

Universität Ulm  
Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

# **Die Rolle des Notchsignalweges in hochmalignen B-Zell Lymphomen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Daniel Kutny  
aus Straubing

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Cornelia Brunner

Tag der Promotion: 25.10.2013

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. Lymphome.....	1
1.2. Der Notchsignalweg .....	5
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>15</b>
2.1. Material.....	15
2.2. Methoden.....	21
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
3.1. Untersuchung von Zelllinien .....	35
3.2. Untersuchung von PMBCL- und DLBCL-Fällen .....	48
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>57</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC-DLBCL	Activated B-Cell DLBCL
B-ALL	B-Zellen akute lymphatische Leukämie
B-CLL	B-Zellen chronische lymphatische Leukämie
bHLH	basischen helix-loop-helix
Bp	Basenpaare
CADASIL	Cerebral autosomal dominanten Arteriopathie mit subcorticalen Infarkten und Leukoenzephalopathie
CBF-1	C Promotor Bindungsfaktor 1
cDNA	complementary DNA
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CoA	Co-Aktivator
CSL	CBF1/Su(H)/Lag1
Ct-Wert	Cycle threshold Wert
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphome
DSL	Delta/Serrate/Lag-2
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EGF	Epidermal-growth-factor-like
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GC-DLBCL	Germinal Center DLBCL)
GEP	Gene Expression Profiling
GSI	Gamma-Sekretase-Inhibitor
HAC	Histonacetyltransferase
HES1	Hairy; Enhancer of Split 1
HRP-Enzym	Horseradish-Peroxidase-Enzym
HRS-Zellen	Hodgkin und Reed-Sternberg Zellen
HRT	Hairy-Related Transcription Factor
Ig	Immunglobulin
JNK	c-jun N-terminale Kinase
LNR	Lin-12/Notch repeats
LPHL	Lymphozyten prädominantes Hodgkin-Lymphom
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MAML-2	Mastermind-like 2

NCR	Notch Cytokin Response
NDUFB1	NADH dehydrogenase ubiquinone 1 beta
Nec	Notch extracellular
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
Nic	Notch intracellular
NLS	Nukleäres Lokalisierungssignal
Ntm	Notch transmembran
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PEST	Prolin, Glutamat, Serin, Threonin
PMBCL	Primäres mediastinales B-Zell Lymphom
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RAM	RBP-J $\kappa$ assoziiertes Modul
SMRT	Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors
TACE	Tumor-Necrosis Factor $\alpha$ -converting Enzyme
TAD	Transkriptionelle Aktivierungsdomänen
T-ALL	T-Zellen akute lymphatische Leukämie
TCR $\beta$	T-Cell Receptor $\beta$
VWC	von Willebrand Faktor Typ C Domäne

# 1. Einleitung

## 1.1. *Lymphome*

### 1.1.1. **Maligne Lymphome**

Maligne Lymphome bezeichnen monoklonale Neoplasien von Zellen aus dem lymphatischen System. Lymphome haben ihren Ursprung im lymphatischen Gewebe, wie Lymphknoten, Tonsillen oder Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT) und können im fortgeschrittenen Stadien auch disseminierend extralymphatische Gewebe infiltrieren. Die Einteilung des malignen Lymphoms in dieser Arbeit erfolgt nach der WHO-Klassifikation von 2008 (Swerdlow et al. 2008). Hier erfolgt die erste Unterteilung in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome. Letztere werden wiederum weiter nach ihrer zellulären Herkunft und nach ihrem Reifegrad in der Lymphopoese unterschieden.

### 1.1.2. **Hodgkin Lymphom**

Das Hodgkin-Lymphom, das schon vor über 150 Jahren als eigene Erkrankung von Sir Thomas Hodgkin beschrieben wurde, ist eine bösartige Erkrankung des Lymphsystems. Epidemiologisch zeigt es einen zweigipfligen Verlauf um das 30. und 60. Lebensjahr. Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer. Meist beginnt ist das Hodgkin-Lymphom primär im Mediastinum lokalisiert und breitet sich zunächst per continuitatem im lymphatischen System aus. Im fortgeschrittenen Stadium werden auch extralymphatische Organe befallen. Die Bestimmung des Tumorstadiums erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation.

Das Hodgkin-Lymphom setzt sich aus morphologisch unterschiedlichen Zellen, den mononukleären Hodgkin-Zellen, den multinukleären Reed-Sternbergzellen und deren Varianten, zusammen. Hodgkin und Reed-Sternberg (HRS) Zellen sind die Diagnose-bestimmenden Zellen des Hodgkin Lymphoms, machen jedoch nur 1–2% der gesamten Tumorzellmasse aus. Der größte Teil des Tumors wird von nicht

malignen Entzündungszellen, wie Lymphozyten, Granulozyten und Stromazellen gebildet (Küppers 2009).

Das selten vorkommende (ca. 5% der Hodgkin-Lymphome) Lymphozyten prädominante Hodgkin-Lymphom (LPHL) wird in der WHO-Klassifikation maligner Lymphome von 2008 als eigener Typ vom klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL) abgegrenzt. Für die vorliegende Arbeit ist nur das cHL von Relevanz und wird daher ausführlicher dargestellt.

### **1.1.3. Klassisches Hodgkin-Lymphom**

Die klassischen Formen des Hodgkin-Lymphoms lassen sich nochmals in 4 Subtypen unterteilen: nodulär-sklerosierende Form (60 – 80%), gemischtzelluläre Form (15%), lymphozytenreiche und -arme Form. Diese Subtypen weisen einen weitgehend übereinstimmenden Phänotyp (CD30+, CD15+, CD79-, CD20-) sowie ein ähnliches klinisches Verhalten auf (Farrell et al. 2011).

Es wird angenommen, dass die HRS-Zellen (Hodgkin und Reed-Sternberg) eine klonale Population von Keimzentrums- oder post-Keimzentrums-B-Zellen präsentieren (Küppers 2009). Ein Grund dafür ist der Nachweis von rearrangierten Immunglobulin (Ig) – Genen und von somatischen Hypermutationen in den Genen der variablen Region der schweren Ig-Ketten (Küppers 2009, Küppers et al. 1994). Beide Veränderungen werden in B-Zellen beobachtet, welche bereits Antigenkontakt in einem Keimzentrum hatten und sich zu reifen, Immunglobuline-produzierenden B-Zellen entwickelten. In HRS-Zellen lässt sich jedoch keine Ig-Produktion nachweisen, wie es für reife B-Zellen üblich wäre (Küppers 2009). Auch fehlt den HRS-Zellen die Expression vieler B-Zell-spezifischer Gene und Oberflächenmarker (Schwering et al. 2003). Dies hat entscheidende Auswirkungen auf die Therapie: HRS-Zellen sind zum Beispiel nicht wie die meisten non-Hodgkin B-Zell-Lymphome für Rituximab (anti-CD20 Antikörper) angreifbar, da der typische B-Zellmarker CD20 in HRS-Zellen selten exprimiert wird. Eine Besonderheit der HRS-Zellen ist ihr Verlust des B-Zell Phänotyps und ihre Herunterregulation von B-Zell spezifischen Genen, mit gleichzeitiger Induktion von B-Zell inadäquaten Genen (Farrell et al. 2011). In wenigen cHLs zeigen die HRS-Zellen sogar ein Rearrangement in den T-Zell-

Rezeptor-Genen statt in den Ig-Genen. Daher wird angenommen, dass ein kleiner Teil der HRS von T-Zellen abstammt (Küppers 2009), (Bräuninger et al. 2006). Eine weitere Besonderheit der HRS-Zellen ist die konstitutive Aktivität des NF- $\kappa$ B-Signalweges (Bargou et al. 1997). *In vitro* Untersuchungen an HRS-Zelllinien, aber auch *in vivo* Versuche an Mäusen beschreiben eine proliferationsfördernde und apoptosehemmende Wirkung von NF- $\kappa$ B (Bargou et al. 1997). Da der NF- $\kappa$ B-Signalweg einen großen Einfluss auf das Zellüberleben hat, ist dieser Signalweg sehr fein reguliert. Ein Regulator von NF- $\kappa$ B, der in HRS-Zellen eine bedeutende Rolle spielt, ist der Notchsignalweg (Schwarzer et al. 2011). In cHL-Zelllinien wurde eine Expression des Notch1-Rezeptors nachgewiesen. Eine Interaktion des Notch1-Rezeptors mit dem Jagged1-Liganden, welcher von Tumor-umgebenden Zellen exprimiert wird, führt nach den Arbeiten von Jundt et al. in den cHL-Zelllinien sowohl zu einer verstärkten Zellproliferation als auch zu einer Apoptoseresistenz (Jundt et al. 2002).

#### **1.1.4. Non-Hodgkin-Lymphome**

Die non-Hodgkin-Lymphome (NHL) stellen hinsichtlich Erscheinung, Prognose und Therapie eine heterogene Gruppe dar. Bezüglich der Herkunft der malignen Zellen werden die NHLs in B- und T-Zelllymphome unterschieden (Swerdlow et al. 2008). In Europa und USA gehen die non-Hodgkin-Lymphome zu ca. 90 % aus B-Zellen und zu ca. 10 % aus T-Zellen hervor. Neoplasien aus Histiocyten und NK-Zellen sind sehr selten. Die B-Zelllymphome werden in weitere Subgruppen unterteilt, von denen das diffuse großzellige B-Zelllymphom die größte Subgruppe darstellt.

#### **1.1.5. Diffuse großzellige B-Zell Lymphome**

Etwa ein Drittel der non-Hodgkin-Lymphome stellt die heterogene Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL) dar (Faris et al. 2009). Morphologisch zeigt sich eine diffuse Proliferation großer B-Zellen, deren Kerngröße mehr als das doppelte eines kleineren Lymphozyten ausmacht. Klinisch fallen die

Patienten durch eine schnell zunehmende Lymphadenopathie auf. Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr.

In der WHO Klassifikation der malignen Lymphome von 2008 werden die DLBCLs in vier spezielle Subtypen unterteilt (Swerdlow et al. 2008), das T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma, das Primary DLBCL of the CNS, das Primary cutaneous DLBCL, leg type, und das EBV-positive DLBCL of the elderly.

Der größte Teil der DLBCLs kann jedoch nicht in die vier speziellen Subtypen eingeteilt werden und wird als DLBCL, not otherwise specified (NOS) bezeichnet. Da diese Gruppe hinsichtlich der Prognose heterogen ist, versucht man diese weiterhin zu differenzieren. Eine vielversprechende Möglichkeit der Einteilung bietet das gene expression profiling (GEP) (Alizadeh et al. 2000, Jaffe 2009). Dabei werden die DLBCLs nach ihrem Zellursprung, den man zum Beispiel anhand des Genexpressionsmusters ermitteln kann, unterteilt. Diese Einteilung unterscheidet zwei Subtypen der DLBCLs: das Keimzentrum B-like DLBCL (germinal center B-cell; GCB), dessen Ursprung eine B-Zelle im Keimzentrum ist, und das aktivierte B-like DLBCL (activated B-cell; ABC), dessen Zellen von post-Keimzentrums-Zellen stammen (Alizadeh et al. 2000). Patienten mit einem GCB-like DLBCL haben ein besseres Outcome nach einer Behandlung mit kombinierter Chemotherapie als Patienten mit einem ABC-like DLBCL (Iqbal et al. 2011, Fu et al. 2008). Im Gegensatz zu der WHO-Klassifikation ist die Prognose hierbei unabhängig vom Internationalen Prognostik Index. (Choi et al. 2009). Eine zuverlässige Subspezifizierung der DLBCLs in GCB- und ABC-like DLBCLs mittels gene expression profiling ist aufgrund einer starken molekularen Heterogenität in der jeweiligen Subgruppe noch schwierig (Alizadeh et al. 2000).

#### **1.1.6. Primäres mediastinales B-Zell Lymphom**

Das primäre mediastinale B-Zell Lymphom (PMBCL) stellt seit der WHO-Klassifikation 2008 für maligne Lymphome eine eigene Entität dar (Swerdlow et al. 2008). In vorherigen Klassifikationen wurde es noch der Gruppe der DLBCLs untergeordnet. Klinisch zeichnet es sich dadurch aus, dass die Lymphadenopathie im Mediastinum beginnt, und sich dann von dort in weitere Lymphsysteme ausbreitet. Es kommt auch

zu einer Infiltration des umliegenden Gewebes, wie z.B. Lunge, Perikard, Brustwand, sowie zu Fernmetastasen (Bishop et al. 1999, van Besien et al. 2001). Betroffen sind meist jüngere Frauen (30-35 Jahre) (Faris et al. 2009).

Interessanterweise lassen sich klinisch und pathologisch viele Gemeinsamkeiten zu dem cHL finden. Klinische Ähnlichkeiten sind mitunter der junge Erkrankungsgipfel, die bevorzugte Erkrankung von Frauen und eine bevorzugte primär mediastinale Manifestation. Histologisch fällt in beiden Gruppen häufig eine Sklerosierung auf (Paulli et al. 1999). Die Unterschiede zwischen den beiden Lymphomentitäten können so gering sein, dass in einigen Fällen eine Abgrenzung nicht möglich ist. Diese Lymphome, die Eigenschaften sowohl von PMBCLs als auch von cHLs enthalten und daher nicht unterschieden werden können, werden als mediastinale Grauzonen-Lymphome bezeichnet (Traverse-Glehen et al. 2005).

Unter anderem teilen sich PMBCLs und cHLs gemeinsame genetische Abnormalitäten, zum Beispiel in den Chromosomen 2p und 9p, die zu einer starken Expression von REL und JAK2 führen kann (Joos et al. 2003, Joos et al. 1996).

Des Weiteren fehlt den HRS-Zellen wie auch den PMBCL-Zellen eine Immunglobulin-Expression, obwohl ein Rearrangement den Ig-Genen stattgefunden hat (Johnson et al. 2008).

Es gibt auch zahlreiche Unterschiede zwischen den beiden Entitäten. Im Gegensatz zu den HRS-Zellen exprimieren die PMBCLs die Transkriptionsfaktoren OCT-2 und BOB.1 sowie den Transkriptionsregulator PU.1, die alle eine entscheidende Rolle bei der Immunglobulin-Produktion spielen. (Pileri et al. 2003, Lamarre et al. 1989). Zudem sind PMBCLs zum großen Teil positiv für die B-Zellmarker CD19, 20, 22, und 79a, welche in cHLs selten exprimiert werden (Faris et al. 2009).

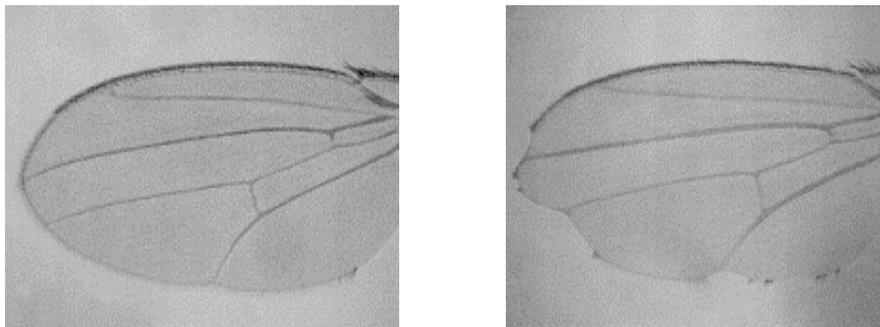
## **1.2. Der Notchsignalweg**

### **1.2.1. Allgemeine Funktion des Notchsignalweges**

Der Notchsignalweg bestehend aus transmembranen Rezeptoren und Liganden ermöglicht in allen tierischen Arten einen interzellulären Kontakt (Lai 2004). Dabei ist er involviert in zahlreichen Entwicklungsprozessen und Zellschicksalsentscheidungen

bei einer Vielzahl von Zelltypen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien (Lai 2004). Er spielt eine wesentliche Rolle bei zentralen Mechanismen wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung und der Ausbildung von Gewebegrenzen sowie auch bei der Regulierung der Organogenese, z. B. der Myogenese, Neurogenese und Hämatopoese (Simpson 1998).

Das Notch-Gen wurde erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Bei den Versuchen zeigten sich beim Notch-defizienten Phänotyp Kerben (Kerbe= engl. notch) am Flügelrand (siehe Abb. 1) (Mohr 1919).



**Abbildung 1: *Drosophila melanogaster* Flügel mit mutiertem Notch-Gen**

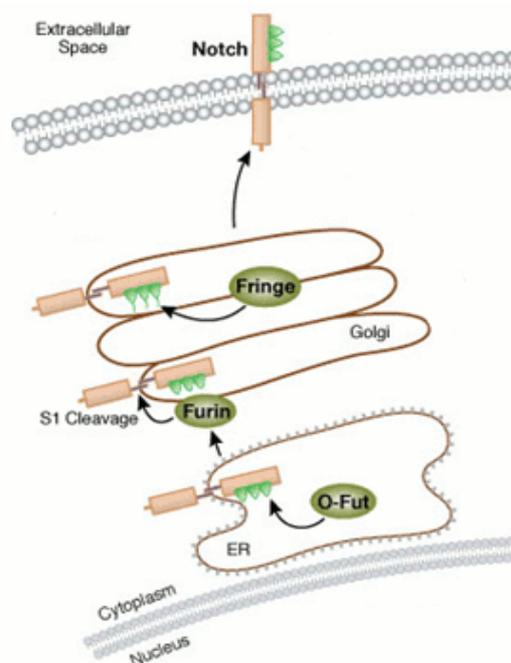
*Drosophila melanogaster* Flügel normal (links) und mit Kerben (notches) am Flügelrand (rechts) bei einem Notch-defizienten Phänotyp; (Abb. 1 nach (Allman et al. 2002))

Während *Drosophila melanogaster* nur über einen Notchrezeptor und zwei Membran-gebundene Liganden, Serrate und Delta, verfügt, haben Säugetiere vier Rezeptoren (Notch1-4) und fünf Liganden: (Jagged1, 2, Delta-like1, 3 und 4) (Lai 2004, Cordle et al. 2008).

