large B-cell lymphoma as a distinct entity related to classic Hodgkin lymphoma: implications for mediastinal gray zone lymphomas as an intermediate form of B-cell lymphoma. *Adv Anat Pathol*. 2004 Sep;11(5):227-38.
24. Rudiger T, Jaffe ES, Delsol G, deWolf-Peeters C, Gascoyne RD, Georgii A, et al. Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases ('grey zone' lymphoma). *Ann Oncol*. 1998;9 Suppl 5:S31-8.
25. Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, Sorbara L, Alonso MA, Raffeld M, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: the missing link between classic Hodgkin's lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Nov;29(11):1411-21.
26. Zarate-Osorno A, Medeiros LJ, Longo DL, Jaffe ES. Non-Hodgkin's lymphomas arising in patients successfully treated for Hodgkin's disease. A clinical, histologic, and immunophenotypic study of 14 cases. *Am J Surg Pathol*. 1992 Sep;16(9):885-95.
27. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol*. 1999 Jan;111(1 Suppl 1):S8-12.
28. Dreyling M, Hiddemann W, Trümper L, Pfreundschuh M. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: Leitlinien Maligne Lymphome. 2007 [updated 2007; cited 2009/10/12]; Available from: <http://www.dgho.de/informationen/leitlinien/lymphome/Maligne%20Lymphome.pdf>.
29. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jan 24;346(4):235-42.

30. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5027-33.
31. Zinzani PL, Martelli M, Bertini M, Gianni AM, Devizzi L, Federico M, et al. Induction chemotherapy strategies for primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a retrospective multinational study on 426 previously untreated patients. *Haematologica*. 2002 Dec;87(12):1258-64.
32. Todeschini G, Secchi S, Morra E, Vitolo U, Orlandi E, Pasini F, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMLBCL): long-term results from a retrospective multicentre Italian experience in 138 patients treated with CHOP or MACOP-B/VACOP-B. *Br J Cancer*. 2004 Jan 26;90(2):372-6.
33. Savage KJ, Al-Rajhi N, Voss N, Paltiel C, Klasa R, Gascoyne RD, et al. Favorable outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma in a single institution: the British Columbia experience. *Ann Oncol*. 2006 Jan;17(1):123-30.
34. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003 Sep 15;198(6):851-62.
35. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):261-8.
36. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med*. 2001 Apr 2;193(7):839-46.
37. Ford WL. Lymphocyte migration and immune responses. *Prog Allergy*. 1975;19:1-59.
38. Pabst R, Binns RM. Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: several mechanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo. *Immunol Rev*. 1989 Apr;108:83-109.
39. Abernethy NJ, Hay JB. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph: physiological considerations and molecular mechanisms. *Lymphology*. 1992 Mar;25(1):1-30.

40. Ager A. Lymphocyte recirculation and homing: roles of adhesion molecules and chemoattractants. *Trends Cell Biol.* 1994 Sep;4(9):326-33.
41. Westermann J, Bode U. Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death. *Immunol Today.* 1999 Jul;20(7):302-6.
42. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1987 Feb 1;165(2):302-19.
43. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med.* 1991 Mar 1;173(3):721-30.
44. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Sugita K, Freedman AS, Morimoto C, et al. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 1;88(15):6575-9.
45. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature.* 1992 Apr 16;356(6370):607-9.
46. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature.* 1987 Jul 16-22;328(6127):267-70.
47. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science.* 1995 Nov 10;270(5238):985-8.
48. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004 May;4(5):336-47.
49. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1027-34.
50. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999 Dec;5(12):1365-9.

51. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol.* 2001 Mar;2(3):269-74.
52. Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity.* 2003 Jun;18(6):849-61.
53. Wang S, Zhu G, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, Ni J, et al. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood.* 2000 Oct 15;96(8):2808-13.
54. Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity.* 1999 Oct;11(4):423-32.
55. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature.* 1999 Dec 16;402(6763):827-32.
56. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, Fouser LA, et al. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1653-7.
57. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:29-53.
58. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-48.
59. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ, et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol.* 1993 Oct 1;151(7):3489-99.
60. Wang S, Chen L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol.* 2004 Feb;1(1):37-42.
61. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007 Jul;19(7):813-24.
62. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992 Nov;11(11):3887-95.

63. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):765-72.
64. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13866-71.
65. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):945-54.
66. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics*. 1994 Oct;23(3):704-6.
67. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Agostino MJ, Graham JR, Chen S, et al. Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. *Genomics*. 2001 Dec;78(3):155-68.
68. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999 Aug;11(2):141-51.
69. Liu X, Gao JX, Wen J, Yin L, Li O, Zuo T, et al. B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J Exp Med*. 2003 Jun 16;197(12):1721-30.
70. Nguyen LT, Radhakrishnan S, Ciric B, Tamada K, Shin T, Pardoll DM, et al. Cross-linking the B7 family molecule B7-DC directly activates immune functions of dendritic cells. *J Exp Med*. 2002 Nov 18;196(10):1393-8.
71. Radhakrishnan S, Nguyen LT, Ciric B, Flies D, Van Keulen VP, Tamada K, et al. Immunotherapeutic potential of B7-DC (PD-L2) cross-linking antibody in conferring antitumor immunity. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64(14):4965-72.
72. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 1909;5:273-90.
73. Burnet M. Cancer: a biological approach. *Br Med J*. 1957 Apr 13;1(5023):841-7.

74. Thomas L. In *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. HS Lawrence, ed (New York: Hoeber-Harper). 1959:529-32.
75. Old LJ, Boyse EA. *Immunology of Experimental Tumors*. *Annu Rev Med*. 1964;15:167-86.
76. Klein G. Tumor antigens. *Annu Rev Microbiol*. 1966;20:223-52.
77. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1-27.
78. Cordon-Cardo C, Fuks Z, Drobnjak M, Moreno C, Eisenbach L, Feldman M. Expression of HLA-A,B,C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Cancer Res*. 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6372-80.
79. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol*. 2003 Jun;195(3):346-55.
80. Botti C, Seregini E, Ferrari L, Martinetti A, Bombardieri E. Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression. *Int J Biol Markers*. 1998 Apr-Jun;13(2):51-69.
81. Sotomayor EM, Borrello I, Rattis FM, Cuenca AG, Abrams J, Staveley-O'Carroll K, et al. Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):1070-7.
82. Vesosky B, Hurwitz AA. Modulation of costimulation to enhance tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 Nov;52(11):663-9.
83. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 15;11(8):2947-53.
84. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3360-5.
85. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2151-7.

86. Suzuki Y, Craigie R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Mar;5(3):187-96.
87. Lois C, Refaeli Y, Qin XF, Van Parijs L. Retroviruses as tools to study the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001 Aug;13(4):496-504.
88. Albritton LM, Tseng L, Scadden D, Cunningham JM. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell.* 1989 May 19;57(4):659-66.
89. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8392-6.
90. Eglitis MA. Positive selectable markers for use with mammalian cells in culture. *Hum Gene Ther.* 1991 Fall;2(3):195-201.
91. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:509-44.
92. Martinez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol.* 1999 Oct;10(5):458-64.
93. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
94. Feig C, Peter ME. How apoptosis got the immune system in shape. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37 Suppl 1:S61-70.
95. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature.* 1994 Nov 3;372(6501):100-3.
96. Norvell A, Mandik L, Monroe JG. Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J Immunol.* 1995 May 1;154(9):4404-13.
97. Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nat Immunol.* 2003 Mar;4(3):255-60.
98. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992 Apr 1;148(7):2207-16.
99. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994 Sep 1;84(5):1415-20.

100. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):793-800.
101. Strasser A, Harris AW, Cory S. E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene.* 1993 Jan;8(1):1-9.
102. Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 1994 Aug 1;13(15):3487-95.
103. Seldin DC. New models of lymphoma in transgenic mice. *Curr Opin Immunol.* 1995 Oct;7(5):665-73.
104. Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Aug 15;416(2):129-36.
105. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature.* 1985 Dec 12-18;318(6046):533-8.
106. Schmitt CA, McCurrach ME, de Stanchina E, Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev.* 1999 Oct 15;13(20):2670-7.
107. Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 2000 Jun;7(12):1063-6.
108. Bradley LM, Clarke J, Mille A. Selected Methods in cellular Immunology. Michell B, Shiigi S, editors. New York: WH Freedman and Company; 1980.
109. Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem.* 2002 Jun 19;97(2-3):159-72.
110. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science.* 1990 Jun 22;248(4962):1517-23.
111. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* 1992 Mar 6;68(5):855-67.

112. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992 Mar 6;68(5):869-77.
113. Spanopoulou E. Cellular and molecular analysis of lymphoid development using Rag-deficient mice. *Int Rev Immunol*. 1996;13(4):257-88.
114. Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol*. 1998 Feb;76(1):34-40.
115. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51.
116. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 1;10(15):5094-100.
117. Scarpa A, Moore PS, Rigaud G, Inghirami G, Montresor M, Menegazzi M, et al. Molecular features of primary mediastinal B-cell lymphoma: involvement of p16INK4A, p53 and c-myc. *Br J Haematol*. 1999 Oct;107(1):106-13.
118. Scarpa A, Borgato L, Chilosi M, Capelli P, Menestrina F, Bonetti F, et al. Evidence of c-myc gene abnormalities in mediastinal large B-cell lymphoma of young adult age. *Blood*. 1991 Aug 1;78(3):780-8.
119. Alexander WS, Bernard O, Langdon WY, Harris AW, Adams JM, Cory S. Oncogene cooperation and B-lymphoid tumorigenesis in Emu-myc transgenic mice. *Haematol Blood Transfus*. 1989;32:423-7.
120. Alexander WS, Bernard O, Cory S, Adams JM. Lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice can involve ras mutations. *Oncogene*. 1989 May;4(5):575-81.
121. D'Cruz CM, Gunther EJ, Boxer RB, Hartman JL, Sintasath L, Moody SE, et al. c-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations. *Nat Med*. 2001 Feb;7(2):235-9.
122. Mori S, Rempel RE, Chang JT, Yao G, Lagoo AS, Potti A, et al. Utilization of pathway signatures to reveal distinct types of B lymphoma in the E micro-myc

- model and human diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 2008 Oct 15;68(20):8525-34.
123. Langdon WY, Harris AW, Cory S, Adams JM. The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice. *Cell.* 1986 Oct 10;47(1):11-8.
124. Kelly GL, Rickinson AB. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:277-84.
125. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
126. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 May 24;411(6836):494-8.
127. Muller G, Hopken UE, Lipp M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol Rev.* 2003 Oct;195:117-35.
128. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 2008 Aug 28;267(2):226-44.
129. Corcione A, Ottonello L, Tortolina G, Facchetti P, Airoidi I, Guglielmino R, et al. Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Apr 19;92(8):628-35.
130. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):50-6.
131. Pals ST, de Gorter DJ, Spaargaren M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood.* 2007 Nov 1;110(9):3102-11.
132. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006 Mar 1;107(5):1761-7.
133. Hopken UE, Foss HD, Meyer D, Hinz M, Leder K, Stein H, 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 Feb 15;99(4):1109-16.
134. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, Alfonso-Perez M, Sala-Valdes M, De Soria VG, et al. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary

- lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol.* 2004 Aug;76(2):462-71.
135. Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, Scharli P, Laissue JA, Baggiolini M, et al. BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest.* 1999 Nov;104(10):R49-54.
  136. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jul;4(7):540-50.
  137. Rehm A, Anagnostopoulos I, Gerlach K, Broemer M, Scheiderei C, Johrens K, et al. Identification of a chemokine receptor profile characteristic for mediastinal large B-cell lymphoma. *Int J Cancer.* 2009 Nov 15;125(10):2367-74.
  138. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med.* 2001 Jul 2;194(1):45-56.
  139. Eilers M. Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol Cells.* 1999 Feb 28;9(1):1-6.
  140. Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene.* 1999 May 13;18(19):3004-16.
  141. Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:575-600.
  142. Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene.* 1991 Oct;6(10):1915-22.
  143. Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science.* 1997 Nov 14;278(5341):1305-9.
  144. Klefstrom J, Vastrik I, Saksela E, Valle J, Eilers M, Alitalo K. c-Myc induces cellular susceptibility to the cytotoxic action of TNF-alpha. *EMBO J.* 1994 Nov 15;13(22):5442-50.
  145. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:119-50.
  146. Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004 Apr;4(4):301-8.

147. Shan X, Czar MJ, Bunnell SC, Liu P, Liu Y, Schwartzberg PL, et al. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol Cell Biol.* 2000 Sep;20(18):6945-57.
148. Seminario MC, Wange RL. Signaling pathways of D3-phosphoinositide-binding kinases in T cells and their regulation by PTEN. *Semin Immunol.* 2002 Feb;14(1):27-36.
149. Riley JL, Mao M, Kobayashi S, Biery M, Burchard J, Cavet G, et al. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11790-5.
150. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):114-25.
151. Sheppard RD, Samant SA, Rosenberg M, Silver LM, Cole MD. Transgenic N-myc mouse model for indolent B cell lymphoma: tumor characterization and analysis of genetic alterations in spontaneous and retrovirally accelerated tumors. *Oncogene.* 1998 Oct 22;17(16):2073-85.
152. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 2007 Feb;7(2):139-47.
153. Bissell MJ, Labarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell.* 2005 Jan;7(1):17-23.
154. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):332-7.
155. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):467-77.
156. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol.* 2002 Feb;2(2):116-26.
157. Weber J. Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events. *Oncologist.* 2007 Jul;12(7):864-72.
158. Fong L, Small EJ. Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment. *J Clin Oncol.* 2008 Nov 10;26(32):5275-83.
159. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, Leiba M, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody

- interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2008 May 15;14(10):3044-51.
160. Shin T, Yoshimura K, Crafton EB, Tsuchiya H, Housseau F, Koseki H, et al. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med.* 2005 May 16;201(10):1531-41.
161. Liang SC, Greenwald RJ, Latchman YE, Rosas L, Satoskar A, Freeman GJ, et al. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 2006 Jan;36(1):58-64.
162. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, Daugherty B, Chute H, Holst P, et al. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 1;103(31):11695-700.
163. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med.* 2006 Apr 17;203(4):883-95.
164. Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison JP. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):67-87.
165. Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):126-44.

## 8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Betreuern Frau PD Dr. Uta E. Höpken und Herrn Dr. Armin Rehm für die Bereitstellung des interessanten Themas und die herausragende und überaus freundliche Betreuung bedanken. Sie hatten stets ein offenes Ohr für mich und gaben mir die Möglichkeit, viele Erfahrungen auf dem spannenden Feld der Immunologie zu sammeln und meine Leidenschaft für die Wissenschaft zu vertiefen.

Herrn Prof. Dr. Daniel danke ich, dass er sich als betreuender Hochschullehrer zur Verfügung gestellt hat.

Herrn PD Dr. Martin Lipp und Herrn Prof. Dr. Dörken danke ich dafür, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Dissertation in Ihren Forschungsgruppen zu absolvieren.

Herrn Prof. Dr. Uckert, seiner technischen Assistentin Uta Fischer und seiner Doktorandin Simone Reuss danke ich für die Einführung in die Technik des Herstellens von Retroviren.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Krebshilfe und der Berliner Krebsgesellschaft für die Unterstützung meines Dissertationsprojektes.

Meinen Kollegen in den Forschungsgruppen Lipp und Dörken danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre. Ich habe mich bei ihnen von Anfang an sehr wohl gefühlt und konnte immer mit ihrer Hilfsbereitschaft rechnen. Insbesondere möchte ich mich bei Angela Mensen bedanken, die mir mit vielen Gesprächen und Ihrer fachlichen Kompetenz hilfsbereit zur Seite stand. Bedanken möchte ich mich auch bei Susann Winter, Dr. Jörg Rossbacher und Malika Janbein, mit denen ich sehr gerne das Zimmer teilte und die mir viele Denkanstöße geben konnten. Mein Dank gilt auch Bernhard Stehrer für die nette Zusammenarbeit.

Für die ausdauernde praktische Hilfe und die vielen netten Gespräche seien Katrin Räbel, Kerstin Krüger, Kerstin Gerlach, Andra Eisenmann und Jenny Grobe gedankt. Dr. Hans-Peter Rahn danke ich für die kompetente Unterstützung am Zellsorter.

Ebenso sei all den Kollegen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Freund Jens Liebich danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Nicht zuletzt gilt der Dank meinen Eltern und meiner Schwester für ihre immerwährende liebevolle Unterstützung und natürlich meiner lieben Frau Kristina, die mich motivierte, bestärkte und mit ihrem Vertrauen auch beflügeln konnte. Sie stand mir auch in den schwierigen Zeiten dieser Arbeit stets aufmunternd zur Seite.

## **9. Lebenslauf**

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

## 10. Publikationsliste

Journal:

Blood. 2011 Jul 28;118(4):1020-33.

Titel:

Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs

Autoren:

Armin Rehm<sup>1,2</sup>, Angela Mensen<sup>1</sup>, Kristina Schradi<sup>3</sup>, Kerstin Gerlach<sup>1</sup>, Stefanie Wittstock<sup>1</sup>, Susann Winter<sup>3</sup>, **Gilbert Büchner**<sup>3</sup>, Bernd Dörken<sup>1,2</sup>, Martin Lipp<sup>3</sup>, Uta E. Höpken<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch, Forschungsgruppe Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie

<sup>2</sup>Charité – Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Campus Virchow-Klinikum

<sup>3</sup>Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch, Forschungsgruppe Molekulare Tumorgenetik und Immungenetik

## 11. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Gilbert Büchner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Untersuchungen zur pathogenetischen Funktion des Oberflächenmarkers PDL2 für das PMBL unter Verwendung des retroviralen Gentransfers** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 25.11.2010