### 1.2.2. Prozessierung des Notchrezeptors

Nach der Translation der Notchrezeptor-mRNA wird das Vorläuferprotein, das pre-Notch mit einer Größe von 300 kDa, im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat modifiziert. Dabei wird im ER pre-Notch durch die O-Fucosyl-Transferase fukosyliert (siehe Abb.: 2) (Bray 2006). Knockout-Studien an Mäusen zeigten, dass dies für die Funktion des Notchrezeptors von großer Bedeutung ist. Ohne das O-Fucosyl-Transferase Protein wiesen Mausembryonen schwere Entwicklungsstörungen auf. Die Störungen glichen dabei denen, die bereits bei

anderen Notchsignalkomponentendefekten beobachtet werden konnten (Shi et al. 2003). Gleichzeitig fungiert die O-Fucosyl-Transferase als Chaperone und ermöglicht den Transport des Notchrezeptors zur Zellmembran (Okajima et al. 2005). Im trans-Golgi Netzwerk wird pre-Notch durch eine Furin-ähnliche Konvertase proteolytisch gespalten, so dass ein durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stabilisiertes Heterodimer entsteht (Logeat et al. 1998). Durch Enzyme der Fringe-Familie wird der Notchrezeptor im Golgi-Apparat glykosiliert (Bray 2006). Diese Modifikation beeinflusst die Affinität der Notchliganden an dem Notchrezeptor. Ein stark glykosilierter Rezeptor wird beispielsweise eher durch Delta-like-Liganden aktiviert als durch Jagged-Liganden, was in Studien an *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde (Haines et al. 2003). Der Notchrezeptor wird zur Zellmembran transportiert und in diese integriert, so dass sich der Rezeptor aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne mit ca. 180 kDa (p180) und einem daran nicht-kovalent gebundenen C-terminalen transmembranen Anteil mit ca. 120 kDa (p120) zusammensetzt (siehe Abb.: 3). Der transmembrane Abschnitt wird unterteilt in einen intrazellulären Teil (ICN, intracellular Notch), einer Transmembrandomäne und einem kurzen extrazellulären Rest. Eine Aktivierung des Notchrezeptors findet durch membrangebundene Notchliganden statt.

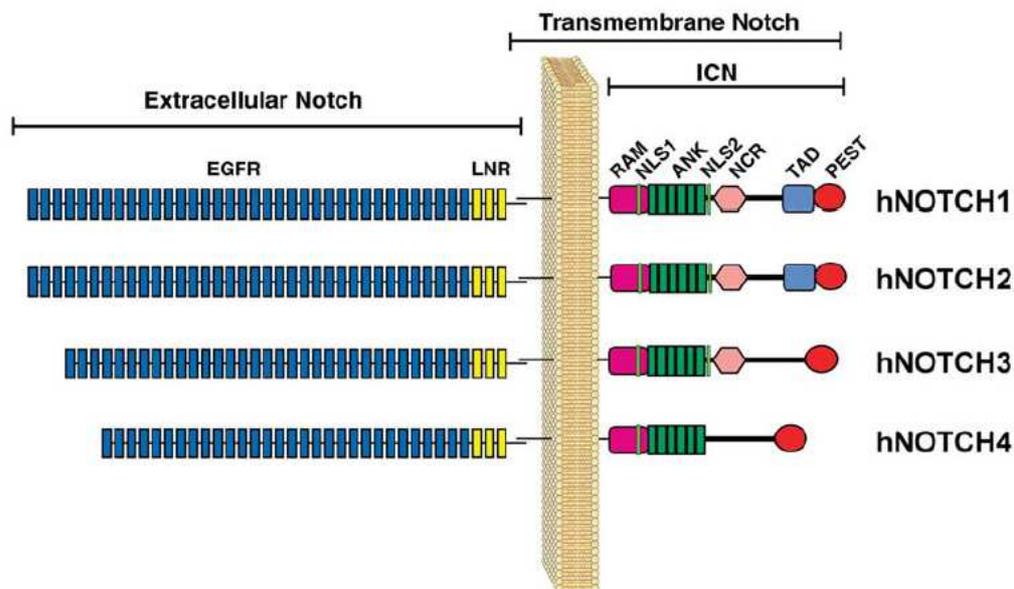


### Abbildung 2: Prozessierung des Notchrezeptors

Nach der Transkription wird der Notch-Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die O-Fucosyl-Transferase (O-Fut) fukosyliert. Anschließend erfolgt im Golgi-Apparat mithilfe einer Furin-ähnlichen Konvertase (Furin) eine proteolytische Spaltung (S1 Cleavage), so dass ein durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stabilisiertes Heterodimer entsteht. Nach Glykolisierung des Notchrezeptors durch Enzyme der Fringe-Familie (Fringe) wird dieser in die Zellmembran integriert. (Abb. 2 nach (Cell Signaling Technology, 2011))

### 1.2.3. Der Notchrezeptor

Beim Menschen gibt es vier Notchrezeptoren, welche einen ähnlichen Aufbau haben. Man teilt sie in eine extrazelluläre und transmembrane Domäne auf. Beide Abschnitte sind über eine kovalente  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verbunden. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 29-36 Epidermal-groth-factor-like (EGF) Wiederholungen und drei Cystein-reichen Lin-12/Notch repeats (LNR) (siehe Abb.: 3).



**Abbildung 3: Darstellung der vier humanen Notchrezeptoren (hNotch1 - 4)**

Der Notchrezeptor, der an der Zellmembran exprimiert wird, ist ein Heterodimer bestehend aus einem extrazellulären und einem transmembranen Anteil. Letzterer wird nochmals unterteilt in einen längeren intrazellulären, einem transmembranen und einem kurzen extrazellulären Anteil. Alle Notchrezeptoren bestehen aus EGFR (Epidermal-groth-factor-like repeats), welche eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen aufweisen, die zwischen 29 – 36 variiert. Den EGFR folgen Lin12/Notch repeats (LNR), eine RBP-Jk assoziiertes Molekül Domäne (RAM), Ankyrin Wiederholungen (ANK), 2 nukleäre Lokalisierungssignale (NLS1, NLS2) und PEST-Sequenzen (Prolin, Glutamin, Serin, Threonin). Im Gegensatz zu Notch4 enthalten die Notchrezeptoren 1, 2 und 3 Notch Cytokine Response (NCR) Sequenzen. Zusätzlich enthalten Notch1- und Notch2-Rezeptoren transkriptionelle Aktivierungsdomänen (TAD) zwischen den NCR und PEST Sequenzen. (Abb. 3 nach (Allenspach et al. 2002))

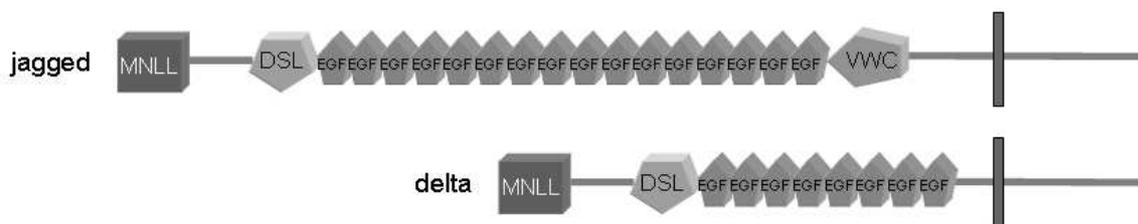
Die ersten beiden funktionellen Domänen von Ntm stellen die RAM Domäne (RBP-Jk assoziiertes Molekül) und daran anschließend sechs Ankyrin-Motive dar. Beide Strukturen können sowohl an DNA als auch an Notch-Kofaktoren, wie z.B. an die CSL-Familie, binden (Tamura et al. 1995). Die Ankyrin-Motive binden an die DNA und wirken mit der Transaktivierungsdomäne aktivierend auf das klassische Notch-Zielgen Hairy; Enhancer of Split 1 (HES1) (Aster et al. 2000). Den Ankyrin-Motiven folgt eine Notch Cytokine Response (NCR) Domäne. Notch1 und 2 verfügen zusätzlich noch über eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die jedoch beim Notch2-

Rezeptor deutlich schwächer ausgeprägt ist. Das Ende des Notchrezeptors bilden die glutaminreiche OPA Domäne und die für den Proteinabbau notwendige PEST-Sequenz (Prolin, Glutamin, Serin, Threonin) (Rogers et al. 1986).

#### 1.2.4. Liganden des Notchrezeptors

Säugetiere besitzen fünf unterschiedliche Notchliganden, Jagged1 und 2 sowie Delta-like1, 3 und 4. Die Notchliganden stellen wie auch die –rezeptoren Typ I Transmembranproteine dar. Alle Liganden teilen sich einen ähnlichen Aufbau. Den Anfang des extrazellulären Anteils bildet eine N-terminale Domäne, der eine Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) -Domäne folgt. Anschließend reihen sich, ähnlich wie beim Notchrezeptor, in unterschiedlicher Anzahl EGF Wiederholungen an (siehe Abb. 4). Die DSL-Domäne, die angrenzende N-terminale Domäne und die ersten beiden EGF Wiederholungen sind für die Bindung am Notchrezeptor zuständig. Liganden aus der Jagged-Gruppe enthalten mehr EGF Wiederholungen als die von der Delta-like-Gruppe und besitzen zusätzlich noch eine cysteinreiche Region (VWC: von Willebrand Faktor Typ C Domäne) (Parks et al. 2006).

Die zwei unterschiedlichen Liganden-Gruppen Jagged und Delta-like scheinen unterschiedliche Effekte auf ihre Zielzellen zu haben. So wird beispielsweise die Entwicklung humaner hämatopoetischer Stammzellen zu B-Zellen inhibiert, wenn man diese mit Delta-like1-exprimierenden Zellen kokultiviert. Dagegen fördert eine Kokultivierung mit Jagged1-exprimierenden Zellen die B-Zell-Reifung (Jaleco et al. 2001).

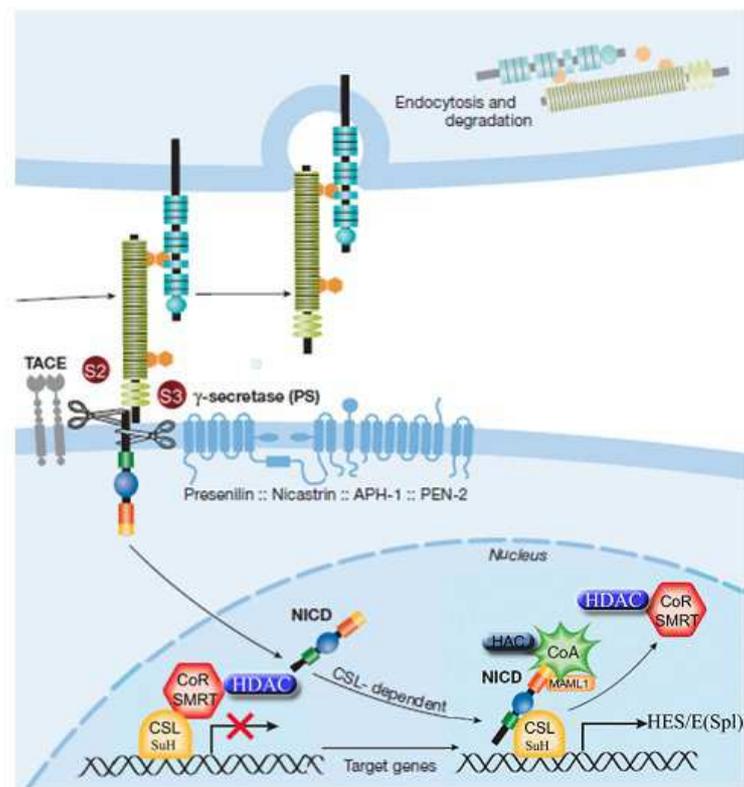


**Abbildung 4: Aufbau der Notch-Liganden Jagged und Delta-like**

Den Anfang der extrazellulären Region stellt eine MNLL-Domäne dar (auch NDUFB1-Domäne genannt: NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex). Der folgt ein DSL (Delta/Serrate Ligand)-Abschnitt und je nach Ligand variierende EGF (Epidermal-growth-factor) Wiederholungen. Die Jagged-Liganden besitzen noch eine von Willebrand Faktor Typ C Domäne (VWC). (Abb. 4 nach (Pintar et al. 2007).

### 1.2.5. Die Notchsignaltransduktion

Nach der Aktivierung des Notchrezeptors durch eine Ligandenbindung werden zwei proteolytische Prozesse eingeleitet, die zur Freisetzung der intrazellulären Domäne von Nic (Notch intracellular) aus der Zellmembran und Translokation dieser in den Zellkern führen (Mumm et al. 2000). Die erste Spaltung des Notchrezeptors nach seiner Aktivierung erfolgt an der sogenannten S2-Stelle, nahe der Transmembran-Domäne, durch die ADAM-Protease Tumor-Necrosis Factor  $\alpha$ -converting Enzyme (TACE) (Brou et al. 2000) (siehe Abb. 5). Nach der Spaltung wird die geschnittene extrazelluläre Domäne von der ligandenexprimierenden Nachbarzelle endozytiert (Parks et al. 2000). Die extrazelluläre S2-Spaltung triggert die nächste proteolytische Spaltung an der S3-Stelle innerhalb des Transmembranbereichs des Notchrezeptors. Die S3-Spaltung wird ausgeführt von einem  $\gamma$ -Sekretase Komplex, an dem Presenilin 1/2, Nicastrin, Pen-2 (presenilin enhancer 2), und APH-1 (anterior pharynx-defective 1) beteiligt sind. Dies konnte anhand von Knock-out-Studien an Mäusen bestätigt werden (Zhang et al. 2000). Bei S3 wird ein intrazellulärer, zytoplasmatischer Anteil des Nic freigesetzt. Dieser transloziert in den Kern und bindet an das DNA-bindende Protein CBF1/Su(H)/Lag1 (CSL). Dabei wird es von einem transkriptionellen Repressor in einen transkriptionellen Aktivator umgewandelt (Leong et al. 2006). Dazu bildet Nic mit CSL und Mastermind like 1 (MAML-1), eine Familie aus transkriptionsaktivierenden Proteinen, einen ternären Komplex. Dieser Komplex verdrängt den Ko-Repressor-Komplex, der u.a. aus dem Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors (SMRT), der Histon-Deacetylase HDAC-1 und SHARP (SMRT/HDAC-associated repressor protein) besteht. Anschließend rekrutiert MAML-1 die Histonacetyltransferase p300/CBP, die Histone acetyliert und machen somit die DNA zugänglich für eine aktive Transkription (Leong et al. 2006, Wu et al. 2004).



### Abbildung 5: Notchsignaltransduktionsweg

Nach Kontakt des Notchrezeptors mit einem Liganden, wird der Rezeptor an S2 durch die ADAM-Protease (a disintegrin and metalloprotease) Tumor-Necrosis Factor  $\alpha$ -converting Enzyme (TACE) und an S3 von einem  $\gamma$ -sekretase Komplex, an dem Presenilin, Nicastrin, PEN-2 (presenilin enhancer 2), und APH-1 (anterior pharynx-defective 1) beteiligt sind, proteolytisch gespalten. Der extrazelluläre Anteil des Rezeptors wird mit dem Liganden von der ligandenexprimierenden Zelle endozytiert und degradiert. Der intrazelluläre Anteil des Notchrezeptors (Nic) transloziert in den Zellkern, wo er an das DNA-bindende Protein CSL (CBF1/Su(H)/Lag1) und MAML-1 (Mastermind like 1) bindet. Dabei verdrängt Nic den Co-Repressor SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid) (CoR SMRT) und die Histon-Deacetylase (HDAC) von CSL. MAML-1 rekrutiert Co-Aktivatoren (CoA) und eine Histonacetyltransferase (HAC), die Histone acetyliert, und somit die DNA zugänglich für eine aktive Transkription von z.B. HES/E(Spl) (hairy and enhancer of split related) macht. (Abb. 5 nach (Gazave et al. 2009))

Dadurch wird die Transkription von Promotoren, die CSL Bindeelemente haben, aktiviert. Die primären Ziele der Notch-Signalgebung sind die basischen helix-loop-helix (bHLH) transkriptionellen Repressoren (Iso et al. 2003a). Davon sind als wichtigste Vertreter die HES-Familie (*hairy and enhancer of split related*) und die Familie der hairy-related transkription Faktoren (HRT; auch bekannt als HEY, HESR, HERP, oder CHF) zu nennen (Iso et al. 2003a). Es existieren noch weitere Ziele des Notchsignalweges. So wurde an humanen Keratinozyten eine Induktion des Zellzyklusmediators p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (auch bekannt unter cyclin-dependent kinase inhibitor 1) durch Notch1 beschrieben (Rangarajan et al. 2001). Des Weiteren

beeinflusst Notch auch positiv die Transkription von Cyclin D1 in Rat kidney epithelial cells (Ronchini et al. 2001) sowie die Aktivität von NF- $\kappa$ B in murinen hämatopoetischen Progenitorzellen (Cheng et al. 2001).

Neben der klassischen Signaltransduktion über den Liganden-Rezeptor-Kontakt und darauf folgender Translokation von Nic in den Zellkern, gibt es noch weitere von der Interaktion mit den CSL-Proteinen unabhängige Notchsignalwege. So zeigten Studien an *Drosophila melanogaster*, dass der Notchrezeptor ohne Ligandenaktivierung in den Ras/Raf-Signalweg eingreifen kann. Dies geschieht über die c-jun N-terminale Kinase (JNK Kinase) (Weijzen et al. 2002, Zecchini et al. 1999).

### 1.2.6. Notch-assoziierte Krankheitsbilder

Der Notchsignalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Differenzierung unterschiedlichster Zelltypen im menschlichen Organismus während und nach der embryonalen Entwicklung. Abweichungen im Notchsignalweg oder Mutationen in dessen Komponenten können zu embryonalen Missbildungen oder erworbenen Erkrankungen führen.

Bekanntere Mutationen in den Notch-Komponenten findet man z.B. bei der Cerebral autosomal dominanten Arteriopathie mit subcorticalen Infarkten und Leukoencephalopathie (CADASIL), die mit einer Mutation der EGF ähnlichen Wiederholungen im Notch3-Rezeptor einhergeht (Joutel et al. 1996). Das Alagille-Syndrom, bei dem eine Mutation im Notch-Liganden Jagged1 zu finden ist, manifestiert sich mit Entwicklungsstörungen verschiedener Organe, darunter Leber, Herz, Knochen und Auge (Oda et al. 1997). Eine Mutation im Notch-Liganden Delta-like3 führt bei bestimmten Formen der Spondylocostalen Dysostose zu verzögerten und irregulären Somitenformationen und folglich zu Fehlbildungen des Skelettsystems (Bulman et al. 2000).

Neben den kongenitalen Notch-assoziierten Krankheitsbildern, spielt Notch auch in der Tumorgenese eine wichtige Rolle. Eine aberrante Notchrezeptor bzw. –ligandenexpression wurde in unterschiedlichen humanen soliden Neoplasien, wie unter anderem in Zervix-, Kolon-, Lungen-, Pankreas- und Mammakarzinomen beschrieben (Leong et al. 2006). Jedoch ist die Rolle des Notchsignalweges in der Pathogenese der soliden Tumoren bisher noch nicht hinreichend geklärt. Es werden

sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften des Notchsignalweges diskutiert (Leong et al. 2006).

Einen klaren Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und Notchaberration hat man bei der T-Zellen akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) entdeckt (Ellisen et al. 1991). Eine Ursache für die onkogene Eigenschaft von Notch in T-ALL ist eine chromosomale Translokation  $t(7;9)(q34;q34.3)$ , die die C-terminale Region des humanen Notch1-Gens unter die Kontrolle des TCR $\beta$ -Enhancers bringt. Dies führt zu einer abnormen Expression des Notch1-Rezeptors, der in einer konstitutiv aktiven Form (Notch1IC) vorliegt und daher keine Aktivierung durch einen Liganden benötigt (Ellisen et al. 1991). Mäuse, die eine Knochenmarkstransplantation mit Notch1IC veränderten Knochenmarkszellen erhielten, entwickelten zu 100% eine T-ALL (Aster et al. 2000). Eine chromosomale Translokation in  $t(7;9)$  kann jedoch nur in 1% aller T-ALL-Patienten beobachtet werden (Ma et al. 1999). Dennoch weisen mehr als 50% aller T-ALL-Fälle eine aktivierende Mutation im Notch1-Rezeptor, unabhängig einer Translokation  $t(7;9)$ , auf (Weng et al. 2004).

Auch in einigen hämatopoetischen Erkrankungen der B-Zellreihe konnte eine vermehrte Notchaktivität beobachtet werden. Darunter sind vor allem erwähnenswert die B-Zellen akute lymphatische Leukämie (B-ALL) (Chiaramonte et al. 2005), die B-Zellen chronische lymphatische Leukämie (B-CLL) (Hubmann et al. 2002), das Multiple Myelom (Houde et al. 2004) und das klassische Hodgkin Lymphom (Jundt et al. 2002).

In den Modellzelllinien des cHLs konnte eine Überexpression der Notch1-Rezeptoren und Jagged1-Liganden nachgewiesen werden (Jundt et al. 2002). Die Aktivierung des Notchsignalweges begünstigt die Proliferation und das Überleben der cHL-Modellzelllinien (Jundt et al. 2002). Interessanterweise beschreibt eine andere Studie, dass eine Notchaktivierung in cHL-Zelllinien die Proliferation hemmt und die Apoptoseneigung begünstigt (Zweidler-McKay et al. 2005).

In beiden Fällen wird dem Notchsignalweg eine wichtige Rolle in cHLs zugesprochen. Da cHLs den PMBCLs klinisch, genetisch und molekularbiologisch sehr ähnlich sind, lässt dies eine mögliche pathogene Rolle der Notchkaskade und dessen Komponenten auch in PMBCLs vermuten.

## **Aufgabenstellung:**

Der Notchsignalweg spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese hämatologischer Neoplasien, wie zum Beispiel bei der T-Zell akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) und dem klassischen Hodgkin Lymphom (cHL). Obwohl das PMBCL zu den non Hodgkin Lymphomen gezählt wird, wurden mehrere klinische und molekularbiologische Gemeinsamkeiten zwischen cHL und PMBCL beschrieben. Dazu gehören unter anderem die konstitutive Aktivierung der NF-kappaB- und der JAK/STAT-Signalwege. Der NF-kappaB-Signalweg wird unter anderem auch vom Notchsignalweg, der im cHL proliferationsfördernd und apoptosehemmend wirkt, positiv beeinflusst. Da bisher keine Studien über den Notchsignalwegsstatus in PMBCLs unternommen worden sind, soll in dieser Arbeit der Notchsignalweg sowohl in PMBCL-Zelllinien als auch in PMBCL-Fällen auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht werden. Zudem soll eine vergleichende Studie der Expression der Notchsignalwegskomponenten zwischen drei Lymphomtypen, cHL, DLBCL und PMBCL durchgeführt werden, da das PMBCL erst 2008 von der WHO als eigene Gruppe von den DLBCLs abgegrenzt wurde.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. *Material*

#### 2.1.1. Chemikalien

DAB (3,3' Diaminobenzidine)

Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat-Dihydrat

EDTA

Ethanol

Ethidiumbromid

Hämalaun

Kaliumchlorid

Kalium-Di-Hydrogen-Phosphat

$\beta$ -Mercaptoethanol

MOPS

Na-desoxycholate

Natriumacetat

Natriumchlorid

NP-40

Paraformaldehyd

Sodium Tetraoxovanadat

Tris

Tris-HCl

Tween 20

Xylol

### 2.1.2. Lösungen und Puffer

10 x PBS pH 7,3 – 7,4	1,36M Natriumchlorid 26,8mM Kaliumchlorid 64,6mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 17,6mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad. 1l H <sub>2</sub> O
20 x MOPS	0,4M MOPS 100mM Natriumacetat 10mM EDTA
RIPA	50mM Tris-HCl (pH 7,4) 150mM NaCl 1% NP-40 0,25-0,5% Na-desoxycholate 1 Tablette complete Mini pro 10 ml (Roche Deutschland Holding GmbH) 1mM Pefabloc SC (Roche Deutschland Holding GmbH) 1mM KF 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
2% Paraformaldehyd pH 7,2	4g Paraformaldehyd 20ml 10 x PBS ad 200ml H <sub>2</sub> O
10x TBS pH 7,6	0,4M Tris 1,81M NaCl
1 x TBST	99,9% 1 x TBS 0,1% Tween 20 (Roche Deutschland Holding GmbH)
10 x TAE pH 8,0	0,4M Tris 0,2M Essigsäure

0,01M EDTA

Citrat-Puffer                    10mM Sodium Citrate  
    1000ml H<sub>2</sub>O  
    Auf pH 6 mit 1N HCl adjustieren

### 2.1.3.     **Medium für Zellkulturen**

RPMI	Fa. Life Technologies, Karlsruhe
IMDM	Fa. Pan System, Aidenbach
FCS	Fa. Pan System, Aidenbach
1% Penicillin-Streptomycin	Fa. Pan System, Aidenbach
1% L-Glutamin	Fa. Pan System, Aidenbach

### 2.1.4.     **Reagenzien und Antikörper**

#### **Reagenzien**

Agarose	Fa. GIBCO BRL
BSA	Fa. Boehringer Mannheim
Coomasie Brilliant Blue G250	Fa. Serva
dNTP Mix	Fa. Invitrogen; Karlsruhe
1kb-ladder	Fa. Gibco BRL
Magermilchpulver	Fa. Applichem
4 x NuPAGE-Puffer	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Oligo(dT)-Primern	Fa. Invitrogen; Karlsruhe
10 x Reaktionspuffer	Fa Roche Diagnostics, Mannheim
2 x SYBR Green Supermix	Fa. BioRad, München
Trypanblau	Fa. Sigma

## Antikörper

anti-Notch 1 Antibody	Fa. Epitomics, Inc., USA (ID: EP1238Y)
anti-Notch 1 Antibody	Fa. BD Bioscience Europe (Nr.: 552466)
anti-goat Antibody	Fa. Santa Cruz (Cat.-Nr.: 2022)
Envision Detektion System	Fa. Dako, Hamburg (Kode: K5007)

### 2.1.5. Enzyme

RNaseOUT	Fa. Invitrogen; Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Fa. Roche Diagnostics; Mannheim

### 2.1.6. Gebrauchsfertige Kits

RNase-free DNase Set	Fa. Qiagen, Deutschland
RNeasy Mini-Kit	Fa. Qiagen, Deutschland
SuperScript II Reverse Transkriptase	Fa. Invitrogen; Karlsruhe
SuperSignal West Dura Extended	Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte

### 2.1.7. Primer

PCR: Notch1	F: agcctcaacatcccctacaa R: ccacgaagaacagaagcaca
Notch2	F: tgtgacatagcagcctccag R: cagggggcactgacagtaat
Notch3	F: gtgtgtgtcaatggctggac R: agactggcctcctgtgtcac
Delta-like1	F: ggaatgcaagtgcagagtgg

	R: tcttgcagggcttatggtgt
Jagged1	F: cggcctctgaagaacagaac
	R: gtcaccaagcaacagatcca
HES1	F: tctgagccagctgaaaacac
	R: ggtacttccccagcacactt
β-aktin	F: tgtggcatccacgaaactac
	R: ggagcaatgatcttgatcttca
RPL13A	F: cggaccgtgcgaggtat
	R: caccatccgcttttcttgtc
HPRT	F: tgctcgagattgaagg
	R: tcccctgttggtcatt

### 2.1.8. Biologische Materialien

#### Zelllinien

Karpas1106	Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom (Nacheva et al. 1994)
Med-B1	Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom (Möller et al. 2001)
Karpas422	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (Dyer et al. 1990)
SUDHL-4	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (Epstein et al. 1979)
KM-H2	Hodgkin-Lymphom (Kamesaki et al. 1986)
L1236	Hodgkin-Lymphom (Kanzler et al. 1996)
L428	Hodgkin-Lymphom (Schaadt et al. 1979)
L540	Hodgkin-Lymphom (Diehl et al. 1983)

#### Patientenmaterial

Neben den Zelllinien wurden 23 diffuse großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) Fälle und 33 primäre mediastinale B-Zell Lymphom (PMBCL) Fälle untersucht. Die Fälle wurden aus der Abteilung Pathologie der Universität Ulm und der Pathologischen Abteilung, Hospital Henri Mondor, Créteil in Frankreich bezogen. Diese Lymphom Fälle, initial diagnostiziert zwischen 1984 und 2008, zeigten die histologischen

Eigenschaften, die charakteristisch für diesen Typ von Lymphom sind angelehnt an der neusten WHO-Klassifikation für maligne Lymphome.

Als lymphatisches Referenzmaterial dienten drei Tonsillen, die keine maligne Pathologie aufwiesen.

### 2.1.9. Verbrauchsmaterialien

Bis-Tris-Gel	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Deckgläser	Fa. Menzel, Braunschweig
Nitrozellulosemembran	Fa. Whatman GmbH
Röntgenfilm „Cronex	Fa. AGFA; Köln
Petrischalen (94mm und 145mm)	Fa. Greiner, Kremsmünster; Austria
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt
Thermo-Fast 96-well PCR Platte	Fa. ABgene, Epsom, UK
Tubes (0,5 ml / 1,5 ml)	Fa. Eppendorf, Hamburg
UV-Küvette mikro	Fa. Brand, Wertheim
3MM Whatman Papier	Fa. Hartenstein

### 2.1.10. Geräte

Axiophot Mikroskop	Fa. Zeiss, Oberkochen
Brutschrank Cytoperm	Heraeus, Osterode, Deutschland
iCycler Detektionssystem	Fa. BioRad, München
Gelkammer	AGS, Heidelberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Fa. GLW, Würzburg
Mikrozentrifuge	Neolab, Heidelberg, Deutschland
KY-F75U Digitalkamera	Fa. JVC, Friedberg
PCR-Thermocycler	Fa. MWG Biotech, Ebersberg
pH-Meter	WtW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Fa. Eppendorf, Hamburg
Polaroidkamera	Fa. Bachhofer, Reutlingen

UV-Spektralphotometer	Fa. Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.1.11. Software

Diskus Software Version 4.5	Fa. Hilgers, Königswinter
iCycler iQ Optical System 3.1	Fa. BioRad, München
Microsoft Office 2000	Fa. Microsoft, USA
Primer Design Software	Primer3 <sup>®</sup> , <a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Kultivierung von Suspensionszellen

Alle verwendeten Zelllinien sind Suspensionszellen und wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus folgenden Komponenten:

#### **MedB-1, Karpas422, KM-H2, L1236, L428, L540**

Die Zelllinien wurden mit RPMI (Life Technologies, Karlsruhe) und IMDM (Pan System, Aidenbach) im Verhältnis 1:5 supplementiert und mit 10% hitze-inaktiviertem Fetal Calf Serum (FCS) (Pan System, Aidenbach) kultiviert. Zusätzlich wurde 1% Penicillin-Streptomycin (Pan System, Aidenbach) und 1% L-Glutamin (Pan System, Aidenbach).

## Karpas1106; SUDHL-4

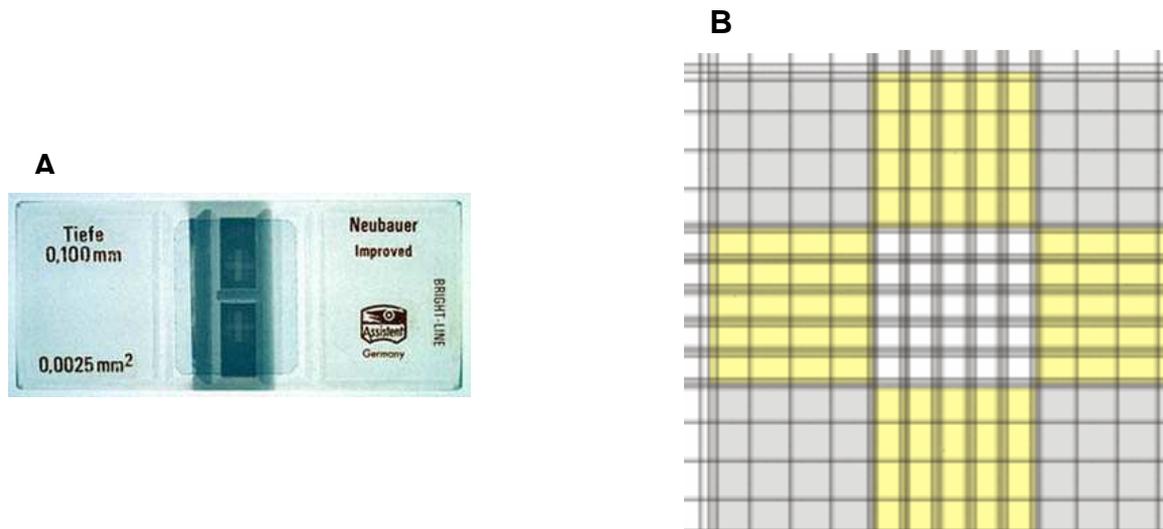
Die Zelllinien wurden mit RPMI und IMDM im Verhältnis 1:5 supplementiert und mit 20% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% L-Glutamin kultiviert.

### 2.2.2. Zellzahlbestimmung mittels improved Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet (siehe Abb. 6). Nachdem man das Deckglas auf der Zählkammer angebracht hatte, gab man seitlich einen Tropfen Zellsuspension hinzu. Das zentrale Großquadrat unterteilt sich in 5 x 5 Kleinquadraten, welche jeweils eine Kantenlänge von 0,2 mm und eine Fläche von 0,04 mm<sup>2</sup> haben. Eine Besonderheit der improved Version der Zählkammer sind die dreifachen Begrenzungslinien. Dabei ist die mittlere Linie die eigentliche Begrenzung. Unter dem Mikroskop zählt man die Zellen, die sich in vier Kleinquadraten befinden, und rechnet anschließend den Durchschnitt pro Kleinquadrat aus. Da ein Kleinquadrat 4 nl fasst, kann man die Zellkonzentration mit unten anstehender Formel berechnen.

$$\text{Zellkonzentration} = \frac{\text{Zellzahl (im Großquadraten)}}{4 * 10^{-6} \text{ ml}}$$

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde die Zellsuspension mit Trypanblau versetzt. Die toten Zellen nahmen den blauen Farbstoff aufgrund ihrer beschädigten Membran auf, während die Lebenden ungefärbt blieben.



### Abbildung 6: Darstellung einer Neubauer-Zählkammer

A: Abgebildet ist eine Neubauer-Zählkammer mit Deckglas von oben. Von Bedeutung sind die zwei Zählnetze in der Mitte, die als Kreuz erkennbar sind.

(Abb. 6A nach (Neubauer Zählkammer, 2011))

B. Schematische Darstellung des Zählnetzes der Neubauer-Zählkammer. Die Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten. In der Mitte dieser neun Quadrate sitzt das Zentralquadrat (weiß). Dieses hat eine Kantenlänge von 1mm und setzt sich aus 5 x 5 Kleinquadraten, welche jeweils eine Kantenlänge von 0,2mm und ein Volumen von 4 nl aufweisen, zusammen. Jedes Kleinquadrat im Zentralquadrat hat drei Begrenzungslinien, wovon die mittlere die eigentliche Begrenzung ist und die äußeren der Zählhilfe dienen. Die Zellen werden in den Kleinquadraten des Zentralquadrates ausgezählt.

(Abb. 6B nach (Die manuelle Zellzählung, 2011))

## 2.2.3. Arbeit mit Nukleinsäuren

### 2.2.3.1. Isolation von mRNA

Die RNA-Isolation wurde gemäß dem RNeasy-Protokoll (RNeasy Mini-Kit, Qiagen) durchgeführt. Zuerst wurde eine Suspension mit maximal  $4 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert und mit 350µl RLT Lyse-Puffer und 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspensiert. Anschließend wurde die Lösung zur Homogenisierung in einen QIAshredder überführt. Die homogenisierte Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit 70%igem Ethanol gemischt, worin die Nukleinsäuren aufgrund ihrer Polarität präzipitierten. Damit werden optimale Bedingungen für die Bindung der

Nukleinsäuren an die RNeasy Minisäule geschaffen. Um eine DNA-Kontamination zu vermeiden, folgte eine 15-minütige Inkubation mit 10 µl DNase vermisch mit RDD-Puffer, der auf die Membran der RNeasy Minisäule pipettiert wurde. Anschließend wurde entsprechend dem RNeasy-Protokoll die RNA mit RW-1 Puffer und RPE Puffer gewaschen und mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA**

Die Reinheit und Konzentration von DNA/RNA wurde mit einem UV-Spektralphotometer bei 260 bzw. 280nm gemessen. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm, wogegen die Proteine ihr Maximum bei 280nm aufweisen. Der Reinheitskoeffizient errechnet sich aus dem Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>. Der Koeffizient gibt Auskunft über die Verunreinigung der Nukleinsäuren durch Proteine und über den Reinheitsgrad einer RNA-Lösung. Ein Verhältnis größer als 2,0 spricht für eine reine RNA-Lösung. Bei Verunreinigung der Nukleinsäurelösung mit Proteinen ist der Reinheitskoeffizient kleiner als 1,7. Mit den Messdaten aus der Extinktion bei 260nm lässt sich die RNA-Konzentration mit folgender Beziehung berechnen: OD<sub>260</sub> =1 entspricht 40µgRNA/ml.

### **2.2.3.3. cDNA-Synthese**

Um first-stranded complementary DNA (cDNA) aus mRNA zu erhalten, wurden 2µg Gesamt-RNA nach dem „SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ Protokoll behandelt. Die Gesamt-RNA wurde mit 0,5µg Oligo(dT)-Primern und 10mM dNTP Mix (Invitrogen) für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Beim Erhitzen wird die RNA aufgefaltet und somit zugänglich für die Primer gemacht. Danach wurde dem Ansatz 10mM DTT, welches die Nukleinsäuren stabilisiert, und 40 Units RNaseOUT, damit die RNA nicht abgebaut wird, zugegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 5x First-Strand Buffer (Invitrogen) auf eine einfache Konzentration und einem Endvolumen von 19µl verdünnt. Zum Annealing der Primer wurde die Lösung auf 42°C für 2 Minuten erwärmt. Als Reverse

Transkriptase dienten 50 Units „SuperScript II RT“ (Invitrogen), welches eine modifizierte Version der MMLV- (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse-Transkriptase ist. Sie zeichnet sich durch eine geringere RNase H-Aktivität und eine stärkere Hitzestabilität aus. Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgte bei 42°C für 50 Minuten. Danach wurde das Reverse Transkriptase Enzym bei 70°C für 15 Minuten deaktiviert. Vor Gebrauch in der PCR wurde die gewonnene cDNA-Lösung im Verhältnis 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

#### **2.2.3.4. PCR**

PCR-Reaktionen wurden in 0,2ml 8er PCR-Stripes in einem PCR-Thermocycler durchgeführt. Grundsätzlich enthielten PCR-Ansätze 2µl Template (cDNA), 200µM dNTP-Gemisch und 1 Unit Taq-DNA-Polymerase. Zusätzlich wurden je nach darzustellender RNA unterschiedliche Primermengenverhältnisse an forward und reverse Primern verwendet. Genauere Angaben dazu findet man bei „2.2.3.7 Primer-Test für qRT-PCR-Ansätze“.

Der PCR-Ansatz wurde auf 20µl Endvolumen mit sterilem Wasser aufgefüllt, wobei 5xPCR-Reaktionspuffer auf eine einfache Konzentration verdünnt wurde. Die Denaturierung der DNA und Aktivierung der durch Hitze aktivierbaren Taq-Polymerase erfolgte im ersten Zyklus bei 95°C für 5 Minuten, danach jeweils bei 95°C für 60 Sekunden. Der Ansatz wurde für 45 Sekunden auf eine Annealingtemperatur gebracht, die sich an der Schmelztemperatur der Primer-Template-Verbindung orientierte, die wiederum von der Länge des Primers und dessen GC-Gehalt abhing. Die Elongation erfolgte für 45 Sekunden bei der für die Taq-DNA-Polymerase optimalen Elongationstemperatur von 72°C. In den Versuchsreihen wurde ein Touchdownprogramm mit 28 Zyklen verwendet. Dabei wird beim ersten Zyklus eine Annealingtemperatur gewählt, die größer als die Schmelztemperatur der Primer-Template-Verbindung ist. Die Temperatur minimiert sich dann in jedem Zyklus um 0,2°C. Dies führt zu einer höheren Spezifität der PCR-Reaktion, wobei sich jedoch die Sensibilität verringert. Nach Durchlauf aller Zyklen wurde der PCR-Ansatz zur finalen Elongation nochmals für 10 Minuten auf 72°C erhitzt. Dabei wird sichergestellt, dass in diesem letzten Elongationsschritt alle einzelsträngigen DNAs komplementiert werden. Nach Abschluss des finalen

Elongationsschrittes wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

#### **2.2.3.5. Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von PCR-Produkten wurde mit der Elektrophorese in 1%igen Agarosegelen durchgeführt. Dazu wurde Agarose in 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Das verdampfte Volumen wurde mit H<sub>2</sub>O entsprechend aufgefüllt. Danach wurde Ethidiumbromid (0,5mg/ml), welches in die DNA interkaliert und dann unter UV-Licht visualisiert werden kann, hinzu gegeben und die flüssige Agarose in eine Gelform gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Gelkammer, welche mit 1x TAE-Puffer versetzt mit Ethidiumbromid gefüllt und unter Spannung gelegt wurde. Die negativ geladene DNA wandert Richtung Anode. Die Wandergeschwindigkeit hängt von der negativen Ladung und der Größe der DNA ab. Zur Längenbestimmung wurde ein Standard von 100-2000 Basenpaaren (Bp) verwendet. Unter UV-Licht wurden Bilder der Agarosegele zur Dokumentation mit einer Polaroidkamera aufgenommen.

#### **2.2.3.6. QRT-PCR (quantitative real-time PCR)**

Das Prinzip der quantitativen real-time PCR im Gegensatz zur konventionellen PCR liegt in der Echtzeit-Überwachung der einzelnen Amplifikationszyklen nach jedem Elongationsschritt. Mittels eines Fluoreszenzdetektors im iCycler können die amplifizierten PCR-Produkte detektiert werden. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (iQ SYBR Green Supermix) verwendet, der ähnlich wie Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA interkaliert und diese fluoreszieren lässt. Die Fluoreszenzintensität reflektiert die Menge des PCR Produkts und wird nach Abschluss der qRT-PCR aufgetragen gegen den jeweiligen Zyklus. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines nicht regulierten Referenzgens normalisiert. In dieser Arbeit wurden als Referenzgene die housekeeping Gene  $\beta$ -Aktin und RPL13A verwendet. Anschließend wurde die

relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen. Als Kontrollprobe wurde ein Tonsillen-Mix, bestehend aus drei Tonsillen gesunder Patienten, gewählt, da sie als „normales“ lymphatisches Gewebe am ehesten mit Lymphomen verglichen werden können.

Zur Berechnung der relativen Expression musste der Ct-Wert (Cycle threshold) bestimmt werden. Dieser gibt den Zyklus an, ab dem die Fluoreszenz, welche proportional zur DNA-Menge ist, erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und sich die Kurve in einem exponentiellen Wachstum befindet. Bei einer PCR-Effizienz von 100% würde es dem Zyklus entsprechen, ab dem das Zielgen pro Zyklus verdoppelt wird. Mit den Ct-Werten des Zielgens und der Referenzgene ließ sich die relative Expression anhand des relativen Quantifizierungsmodelles berechnen. In dieser Arbeit wurde eine 100% Effizienz der PCR angenommen, weswegen die Formel wie unten stehend verwendet werden konnte:

$$\Delta C_T (\text{Zielmaterial}) = C_T (\text{Zielgen}_{\text{Zielmaterial}}) - C_T (\text{Referenzgen}_{\text{Zielmaterial}})$$

$$\Delta C_T (\text{Referenzmaterial}) = C_T (\text{Zielgen}_{\text{Referenzmaterial}}) - C_T (\text{Referenzgen}_{\text{Referenzmaterial}})$$

$$\text{Ratio} = \frac{2^{\Delta C_T (\text{Zielmaterial})}}{2^{\Delta C_T (\text{Referenzmaterial})}}$$

Die Proben und Negativkontrollen wurden in zweifach-Bestimmungen auf einer Thermo-Fast 96-well PCR Platte aufgetragen. Jeder Reaktionsansatz enthielt 2µl Template und das jeweilige spezifische Primermengenverhältnis. Anschließend wurde es auf einen 1x Sybergreen-Mix mit einem Gesamtvolumen von 20µl verdünnt.

Zuerst wurde die Polymerase aktiviert, indem das Reaktionsgemisch für 3 Minuten auf 95°C erwärmt wurde. Es folgten 37 Zyklen, die jeweils aus einer Denaturierung für 25 Sekunden bei 95°C, einem Annealing für 15 Sekunden bei 60°C und einer Elongation für 45 Sekunden bei 72°C bestanden. Zur Kontrolle der Spezifität der PCR-Produkte wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde mit

einer Temperatur von 66°C begonnen, die sukzessiv um 0,5°C erhöht wurde bis 95°C erreicht waren, so dass die PCR-Produkte bei ihrer entsprechenden Temperatur denaturierten. Da der SYBR Green Fluoreszenzfarbstoff nur in doppelsträngigen PCR-Produkten interkaliert, nahm die Fluoreszenz bei der Denaturierungstemperatur ab. Dabei lösten sich die Doppelstränge je nach Anzahl an Basenpaaren und Nukleinsäuremuster bei unterschiedlichen Temperaturen, so dass für jedes Produkt ein spezifischer Peak entstand. So konnten Nebenprodukte, die das Ergebnis verfälschen würden, entdeckt werden. Da die Bildung von Nebenprodukten sehr von den Primern abhängt, wurde jedes Primerpaar vor Anwendung in den Versuchsreihen in der qRT-PCR getestet.

#### **2.2.3.7. Primer-Test für qRT-PCR-Ansätze**

Die Primer für das gewünschte Zielgen wurden mit einer Primer Design Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) generiert. Dabei war wichtig, dass sie spezifisch an den gesuchten Genabschnitt binden und eine geringe Affinität zueinander aufweisen, so dass keine Nebenprodukte in der PCR amplifiziert werden. Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurden diese vor dem Gebrauch in den Versuchsreihen in einem Primertest erprobt. Bei diesem wurden neun unterschiedliche Mengenverhältnisse an forward und reverse Primern in einer qRT-PCR auf ihre Spezifität zum gewünschten Genabschnitt überprüft. Die Zusammensetzung an forward und reverse Primern beeinflusst deren Spezifität und ihre Affinität zueinander. Die qRT-PCR-Ansätze enthielten alle 2µl Template (Tonsillen-Mix) und wurden auf einen 1x Sybergreen-Mix mit einem Gesamtvolumen von 20µl verdünnt. Anschließend wurde 2µl von forward und reverse Primern nach dem Primermengenverhältnissen aus Tabelle 1 hinzugegeben. Jedes der neun Mengenverhältnisse wurde doppelt angesetzt und im iCycler analysiert. Zur Negativkontrolle wurde als Template H<sub>2</sub>O verwendet. Anhand des Ct-Wertes und der Schmelzkurve konnte die Amplifikation des gewünschten Produktes und möglicher Nebenprodukte ermittelt werden. Zur genaueren Differenzierung der entstanden Produkte wurden die qRT-PCR-Ansätze nach dem Durchlauf im iCycler elektrophoretisch aufgetrennt. Das Primermengenverhältnis mit der größten

Spezifität ohne Bildung von Nebenprodukten wurde in den Versuchsreihen verwendet.

**Tabelle 1: Primermengenverhältnisse für den Primer-Test**

Neun unterschiedliche Mengenverhältnisse von reverse und forward Primern zur Anwendung beim Primertest wurden ausgetestet. Die Spezifität der einzelnen qRT-PCR-Reaktionen wurden anschließend auf Grund der Ct-Werte (Cycle threshold) und mit Hilfe einer Schmelzkurve analysiert. Gewählt wurde das Mengenverhältnis, bei dem ein geringer Ct-Wert ohne Bildung von Nebenprodukten (Primer-Dimer) vorzufinden war.

	50 nM for	300 nM for	900 nM for
50 nM rev	1	2	3
300 nM rev	4	5	6
900 nM rev	7	8	9

Anhand des Primer-tests wurden folgende Primermengenverhältnisse für die jeweiligen Produkte in den Versuchsreihen benutzt:

β-Aktin:	300nM forward und 300nM reverse
RPL13A:	300nM forward und 300nM reverse
Notch1:	900nM forward und 300nM reverse
Notch2:	300nM forward und 300nM reverse
Notch3:	300nM forward und 50nM reverse
Jagged1:	300nM forward und 900nM reverse
Jagged2:	300nM forward und 300nM reverse
Delta-like1:	300nM forward und 300nM reverse
Delta-like3:	300nM forward und 300nM reverse
Delta-like4:	900nM forward und 900nM reverse
HES1:	300nM forward und 300nM reverse

## **2.2.4. Arbeiten mit Proteinen**

### **2.2.4.1. Herstellung von Proteinextrakten aus Zelllinien**

Das Zell-Pellet von  $10^6$  Zellen wurde in 1ml PBS gewaschen und zum Zellaufschluss mit 3-fachen Volumen von Radioimmunoprecipitation assay-Puffer (RIPA) für 10 Minuten auf Eis inkubiert, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Anschließend wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt.

### **2.2.5. Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

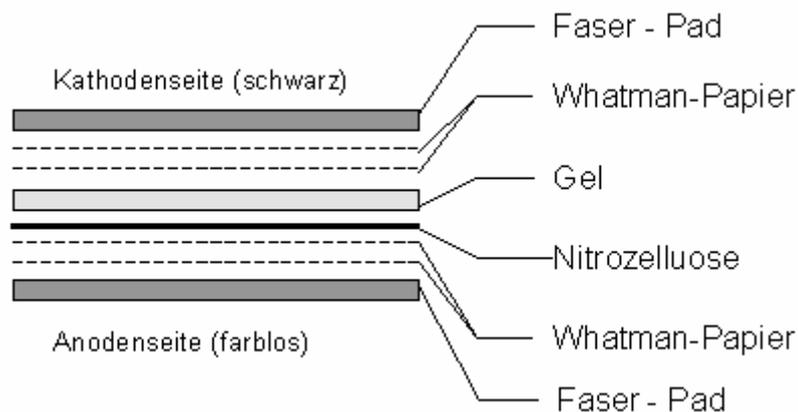
Die Proteinkonzentration wurde anhand einer bovine serum albumin (BSA)-Eichkurve, welche mit einem Photometer erstellt wurde, bestimmt. Dazu wurde Bradford-Lösung, dessen Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 in saurer Lösung Komplexe mit den Proteinen bildet, zu den Proteinextrakten im Verhältnis 1:1000 zugegeben. Dadurch wurde das Absorptionsmaximum des Farbstoffs zu einer Wellenlänge von 595nm verschoben. Diese Mischung wurde für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor im Photometer die optische Dichte bei 595nm gemessen. und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve ermittelt wurde.

### **2.2.6. Western Blot**

Mit Hilfe des Western Blots lassen sich Proteine visualisieren, so dass man semiquantitative Aussagen über Proteinmengen machen kann. Alle Proteinextrakte wurden durch die Addition von RIPA-Puffer auf dieselbe Konzentration gebracht und anschließend mit NuPAGE-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Der NuPAGE-Puffer stabilisiert die Proteine in einem denaturierten Zustand, indem er sich um die Proteine lagert und ihnen eine negative Ladung verleiht. Die Erhitzung der Proteinlösung führt zu einer Zerstörung der räumlichen Proteinstruktur, so dass sie in dem denaturierenden Agarosegel mit einer elektrischen Spannung aufgetrennt werden können. Als Laufgel wurde ein 4–12 %iges Bis-Tris-Gel verwendet. Dieses

Gel ist ein Gradientgel, dessen Acrylamidkonzentration sich kontinuierlich vergrößert, so dass sich die Porengröße für die Proteine mit zunehmender Trennstrecke verkleinert, womit sich die Auflösung verbessert. Der Laufpuffer war ein 1fach-MOPS-Puffer (3-(N-morpholino)propanosulfonsäure). Die Gelelektrophorese lief bei 200V.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine, wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus vom Blotten beim Western Blot**

Die Transfermembran aus Nitrozellulose wird zwischen Kathode und Anode platziert. Das Gel liegt der Nitrozellulose an und wird Richtung Kathode positioniert. Als Abstandhalter zur Stromquelle und zur Übertragung des Stromflusses werden über dem Gel und unter der Transfermembran mit Laufpuffer getränkte Whatman-Papiere gelegt.

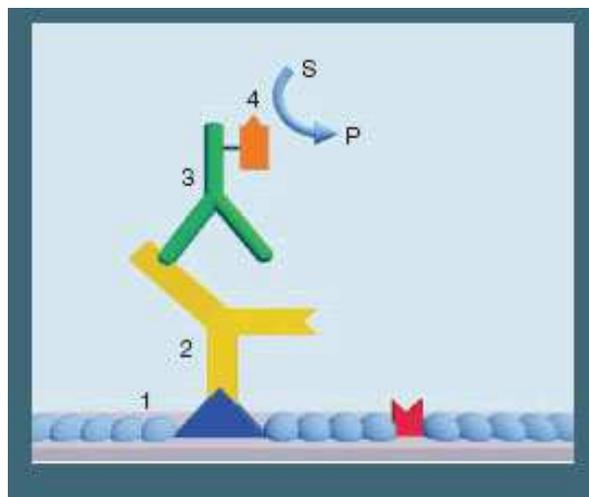
(Abb. 7 nach (Western Blot Grafik, 2011))

Zum Blotten wurde die Nitrozellulose-Membran unter das Bis-Tris-Gel und somit in Laufrichtung zur Anode gelegt (siehe Abb. 7). Darüber und darunter befanden sich mit Laufmittel (1-fach MOPS-Puffer) getränkte Whatman-Papiere. Anschließend wurde ein senkrecht zum Bis-Tris-Gel und zur Nitrozellulose-Membran gerichtetes elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 1mA pro cm<sup>2</sup> Gel-Fläche angelegt. Dabei wandern die Proteine aus dem Gel, die aufgrund der SDS-Umlagerung eine negativ geladene Hülle besitzen, auf die Nitrozellulose-Membran. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften.

Nach dem Blotten können die Proteine mit Antikörpern visualisiert werden. Da die Nitrozellulose-Membran Proteine binden kann und Antikörper auch Proteine sind, musste vor einer Behandlung mit Antikörpern die freie Membranoberfläche für Proteinbindungen blockiert werden. Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran mit 5%iger Magermilch-Lösung (Magermilch in TBST-Puffer gelöst) inkubiert, damit freie

Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Proteine aus der Milchlösung besetzt werden.

Anschließend wurde das Zielprotein mit Hilfe von Antikörpern visualisiert. Hierzu wurde die Nitrocellulose-Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. In dieser Arbeit wurde ein anti-Notch1-Antikörper (BD Bioscience Europe; Nr.: 552466) im Verhältnis 1:1000 verwendet. Danach wurde die Membran in TBST-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nach dem Waschvorgang wurde die Membran mit einem Enzym-konjugiertem Sekundärantikörper, in dieser Arbeit anti-goat, für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser band an das Fc-Ende des Primärantikörpers. An dem Sekundärantikörper war ein Horseradish-peroxidase- (HRP) Enzym konjugiert, welches eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysieren konnte. Die Membran wurde anschließend im TBST-Puffer gewaschen und mit je 250µl der Chemilumineszenz-Substrat-Lösung „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Die HRS-Peroxidase, welche an dem Sekundärantikörper gekoppelt war, katalysierte dabei die Chemilumineszenz-Reaktion, die mit einer Aufnahme auf einen Fotofilm „Cronex“ (AGFA) visualisiert wurde (siehe Abb. 8).



**Abbildung 8: Darstellung der immunologischen Proteindetektion beim Western Blot**

Der primäre Antikörper (2/gelb) bindet am membrangebundenen (1 entspricht der Membran) Zielprotein (blau). Auf den Fc-Anteil (crystallisable fragment Anteil) des primären Antikörpers bindet wiederum ein mit einem Horseradish-peroxidase Enzym (4/orange) gekoppelter sekundärer Antikörper (3/grün). Das Enzym Horseradish-peroxidase katalysiert bei Zugabe eines geeigneten Substrates (S) eine Chemolumineszenzreaktion, bei der das Produkt (P) begleitet mit einer Lichtemission entsteht, die in einer Dunkelkammer mit Hilfe von Entwicklergeräten und Film detektiert werden kann (Abb. 8 nach (Immunhistochemie Grafik, 2011))

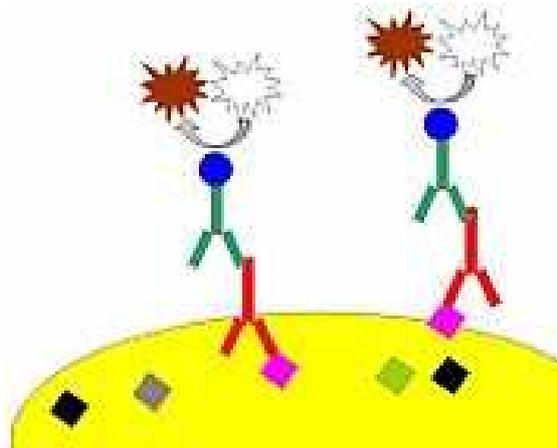
## **2.2.7. Immunhistochemie**

### **2.2.7.1. Immunhistochemie an Paraffinschnitten**

Zum Nachweis der Proteinexpression wurden neben dem Western Blot auch immunhistochemische Analysen durchgeführt, mit denen gleichzeitig die subzelluläre Lokalisierung bestimmt werden konnte. Als Probematerialien wurden Paraffinschnitte der Zelllinien Karpas1106, MedB-1, Karpas422, SUDHL4, KM-H2, L1236, L428, L540 verwendet.

Detektiert wurde das Rezeptorprotein Notch1 mittels eines monoklonalen anti-Notch1-Antikörpers der Firma Epitomics (Clone ID: EP1238Y). Die immunhistologischen Färbungen an den Schnitten wurden mit dem Envision Detektions-System (Dako) durchgeführt. Bevor die Schnitte angefärbt werden konnten, mussten sie vorbehandelt werden, damit die Antigenstrukturen demaskiert werden.

Dazu wurden die Paraffinschnitte zuerst 3x je 5 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigend Alkoholreihe (100%, 100%, 70%, 40%) rehydriert. Zum Demaskieren der Antigenstrukturen wurden die Paraffinschnitte nach dem Waschvorgang in PBS für 35 Minuten in einem Citrat-Puffer pH 6 mit einem Steamer erhitzt und daraufhin für 10 Minuten in einem Eisbad abgekühlt. Danach wurde Notch1-Antikörper in der Verdünnung 1:50 zugegeben. Nach einer 60-minütigen Inkubation wurde der Primärantikörper mit PBS ausgewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit; Envision; Code: K5007) der mit HRP gekoppelt war (siehe Abb. 9). Die HRP katalysiert eine Reaktion, in der das Chromogen eine Farbe erhält, und somit das gesuchte Protein mikroskopisch sichtbar wird. Als Chromogen für HRP wurde eine DAB-Lösung (3,3' Diaminobenzidine) verwendet. Die Reaktion wurde in Leitungswasser gestoppt. Um die Gewebestrukturen darzustellen, wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. Abschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%,100%) und Xylol entwässert und eingedeckelt. Die Schnitte wurden unter einem Zeiss Axiophot Mikroskop betrachtet: Fotos wurden mit der KY-F75U Digitalkamera geschossen und mit der DISKUS Software bearbeitet.



#### **Abbildung 9: Das Prinzip der Immunhistochemie**

Der primär Antikörper (rot) bindet spezifisch an das passende Epitop des Zielproteins (rosa). Am sekundär Antikörper, der am Fc-Anteil (crystallisable fragment Anteil) des primär Antikörpers bindet, ist ein Enzym (blau) gekoppelt, das eine Reaktion am Chromogen (weiß) katalysiert, wodurch sich die Farbe des Chromogens (weiß/braun) ändert.

(Abb. 9 nach (Immunhistochemie Grafik 2, 2011))

#### **2.2.7.2. Immunhistochemie an Kryoschnitten**

Als weiteres Material für die immunhistologischen Analysen wurden Kryoschnitte von 29 primären mediastinalen B-Zell Lymphomen verwendet. Die Schnitte wurden für 20 Minuten in 2%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Daraufhin wurde mit PBS gewaschen, bevor anti-Notch1 (Epitomics, Clone ID: EP1238Y) in der Verdünnung 1:25 für 60 Minuten inkubierte. Die weiteren Schritte wurden analog zu der Immunhistochemie an Paraffinschnitten durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. *Untersuchung von Zelllinien*

#### 3.1.1. **Primer-Etablierung**

Die qRT-PCR ist eine sehr sensitive Untersuchungsmethode, so dass eine Optimierung der Methode unablässig ist, um korrekte Ergebnisse zu erhalten. Eine Schlüsselrolle in der qRT-PCR spielen die Primer. Sie ermöglichen die gezielte Replikation der DNA-Sequenz, welche man untersuchen möchte. Dabei ist zu beachten, dass der Primer spezifisch nur an den zu untersuchenden DNA-Abschnitt bindet, damit nicht falsche oder zusätzliche Produkte amplifiziert werden. Des Weiteren sollten die Primer keine Primer-Dimere, eine komplementäre Bindung zweier Primer, bilden. Primer-Dimere würden zu einer Amplifizierung ihrer selbst führen und somit zur Bildung von Nebenprodukten, die die Ergebnisse verfälschen würden.

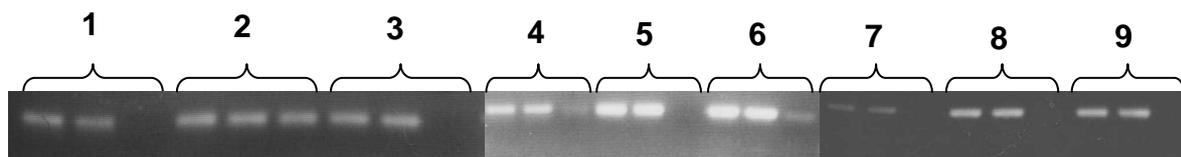
Zur Primeretablierung wurden zunächst forward und reverse Primer mit einer Primer Design Software generiert, so dass diese spezifisch an ihrer Zielsequenz binden und gleichzeitig eine geringe Affinität zueinander aufweisen, was die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Primer-Dimeren verringert. Anschließend wurden die Primer auf ihre Funktionalität und Spezifität für das gewünschte Produkt getestet. Dabei wurden auch verschiedene Mengenverhältnisse von forward und reverse Primern (siehe Tabelle 2) in einem qRT-PCR-Ansatz getestet, da deren Mengenverhältnisse einen Einfluss auf die spezifische Replikation und der Bildung von Primer-Dimeren haben.

**Tabelle 2: Primermengenverhältnisse für den Primer-Test**

Die Primer wurden vor ihrer Verwendung in den Versuchsreihen auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet. Zugleich wurde ermittelt welches Primermengenverhältnis eine größtmögliche Amplifikation des Zielgens ohne Bildung von Nebenprodukten aufweist. Dazu wurde in einer qRT-PCR das Template mit neun unterschiedlichen Mengenverhältnissen an forward und reverse Primern untersucht. Die Funktionalität und Spezifität der Primer in den einzelnen qRT-PCR Reaktionen wurden anschließend auf Grund der Ct-Werte und mit Hilfe einer Schmelzkurve analysiert.

	50 nM forward	300 nM forward	900 nM forward
50 nM reverse	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
300 nM reverse	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
900 nM reverse	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>

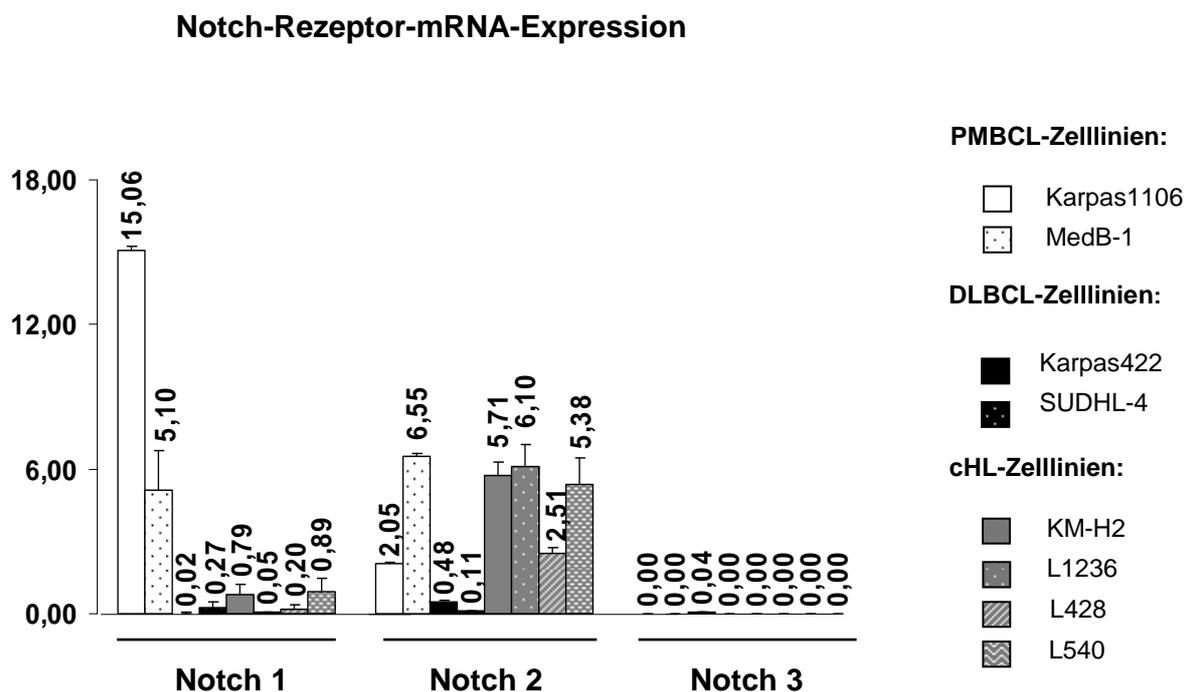
Anhand der Ct-Werte und der Schmelzkurve nach der qRT-PCR konnte man Funktionalität und Spezifität in den neun unterschiedlichen Mengenverhältnissen von Primern beurteilen. Zur besseren Darstellung des amplifizierten Templates und möglicher Nebenprodukte wurden die Ansätze nach der qRT-PCR zusätzlich noch auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel unter UV-Licht analysiert (siehe Abb. 10). Das Primermengenverhältnis, welches eine starke Amplifikation des Zielproduktes ohne Nebenprodukten zeigte, wurde für alle weiteren Versuche verwendet und kann im Abschnitt „Material und Methoden“ für jeden Primer nachgelesen werden.

**Abbildung 10: QRT-PCR-Produkte von neun unterschiedlichen Primerverdünnungen für  $\beta$ -Aktin**

Die neun Mengenverhältnisse aus Tabelle 2 von forward und reverse Primern für  $\beta$ -Aktin wurden in einem qRT-PCR-Ansatz getestet. Als Template diente ein Tonsillen-Mix. Nach einem Durchlauf in der qRT-PCR wurden die Ansätze auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Primerverdünnungen wurden auf das Gel in Triplets aufgetragen, bestehend aus einer doppelten Template-Bestimmung und einer Kontroll-Bestimmung mit  $H_2O$ . In der Abbildung steht über den Triplets das Primermengenverhältnis, dessen genauere Zusammensetzung aus Tabelle 2 entnommen werden kann. Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung des qRT-PCR-Ansatzes vom Primertest für  $\beta$ -Aktin. Das Primermengenverhältnis 5 zeigt im Vergleich zu den anderen Mengenverhältnissen die stärkste Bande ohne Bildung von Nebenprodukten (Primer-Dimer) und wurde deswegen in den qRT-PCR-Ansätzen dieser Arbeit verwendet. Alle anderen in dieser Arbeit benutzten Primer wurden analog zum  $\beta$ -Aktin-Primertest untersucht.

### 3.1.2. Die Notch1-mRNA-Expression in beiden PMBCL-Zelllinien ist stark hochreguliert im Vergleich zum normalen lymphatischen Gewebe

Die Notch1-, Notch2- und Notch3-Expressionsanalyse wurde in PMBCL-, (MedB-1, Karpas1106), in DLBCL-, (Karpas422, SUDHL-4) und in cHL-Zelllinien (KM-H2, L1236, L428, L548) mittels qRT-PCR durchgeführt. Als Referenzgewebe wurde ein Mix aus gesunden Tonsillen verwendet, welches das normale Lymphgewebe präsentierte. Dazu wurde aus drei Tonsillen jeweils gesunder Patienten die RNA extrahiert, in cDNA transkribiert und anschließend zu einem „Tonsillen-Mix“ vermischt. Als Referenzgen diente das arithmetische Mittel aus den beiden housekeeping Genen  $\beta$ -Aktin und RPL13A. Die Berechnung der relativen Notch-Rezeptor-mRNA-Expression in den einzelnen Zelllinien mit Bezug zu den beiden Referenzwerten und dem Tonsillen-Mix erfolgte mittels der delta-delta-Ct-Methode.



**Abbildung 11: QRT-PCR Analyse der relativen mRNA-Expression der Notchrezeptoren 1, 2 und 3 in verschiedenen Lymphom-Zelllinien**

Die Analyse wurde unter der Verwendung eines Tonsillen-Mix als Referenzgewebe und der housekeeping Gene  $\beta$ -Aktin und RPL13A als Referenzwerte durchgeführt. Die jeweilige Notchrezeptor-mRNA-Expression in dem Tonsillen-Mix wurde als Eins gesetzt und die Werte für Notch1, Notch2 und Notch3 wurden dem entsprechend errechnet und als Balkendiagramme dargestellt. In dem Balkendiagramm sind die Mittelwerte (errechnet aus drei unabhängigen Experimenten) und die relative Standardabweichungen (als Fehlerbalken) dargestellt.

Die beiden PMBCL-Zelllinien (siehe Abb. 11) zeigten eine im Vergleich zu dem normalen lymphatischen Gewebe hohe Notch1-mRNA-Expression, die im Falle von Karpas1106 in etwa 15-fach stärker und in MedB-1 ca. 5-fach stärker als im Tonsillen-Mix war. In cHL- und DLBCL-Zelllinien wurde weniger Notch1-mRNA detektiert als in dem Tonsillen-Mix.

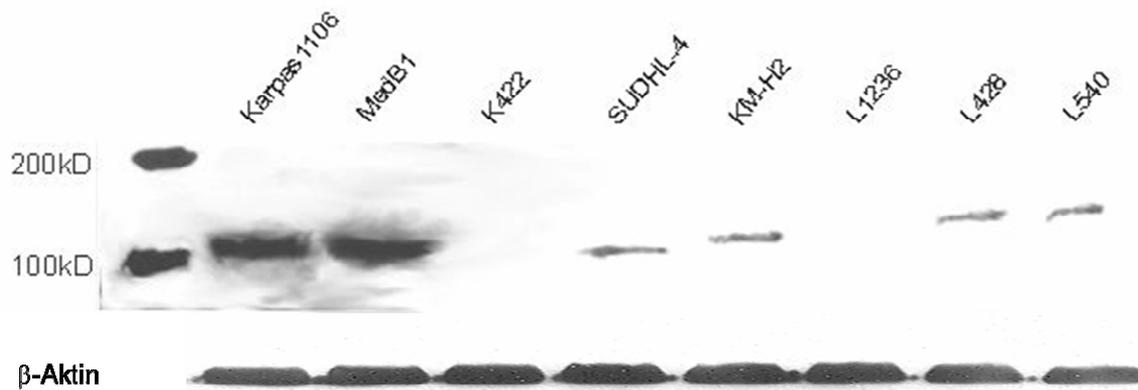
Das Notch2-mRNA-Expressionslevel war für PMBCL- und cHL-Zelllinien ähnlich und erreichte eine ca. 6-fach größere Menge als im Referenzgewebe nachgewiesen wurde. Dagegen war in DLBCL-Zelllinien die Notch2-mRNA-Expression geringer als in dem Tonsillen-Mix. Interessanterweise war die Expression der Notch3-mRNA in allen untersuchten Zelllinien im Vergleich zum Tonsillen-Mix sehr gering.

Die PMBCL-Zelllinien weisen eine starke mRNA-Expression des Notch1-Rezeptors auf. Da jedoch die mRNA-Expression nicht mit der Protein-Expression korrelieren muss, wurde das Vorkommen an Notch1-Protein in den Lymphomzelllinien analysiert.

### **3.1.3. Das Notch1-Protein ist in PMBCL- und cHL-, aber nicht in DLBCL-Zelllinien detektierbar**

Die Notch1-Proteinexpression wurde in PMBCL-, cHL- und DLBCL-Zelllinien mittels Westernblot untersucht. Der verwendete Antikörper band dabei am transmembranen Anteil des Notch1-Rezeptors (Ntm), welcher eine Größe von ca. 120 kDa hat.

In beiden PMBCL- und in drei cHL-Zelllinien (KM-H2, L428 und L540) wurde Notch1-Protein nachgewiesen (Abb.: 12). In der cHL Zelllinie L1236 und den beiden DLBCL-Zelllinien war das Notch1-Protein nicht detektierbar. Obwohl bei SUDHL-4 und L428 mittels qRT-PCR eine ähnliche Notch1-mRNA-Expression nachgewiesen wurde, unterschieden sich die beiden Zelllinien in der Proteinexpression. Bei L428 wurde das Notch1-Protein detektiert, wohingegen sich bei SUDHL-4 nur eine Bande bei 100 kDa zeigte, welche nicht dem Gewicht des Ntm von 120 kDa entspricht. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine verkürzte Version des Ntm, die beispielsweise aufgrund einer Deletion, Mutation oder posttranskriptionellen Modifikation entstehen konnte.



#### Abbildung 12: Notch1-Proteinexpression in Lymphom-Zelllinien

Die Notch1-Protein-Expression wurde mittels Westernblot in PMBCL-, cHL- und DLBCL-Zelllinien analysiert. Der Antikörper erkannte ein Epitop an den transmembranen Notch1 (Ntm)-Anteil. Die Größe des Ntm-Protein liegt auf Höhe von 120kDa. Das Housekeeping Gen  $\beta$ -Aktin diene als Kontrolle.

Die Notch1-mRNA- und –Protein-Expression in den untersuchten Lymphomzelllinien zeigen zueinander eine starke Korrelation. Damit das Notchrezeptorprotein von einem Liganden aktiviert werden kann, muss der Rezeptor jedoch membranständig vorliegen. Mit dem Westernblot lassen sich nur quantitative Informationen über die Proteinexpression gewinnen. Da jedoch die subzelluläre Lokalisation des Notch1-Rezeptorproteins von Bedeutung für dessen Funktionalität ist, wurde Notch1 in den Lymphomzelllinien immunhistochemisch analysiert.

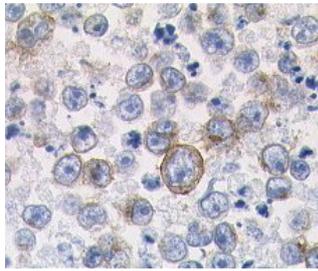
#### 3.1.4. Der Notch1-Rezeptor wird an der Zelloberfläche von PMBCL- und cHL-Zelllinien präsentiert

Die subzelluläre Notch1-Lokalisation wurde mittels Immunhistochemie auf den Paraffinschnitten aus den Zellpellets analysiert.

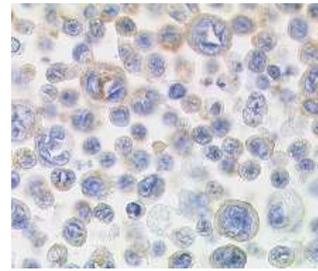
Ca. 90% der MedB1- und der Karpas1106-Zellen (siehe Abb. 13) zeigten eine intensive Zytoplasmaanfärbung und in ca. 10 – 20 % eine Membrananfärbung. Von den cHL-Zelllinien war bei L428 und L540 ca. 70% des Zytoplasmas und bis zu 40% der Membranen, bei KM-H2-Zellen ca. 1% der Membranen bzw. des Zytoplasmas angefärbt. L1236 sowie alle untersuchten DLBCL-Zelllinien zeigten keine spezifische Färbung des Notch1-Proteins, was mit den Ergebnissen aus dem Westernblot korreliert.

Der Notch1-Rezeptor wurde in den PMBCL- und in cHL-Zelllinien im Zytoplasma und auch an der Membran detektiert. Die Membranlokalisation des Notch1-Rezeptors in PMBCL-Zelllinien zeigt, dass der Notchrezeptor in einer Form vorliegt, in der er von Notchliganden aktiviert werden kann. Die Notchliganden werden wie die Rezeptoren auch auf der Membranoberfläche exprimiert. Damit findet die Notchrezeptor/liganden-Bindung interzellulär statt. Folglich müssten die Lymphom-Zelllinien Notchliganden exprimieren, um die bereitgestellten Rezeptoren aktivieren zu können. In weiteren Versuchen wurde die Notchliganden-Expression in den Lymphom-Zelllinien untersucht.

### PMBCL-Zelllinien

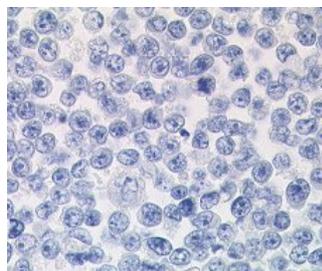


Karpas1106

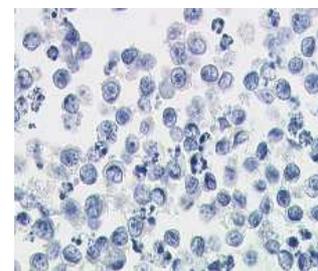


MedB-1

### DLBCL-Zelllinien

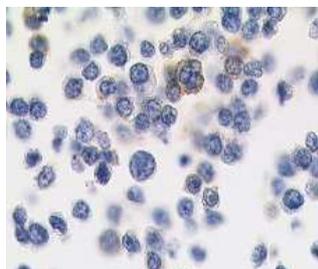


Karpas422

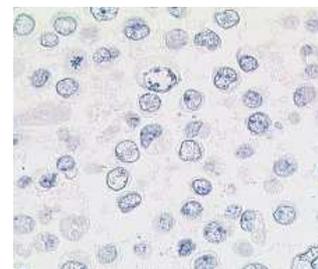


SUDHL-4

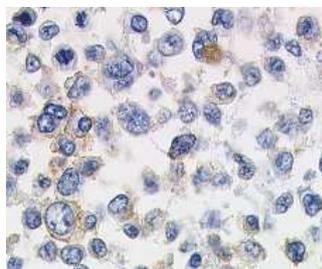
### cHL-Zelllinien



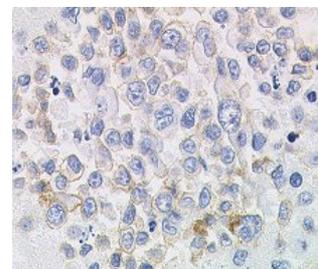
KM-H2



L1236



L428



L540

### Abbildung 13: Immunhistochemische Detektion des Notch1-Rezeptors in Lymphom-Zelllinien

Der Notch1-Rezeptor wurde immunhistochemisch an PMBCL-, DLBCL- und cHL-Zelllinien untersucht. Die Paraffinschnitte der Zellpellets wurden mit einem Notch1-Antikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit einem Horseradish-peroxidase (HRP) gekoppelten sekundären Antikörper und DAB als Chromogen. Die Präsenz des Notch-1-Proteins ist durch die braune Anfärbung des Chromogens zu erkennen. Mit Hämalaun wurden die Zellen gegengefärbt.

### **3.1.5. PMBCL- und DLBCL-Zelllinien exprimieren vorwiegend Delta-like3-mRNA wohingegen der dominante Ligand der cHL-Zelllinien Jagged2 ist**

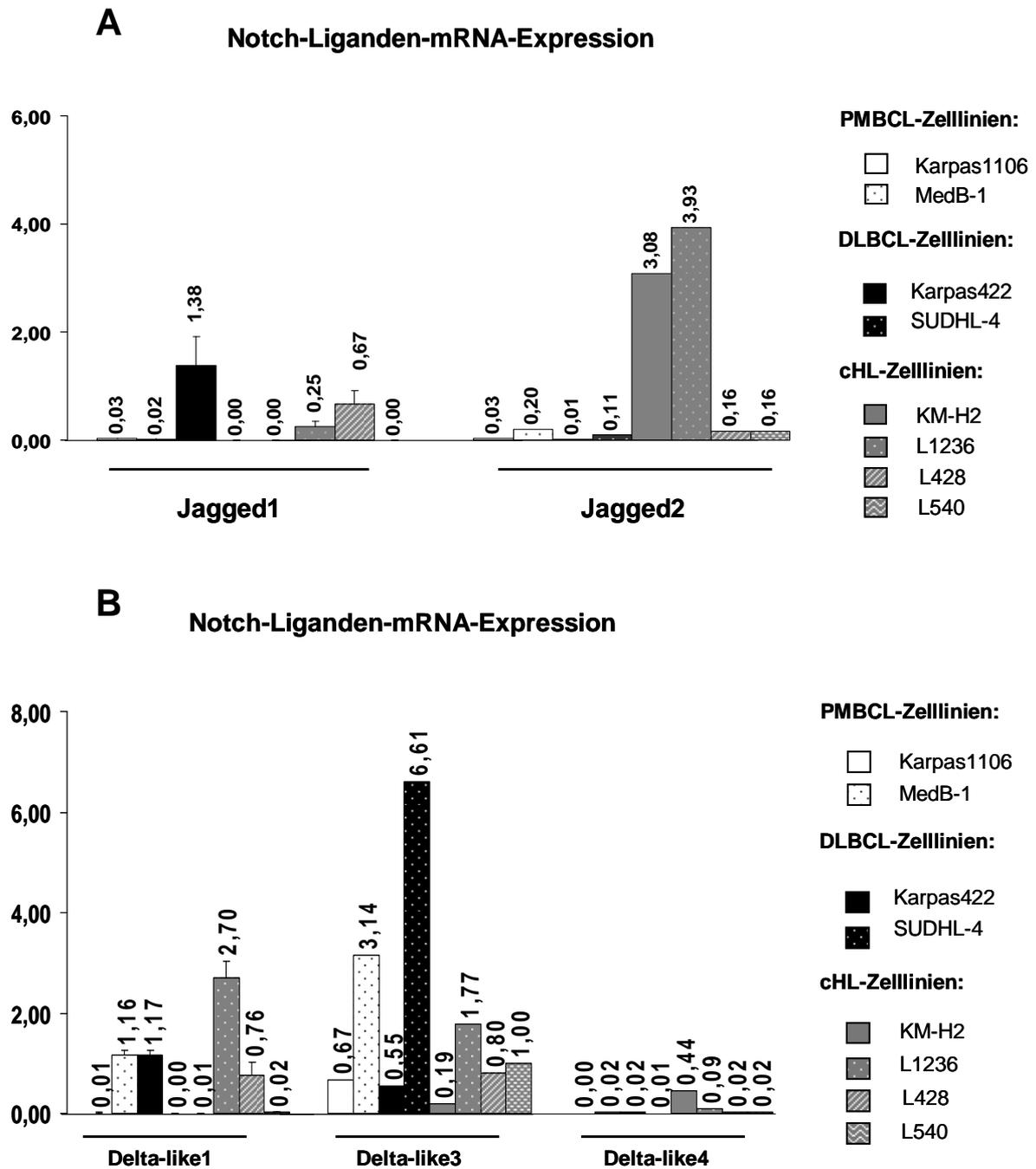
Die Notchliganden-mRNA wurde unter Verwendung der qRT-PCR in den PMBCL-, cHL-, und DLBCL-Zelllinien analysiert. In der PMBCL-Zelllinie Karpas1106 wurde deutlich weniger Notch-Liganden-mRNA als im Tonsillen-Mix exprimiert (Abb. 14). In MedB-1 konnte man eine Delta-like1- und Delta-like3-mRNA-Expression beobachten, die stärker als im Referenzgewebe war.

Die DLBCL-Zelllinien exprimierten Delta-like1- und Delta-like3-mRNA stärker als das gesunde Lymphgewebe, wobei Karpas422 im Gegensatz zu den PMBCL-Zelllinien zusätzlich eine Jagged1-mRNA Expression aufwies, die größer als in dem Tonsillen-Mix und in allen anderen Zelllinien war. Die cHL-Zelllinien zeigten ein heterogenes Ligandenexpressionmuster. Verglichen mit dem Tonsillen-Mix wiesen nur KM-H2- und L1236-Zellen eine höhere Notchliganden-Expression auf. Im Gegensatz zu den PMBCL- und DLBCL-Zelllinien, bei denen Delta-like3 am stärksten exprimiert wurde, konnte in cHL-Zelllinien vorwiegend Jagged2-mRNA detektiert werden. In geringerem Maße, jedoch mehr als im Referenzgewebe, wurde in L1236 auch die mRNA der Liganden Delta-like1 und Delta-like3 nachgewiesen.

Zusammengefasst zeigten meine Ergebnisse, dass (1) der dominante Ligand in PMBCL- und DLBCL-Zelllinien Delta-like3 ist, und dass (2) die cHL-Zelllinien am stärksten den Jagged2-Liganden exprimieren. Im Gegensatz zu der Expression der Notchrezeptoren ist die Expression der Notchliganden in den Lymphom-Zelllinien meist geringer als im normalen Lymphgewebe. Interessanterweise verhält sich die Expression der Notchrezeptoren in einigen untersuchten Zelllinien gegensätzlich zu der Ligandenexpression. In Karpas1106-Zellen, wo die stärkste Notchrezeptorenexpression im Vergleich zu den anderen Zelllinien und dem Tonsillen-Mix beobachtet werden konnte, wurde nur eine sehr schwache Ligandenexpression detektiert. Im Gegensatz dazu, wies SUDHL-4 trotz einer sehr schwachen Rezeptorenexpression, die stärkste Delta-like3-Expression auf.

Meine Ergebnisse zeigten, dass die Notchrezeptorexpression meist nicht mit der Ligandenexpression in den analysierten Lymphommodellzelllinien korreliert. Quantitative Daten, die auf mRNA-Ebene erhalten werden, dürfen jedoch nicht mit einer Proteinexpression gleichgesetzt werden. Außerdem könnten *in vivo* umliegende

nicht-Tumorzellen die nötigen Liganden exprimieren. Die Bindung des Notchliganden an den –rezeptor führt zu einer Translokation des aktivierten Notchrezeptors in den Zellkern, wo die Expression von verschiedenen Notchzielgenen beeinflusst wird. Der aktivierte Notchrezeptor ist in der Lage das HES1-Gen hochzuregulieren. Als möglicher Hinweis für das Vorliegen eines aktivierten Notchsignalweges in Lymphom-Zelllinien wurde in den weiteren Untersuchungen die HES1-Expression analysiert.

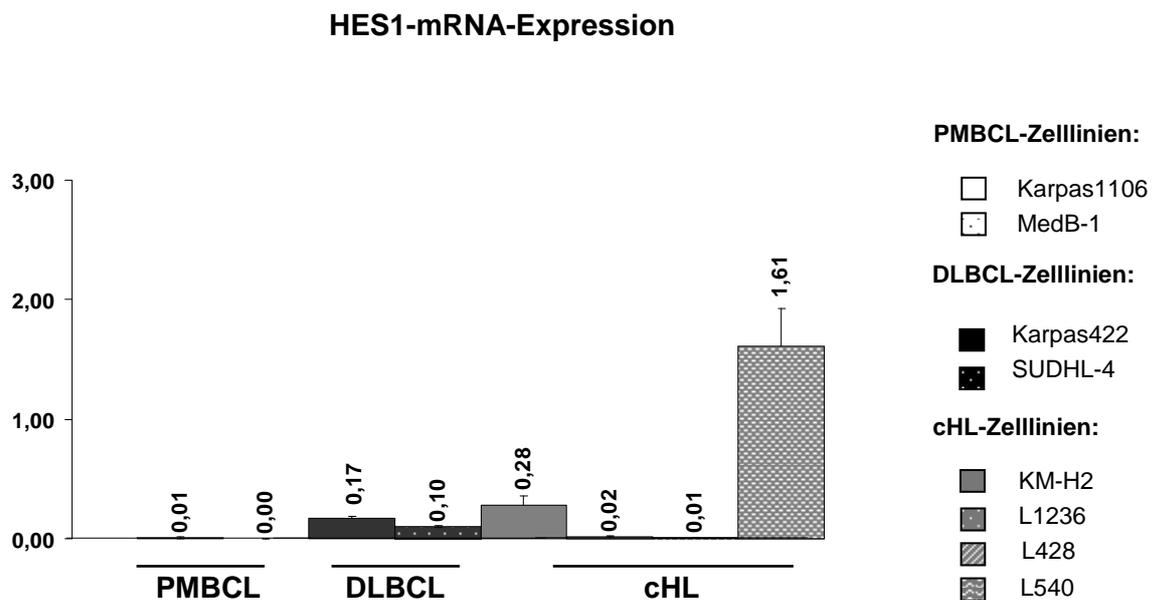


**Abbildung 14: Relative mRNA-Expression der Notchliganden in B-Zell Lymphom-Zelllinien**

Die mRNA-Expression der Notchliganden in Lymphomzelllinien wurde relativ zu der Expression im Tonsillen-Mix (Referenzgewebe) und den housekeeping Genen  $\beta$ -Aktin und RPL13A berechnet. Die jeweilige Notchliganden-mRNA-Expression in dem Tonsillen-Mix wurde als Eins gesetzt und die Werte für Jagged1, Jagged2, Delta-like1, Delta-like2 und Delta-like4 wurden dem entsprechend berechnet. A: QRT-PCR-Analyse der Jagged1 und Jagged2-Notchliganden in PMBCL-, DLBCL, cHL-Zelllinien. B: QRT-PCR-Analyse der Delta-like1-, Delta-like-2- und Delta-like4-Notchliganden in PMBCL-, DLBCL, cHL-Zelllinien.

### 3.1.6. Die HES1-mRNA Expression in PMBCL-Zelllinien ist geringer als im normalen Lymphgewebe

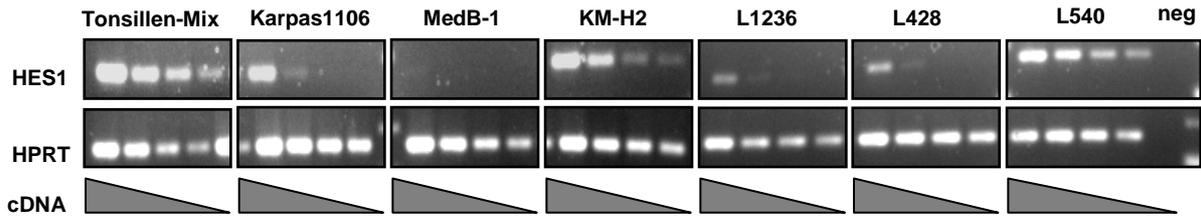
Die mRNA-Expression des HES1-Gens in den PMBCL-, cHL- und DLBCL-Zelllinien wurde mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. Die HES1-mRNA-Expression war in allen untersuchten Zelllinien, außer in der cHL Zelllinie L540, deutlich schwächer als im gesunden Lymphgewebe (siehe Abb. 15).



**Abbildung 15: Die relative mRNA-Expression des Notchzielgens HES1 in B-Zell-Lymphom-Zelllinien**

Die HES1-mRNA Expression der jeweiligen Zelllinien wurde normalisiert zu den housekeeping Genen  $\beta$ -Aktin und RPL13A und ins Verhältnis zur HES1-Expression in einem Tonsillen-Mix gesetzt. Der HES1 Expressionslevel in dem Tonsillen-Mix wurde als Eins gesetzt und die relative HES-mRNA-Expression in der untersuchten Zelllinien wurde als Balkendiagramm dargestellt.

Die qRT-PCR-Methode gestattet nur relative Aussagen über eine mRNA-Expression. Folglich lässt sich anhand der Daten aus der qRT-PCR lediglich eine geringe HES1-Expression in PMBCL-Zelllinien relativ zum lymphatischen Gewebe feststellen, jedoch nicht, ob HES1-mRNA absolut in PMBCL-Zelllinien vorliegt. Um dies zu ermitteln, wurde die HES1-mRNA-Expression mit der semi-quantitativen endpoint-PCR Methode untersucht. Dazu wurde eine cDNA-Template-Verdünnungsreihe 1:1, 1:10, 1:50, 1:100 verwendet (siehe Abb. 16).



**Abbildung 16: HES1-mRNA Expression in Lymphoma-Zelllinien**

Dargestellt ist eine endpoint PCR-Analyse des Notchzielgens HES1 in PMBCL-, DLBCL- und cHL-Zelllinien sowie in einem Tonsillen-Mix. Die cDNA-Templates wurden in einer Verdünnungsreihe, 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, untersucht. HPRT diente als housekeeping Gen. Bei „neg“ wurde als template H<sub>2</sub>O verwendet.

In allen Zelllinien bis auf MedB-1 konnte man HES1-mRNA detektieren. Die stärksten HES1-Expressionen waren im Tonsillen-Mix und den beiden cHL-Zelllinien KM-H2 und L540 zu sehen, die alle drei eine HES1-Expression auch in der schwächsten Verdünnungsstufe aufwiesen. Das zusätzliche Miteinbeziehen der Expression des housekeeping Gens HPRT zum HES1-Expressionsvergleich zwischen dem Tonsillen-Mix, L540 und KM-H2 ergab eine stärkere HES1-Expression beim normalen Lymphgewebe, da die HPRT-Expression in L540 und KM-H2 stärker als in dem Tonsillen-Mix war. Damit hatte das normale Lymphgewebe die stärkste HES1-Expression, was in der qRT-PCR-Analyse bestätigt wurde. Karpas1106 wies nur in den ersten beiden Verdünnungen eine HES1-Expression auf ähnlich wie L1236 und L428. Im Vergleich zu allen anderen Lymphom-Zelllinien unter Einbezug der HPRT-Expression, zeigte sich in Karpas1106 die geringste Menge an HES1-mRNA.

### 3.1.7. Zusammenfassung (Teil I)

In den oben beschriebenen Experimenten wurde die Expression der Notchsignalwegskomponenten in den B-Zell-Lymphom-Zelllinien auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Es wurde gezeigt, dass die PMBCL-Zelllinien im Vergleich zu den anderen Lymphom-Zelllinien und normalem Lymphgewebe eine sehr hohe Notch1-mRNA und –Protein-Expression aufwiesen. Jedoch ging diese starke Rezeptor-Expression nicht mit einer starken Ligandenexpression einher.

Die Untersuchung der mRNA-Expression von Notch-Liganden ließ erkennen, dass in den PMBCL- und den cHL-Zelllinien vorwiegend Delta-like3- und geringfügiger Delta-like1-mRNA exprimiert wurde. In cHL-Zelllinien wurde zusätzlich zu Delta-like1- und Delta-like3-mRNA auch Jagged2-mRNA nachgewiesen. In den DLBCL-Zelllinien konnten Delta-like3- und Jagged1-Transkripte detektiert werden. Interessanterweise war keine Korrelation zwischen dem Notch-Rezeptor- und Notch-Liganden-Expressionslevel in Karpas1106 und SUDHL4 zu beobachten.

Die Untersuchungen der Expression des Notchzielgens HES1 ergaben, dass in allen cHL-Zelllinien und nur in einer PMBCL-Zelllinie, Karpas1106, HES1-mRNA exprimiert wird. In MedB-1 war HES1-mRNA nicht detektierbar, obwohl MedB-1 eine hohe Notch-Rezeptor-Expression aufwies.

Anhand unserer dargestellten Ergebnisse ist es schwierig eine konkrete Aussage über eine mögliche Rolle des Notchsignalweges in PMBCL-Zelllinien zu treffen. Einerseits scheint er in den PMBCL-Zelllinien eine Bedeutung zu haben, da in diesen Zellen viele Notchrezeptoren, welche auch membranständig positioniert sind, beobachtet werden können. Andererseits ist die Ligandenexpression in PMBCL-Zelllinien meist schwächer als im gesunden Lymphgewebe und mRNA des Notchzielgens HES1 ist in MedB-1 nicht nachweisbar und wird in Karpas1106 nur schwach exprimiert.

Hierbei muss beachtet werden, dass die verwendeten Modelle klonale, über die Jahre kultivierte Tumor-Zelllinien sind, die in einer künstlichen Umgebung aufgewachsen sind. Dabei konnten sich Eigenschaften entwickeln bzw. verloren gehen, so dass sie sich letztendlich von primären Tumorzellen unterscheiden.

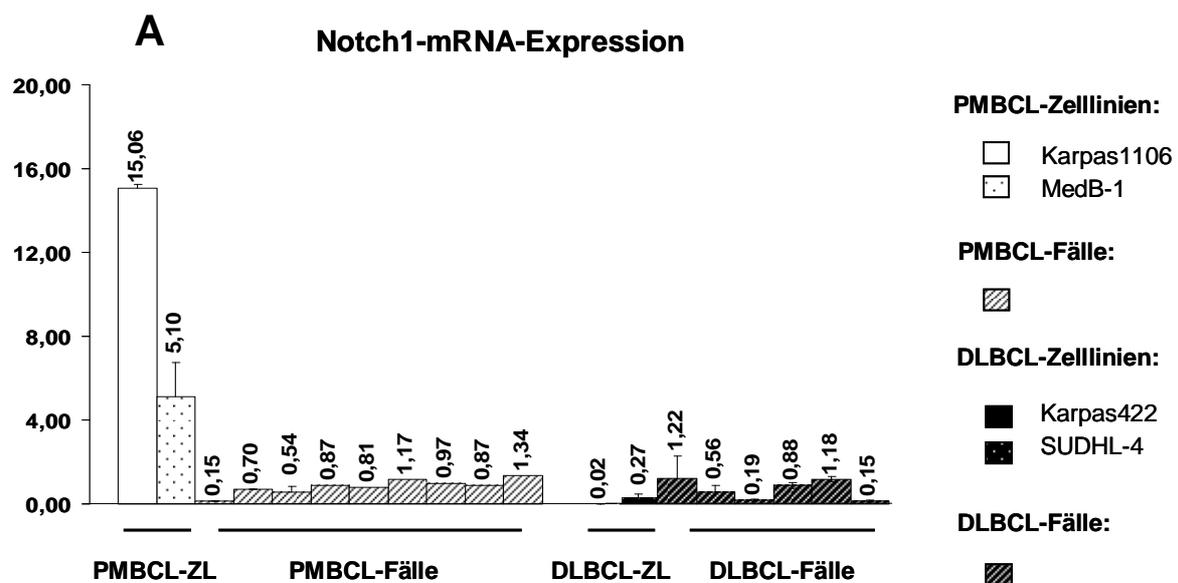
Um exaktere Aussagen über die Eigenschaften und Beschaffenheiten der untersuchten Tumorentität zu erhalten, eignet sich eine Untersuchung von primären Tumorfällen. Daher wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Notchsignalwegskomponenten auf mRNA- und Proteinebene in PMBCL- und DLBCL-Fällen analysiert. Dabei wurde analog zu den Untersuchungen an Lymphom-Zelllinien die Expression von Notchrezeptoren und -liganden sowie die Expression des Notchzielgens HES1 ermittelt.

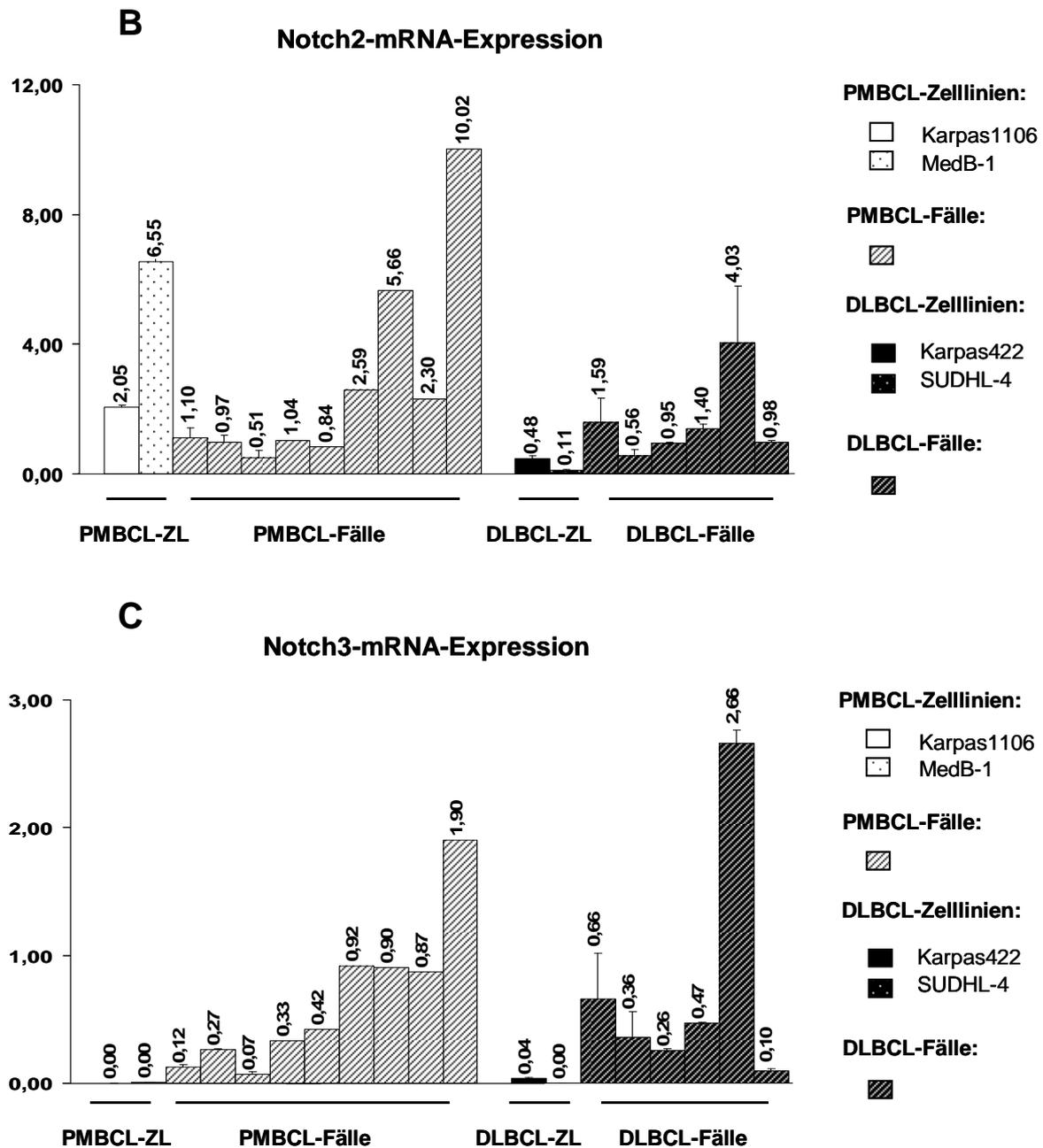
### 3.2. Untersuchung von PMBCL- und DLBCL-Fällen

#### 3.2.1. Die PMBCL-Fälle haben eine stärkere Expression an Notchrezeptoren als normales lymphatisches Gewebe

Um die Lymphome in ihrer natürlichen Umgebung untersuchen zu können, wurden tiefgefrorene bzw. in Paraffin gegossene Lymphom-Gewebe verwendet. Dazu wurden neun PMBCL- und sechs DLBCL-Fälle aus der pathologischen Abteilung der Universität Ulm ausgewählt. Die Fälle wurden während der klinischen Diagnostik der jeweiligen Entität, angelehnt an der WHO-Klassifikation für maligne Lymphome, zugeteilt. Die mRNA-Expression der Notchrezeptoren in primären PMBCL-Fällen wurde mit Hilfe der qRT-PCR untersucht und in Relation zu der Expression im normalen lymphatischen Gewebe analysiert. Als Referenzwert wurde der Mittelwert der housekeeping Gene  $\beta$ -aktin und RPL13A verwendet.

Alle untersuchten PMBCL-Fälle zeigten eine ähnlich hohe Notch1-mRNA-Expression wie normales lymphatisches Gewebe, jedoch eine deutlich geringere als die PMBCL-Zelllinien. Die DLBCL-Fälle wiesen eine heterogene Notch1-mRNA-Expression auf, die im Mittel größer als in den DLBCL-Zelllinien war.





**Abbildung 17: QRT-PCR-Analyse der relativen mRNA-Expression der Notchrezeptoren 1, 2 und 3 in B-Zell-Lymphoma-Zelllinien und primären Lymphoma-Fällen**

A-C: Die qRT-PCR-Analyse wurde unter der Verwendung eines Tonsillen-Mix als normales lymphatisches Referenzgewebe und die housekeeping Gene  $\beta$ -Aktin und RPL13A als Referenzwerte durchgeführt. Die jeweilige Notchrezeptor-mRNA-Expression in dem Tonsillen-Mix wurde als Eins gesetzt und die Werte für Notch1, Notch2 und Notch3 wurden dem entsprechend errechnet.

Die Expression von Notch2-mRNA wies sowohl in PMBCL- als auch in DLBCL-Fällen eine starke Heterogenität auf. Interessanterweise konnte man die PMBCL-Fälle in zwei Subgruppen einteilen: eine Gruppe zeigte eine relativ zum Tonsillen-Mix höhere

und den PMBCL-Zelllinien ähnliche Notch2-Expression, die andere dagegen eine relativ niedrige (siehe Abb. 17).

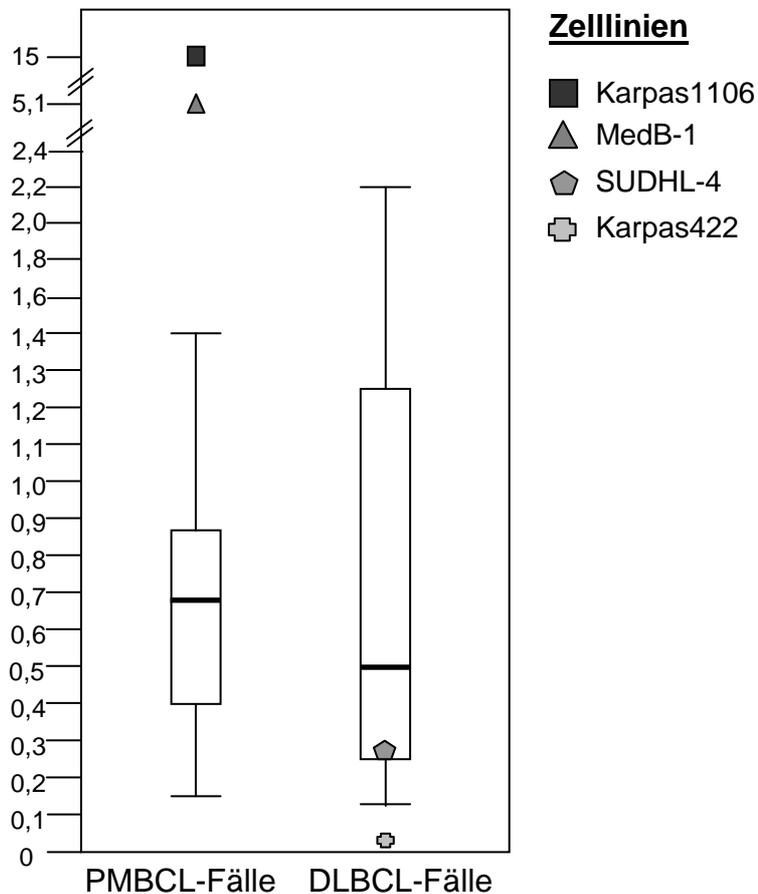
In den PMBCL- und DLBCL-Fällen war die Notch3-mRNA-Expression vereinzelt höher als im Referenzgewebe. Im Gegensatz dazu wiesen die untersuchten Zelllinien im Vergleich zum normalen lymphatischen Gewebe keine Notch3-Expression auf.

Der Notch1-Rezeptor ist von besonderem Interesse aufgrund seiner relativ zum Tonsillen-Mix hohen Expression in den PMBCL-Zelllinien. In den PMBCL-Fällen ließ sich die starke Expression nicht analog dazu darstellen. Gleichzeitig erwies sich ein Vergleich der PMBCL-Fälle mit den DLBCL-Fällen als schwer, da die DLBCL-Fälle eine starke Heterogenität in ihrem Notch1-mRNA-Expressionsmuster boten.

Ein Grund für die starke Heterogenität könnte eine zu geringe Fallzahl sein. Daher wurden die PMBCL-Fälle um 7 auf insgesamt 16 Fälle und die DLBCL-Fälle um 17 auf insgesamt 23 Fälle erweitert. Die zusätzlichen Fälle wurden vom pathologischen Institut Creteil, Paris, zur Verfügung gestellt. Die mRNA-Expression von Notch1 wurde mit der qRT-PCR ermittelt. Die Ergebnisse sind im Boxplot dargestellt (siehe Abb. 18).

Die PMBCL-Fälle exprimierten in Median etwa 30% weniger Notch1-mRNA als das normale Lymphgewebe und zum Teil mehr als das 10-fache weniger als die PMBCL-Zelllinien. Im Vergleich zu den DLBCL-Fällen war die Notch1-Expression in PMBCL-Fällen in Median mehr als 40% größer. Die DLBCL-Zelllinien zeigten eine schwächere Notch1-mRNA-Expression als die DLBCL-Fälle. Der breite Quartilabstand und die große Spannweite der Whiskers bei der DLBCL-Fälle-Box veranschaulicht deren starke Heterogenität.

## Boxplot



**Abbildung 18: Relative mRNA-Expression von Notch1 in PMBCL- und DLBCL-Fällen**

Die relative Notch1 mRNA Expression wurde in 16 PMBCL- und 23 DLBCL-Fällen mit Hilfe der qRT-PCR und relativ zu dem normalen lymphatischen Gewebe und den housekeeping Genen  $\beta$ -Aktin und RPL13A als Referenzgene analysiert. Die Notch1-mRNA-Expression in dem Tonsillen-Mix wurde als Eins gesetzt und die relative Expression der Notch1-Rezeptor-mRNA in Zelllinien und Lymphomfällen wurde berechnet. Die Ergebnisse wurden im Boxplot dargestellt. Die vertikalen Vierecke, Boxen genannt, entsprechen dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Der Median ist als dicker waagrechter Strich in der Box abgebildet und stellt die Mitte der 50% dar. Der Bereich vom Median zum Ende der oberen Box wird als oberes, der zum unteren Ende als unteres Quartil bezeichnet. In jedem Quartil liegen 25 % aller Werte. Die vertikalen Striche über und unter der Box, die Whiskers, repräsentieren alle Werte außerhalb der Box und geben damit die Streubreite aller Werte wieder. Die relativen Expressionen der Notch1-Rezeptor-mRNA in PMBCL- und DLBCL-Zelllinien sind als Symbole gekennzeichnet.

Trotz der Erhöhung der Fallzahl wurde in den PMBCL-Fällen eine geringere Notch1-mRNA-Expression als in dem Tonsillen-Mix detektiert. In den DLBCL-Fällen konnte man weiterhin ein heterogenes Expressionsmuster beobachten.

Zur subzellulären Darstellung des Notch1-Rezeptorproteins wurden die PMBCL-Fälle immunhistochemisch angefärbt.

### 3.2.2. PMBCL-Fälle exprimieren den Notch1-Rezeptor auf Proteinebene

30 PMBCL-Fälle wurden mittels Immunhistochemie auf die Proteinexpression von Notch1-Rezeptoren untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 dargestellt. Ungefähr 20% der PMBCL-Fälle wiesen eine starke und 60% eine schwache Notch1-Färbung auf. In nur ca. 20% ließ sich kein Notch1-Protein immunhistochemisch nachweisen.

**Tabelle 3: Notch1-Protein-Expression in PMBCL-Fällen**

Insgesamt 30 PMBCL-Fälle wurden auf ihre Notch1-Proteinexpression mittels Immunhistochemie analysiert. Ein Fall wurde als „stark positiv ++“ bezeichnet, wenn mehr als 50% der Tumorzellen positiv für Notch1 angefärbt waren. Eine Notch1-Anfärbung von weniger als 50% der Tumorzellen wurde als „schwach positiv +“ angeführt.

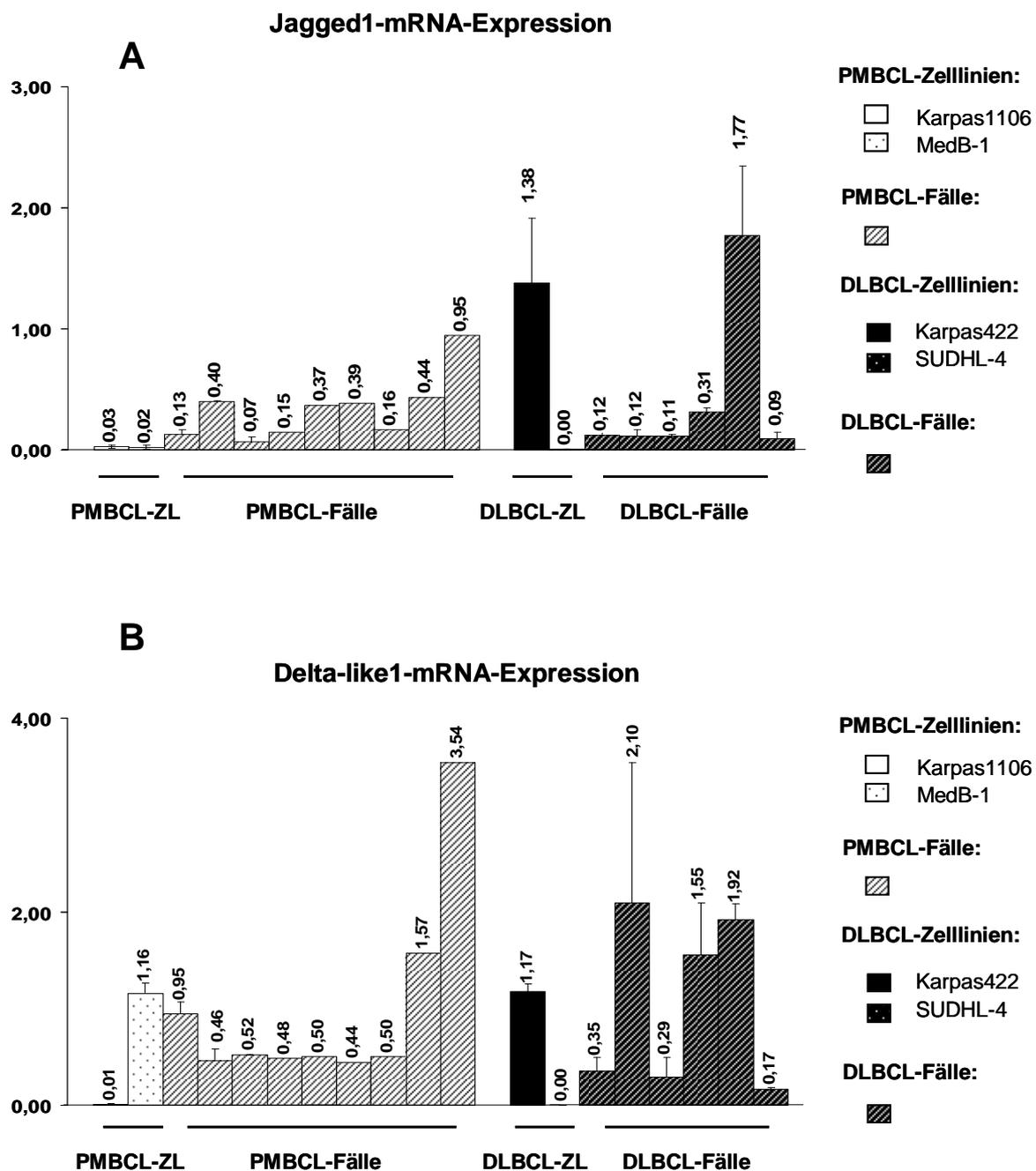
	Anzahl gesamt	stark pos ++	schwach pos +	neg
PMBCL-Fälle	30	5	18	7

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass das Notch1-Protein in ca. 80% der untersuchten PMBCL-Fälle exprimiert wird. Da der Notchrezeptor zu seiner Aktivierung einen Liganden benötigt, wurde die Notchliganden-Expression in den Lymphomfällen analysiert.

### 3.2.3. PMBCL-Fälle zeigen eine erhöhte Jagged1- und Delta-like1-Expression verglichen mit Modelzelllinien

Es wurde eine Notchliganden-mRNA-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Jagged1-mRNA-Expression in den PMBCL-Fällen deutlich stärker als in den PMBCL-Zelllinien war (siehe Abb. 19). Auch Delta-like1-mRNA ließ sich in den untersuchten PMBCL-Fällen in vergleichbarer Menge wie in MedB-1 und deutlich stärker als in Karpas1106 nachweisen.

Die DLBCL-Fälle exprimierten mehr Delta-like1- als Jagged1-mRNA. Im Vergleich zu den PMBCL-Fällen wiesen die DLBCL-Fälle ein heterogeneres Expressionsmuster auf, das dem in den DLBCL-Zelllinien glich.



**Abbildung 19: QRT-PCR-Analyse Notchliganden-mRNA-Expression in primären Lymphom-Fällen und -Zelllinien**

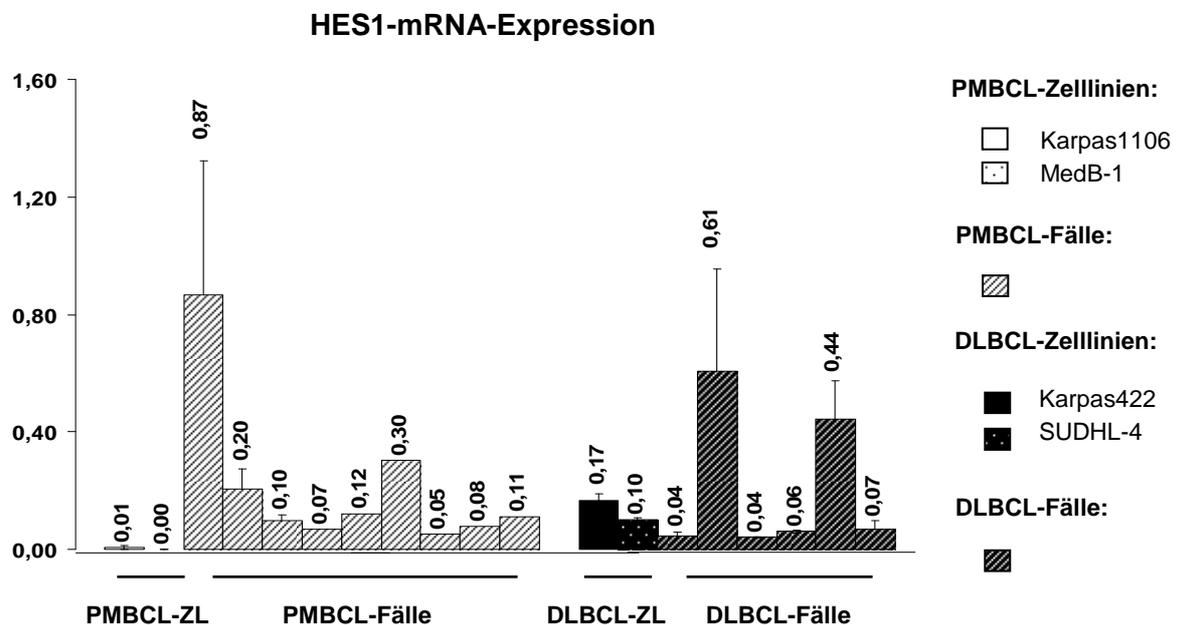
A+B: QRT-PCR-Analyse der mRNA-Expression der Notchliganden Jagged1 und Delta-like1 in PMBCL- und DLBCL-Zelllinien sowie in PMBCL- und DLBCL-Fällen unter der Verwendung eines Tonsillen-Mix als normales lymphatisches Referenzgewebe und die housekeeping Gene  $\beta$ -Aktin und RPL13A als Referenzwerte. Die jeweilige mRNA-Expression in dem Tonsillen-Mix wurde als Eins gesetzt und die Werte für Notch1, Notch2 und Notch3 wurden dem entsprechend errechnet.

Die Notchligandenexpression war in den PMBCL-Fällen höher als in den PMBCL-Zelllinien, jedoch geringer als im gesunden lymphatischen Gewebe. Unsere

Untersuchungen zeigten, dass in den primären PMBCL-Fällen sowohl Notch-Rezeptoren als auch Notch-Liganden exprimiert werden. Um zu ermitteln, ob der Notchsignalweg auch aktiviert vorliegt, wurde in den PMBCL-Fällen das Notchzielgen HES1 analysiert.

### 3.2.4. HES1-mRNA wird in den PMBCL-Fällen stärker exprimiert als in den PMBCL-Zelllinien

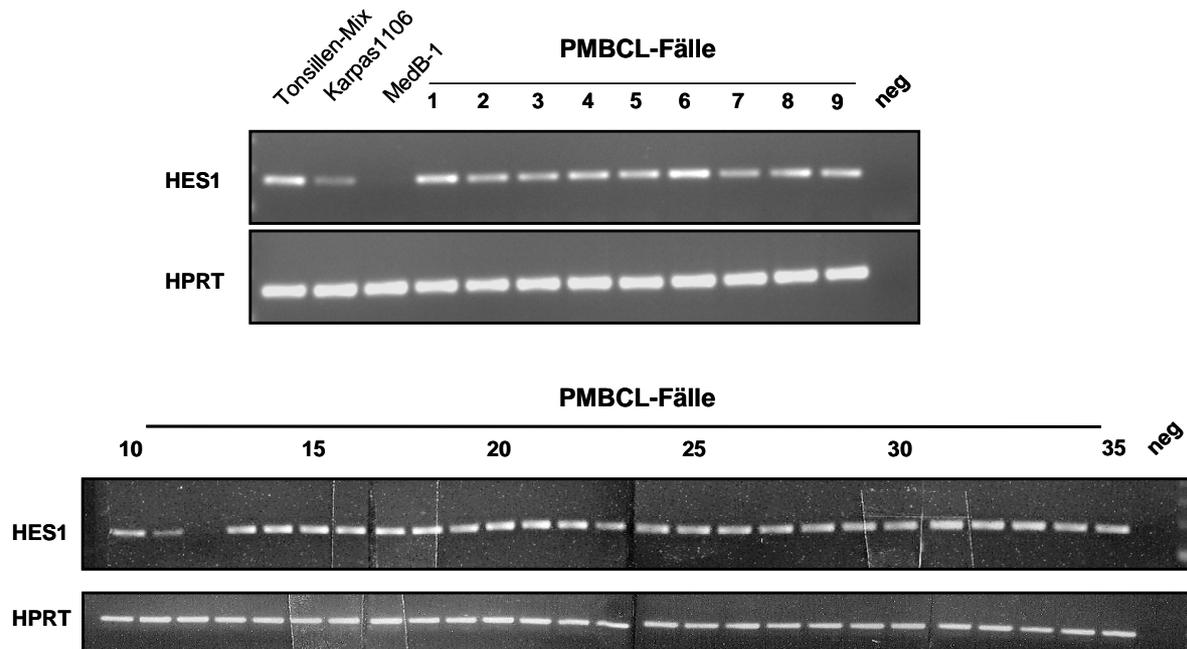
Es wurde in den PMBCL- und DLBCL-Fällen die HES1-mRNA-Expression mit der qRT-PCR untersucht. Im Vergleich zu den PMBCL-Zelllinien konnte man in den PMBCL-Fällen eine größere Menge an HES1-mRNA detektieren (siehe Abb. 20). Diese war jedoch trotzdem bis zu 20-fach geringer als im Referenzgewebe, dem Tonsillen-Mix. Die HES1-Expression in DLBCL-Fällen zeigte sich heterogen und insgesamt geringer als in den PMBCL-Fällen.



**Abbildung 20: Relative mRNA-Expression des Notchzielgens HES1 in Lymphoma-Fällen und -Zelllinien**

Es wurde eine qRT-PCR-Analyse des Notchzielgens HES1 in PMBCL- und DLBCL-Zelllinien sowie in PMBCL- und DLBCL-Fällen durchgeführt. Als Referenzgewebe wurde ein Tonsillen-Mix und als Referenzgenen der Mittelwert der housekeeping Gene  $\beta$ -Aktin und RPL13A verwendet. Die HES1-mRNA-Expression in dem Tonsillen-Mix wurde als Eins gesetzt und die Werte für die jeweiligen Zelllinien und Fälle wurden dem entsprechend berechnet.

Mit der qRT-PCR lässt sich die HES1-mRNA-Expression nur relativ bestimmen. Um absolute Aussagen über eine HES-mRNA-Expression zu erhalten, wurde daher eine endpoint-PCR durchgeführt. HPRT wurde als housekeeping Gen verwendet. In 34 von 35 PMBCL-Fällen ließ sich HES1-mRNA nachweisen (siehe Abb.: 21). Dabei ist die HES1-mRNA-Expression in PMBCL-Fällen höher als in PMBCL-Zelllinien.



**Abbildung 21: HES1-mRNA Expression in PMBCL-Zelllinien und-Fällen**

Das Notchzielgen HES1 wurde mit einer PCR-Analyse in PMBCL-, Zelllinien und -Fällen, sowie in einem Tonsillen-Mix detektiert. Als housekeeping Gen diente HPRT. „neg“ repräsentiert eine negative PCR-Kontrolle, bei der anstatt DNA-Template Wasser verwendet wurde.

### 3.2.5. Zusammenfassung (Teil 2)

Die Expressionsanalyse der Notchsignalwegskomponenten an den primären Lymphom-Fällen hat gezeigt, dass die PMBCL-Fälle sowohl Notchrezeptoren als auch -liganden exprimieren, und dass dies auch in einer Transkription des Notchtargetgens HES1 resultiert. Die DLBCL-Fälle weisen dagegen eine sehr heterogene Expression der Notchkomponenten auf, welche in Median geringer als in PMBCL-Fällen ist. Interessanterweise ist die Notchrezeptorexpression in den PMBCL-Fällen geringer als in den PMBCL-Zelllinien. Gegenteilig verhält es sich

jedoch mit der Expression von Notchliganden-mRNA und HES1-mRNA. Die PMBCL-Fälle zeigen dabei eine stärkere Expression als die PMBCL-Zelllinien.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression von Notchsignalwegskomponenten in drei hochmalignen B-Zelllymphomen, PMBCL, DLBCL und cHL auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. PMBCLs und cHLs zeigten dabei eine im Vergleich zum normalen Lymphgewebe starke Notchrezeptorenexpression. Die DLBCLs hingegen konnten wir anhand ihrer Notchexpression in zwei Subgruppen teilen: Eine Gruppe exprimiert Notchkomponenten, die andere nicht. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass dem Notchsignalweg eine Bedeutung in PMBCLs, cHLs und einem Teil der DLBCLs beigemessen werden kann.

Der Notchsignalweg ermöglicht eine interzelluläre Kommunikation und reguliert dabei wichtige Entscheidungsprozesse von Zellentwicklungen bis hin zur Organogenese (Lai 2004). Auch in der Hämatopoese, sowohl in den hämatologischen Stammzellen als auch in T- und B-Zellen, spielt Notch eine wichtige Rolle, wobei seine Bedeutung und Aufgabe abhängig von der jeweiligen Entwicklungsstufe der Zelle ist (Maillard et al. 2003). Daher verwundert es auch nicht, dass ein Einfluss des Notchsignalweges auf verschiedene hämatologische Neoplasien nachgewiesen werden konnte (Jundt et al. 2008). Eine Ergänzung zu bisherigen Studien stellt unsere Analyse von Notchkomponenten in hochmalignen B-Zell-Lymphomen dar.

Dabei konnte ich zeigen, dass PMBCL-Zelllinien Notchrezeptoren, darunter vor allem Notch1 aber auch Notch2, vermehrt exprimieren. Interessanterweise ging dies jedoch nicht mit einer vermehrten Expression an Notchliganden einher. Vielmehr konnten diese wenig oder gar nicht nachgewiesen werden. Die Ursache für die geringe Ligandenexpression könnte sein, dass *in vivo* die Notchliganden von tumorumgebenden Nachbarzellen bereitgestellt werden und damit die Notchkaskade in PMBCL-Zellen aktivieren können. Ähnliches wurde auch von cHL-Fällen berichtet: Immunhistochemische Färbungen zeigten eine Jagged1-Expression überwiegend an tumorumgebenden Zellen, weniger an HRS-Zellen (Jundt et al. 2002). Zusätzlich wird unsere Vermutung durch unsere Notch-Liganden-Expressions-Untersuchungen an PMBCL-Fällen gestützt. In den PMBCL-Fällen, welche im Gegensatz zu Zelllinien auch nicht-Tumorzellen enthalten, konnte ich mehr Notchliganden-mRNA detektieren als in PMBCL-Zelllinien. Der Notchsignalweg wird klassischer Weise durch eine Rezeptor/Liganden-Interaktion aktiviert, was zur Expression von verschiedenen

Zielgenen, worunter HES1 als Häufigstes zu nennen ist, führt. Ein größeres Angebot an Liganden würde somit in einer stärkeren Notchaktivierung resultieren. Dies ist damit vereinbar, dass ich in nahezu allen PMBCL-Fällen, in denen die Ligandenexpression größer als in PMBCL-Zelllinien war, auch eine stärkere HES1-mRNA-Expression als in PMBCL-Zelllinien feststellte. Da PMBCL-Zelllinien vermehrt Notchrezeptoren bereitstellen und die PMBCL-Fälle auch eine Liganden- sowie HES1-Expression aufweisen, könnte man annehmen, dass der Notchsignalweg eine Rolle in PMBCLs spielt. Die genaue pathobiologische Bedeutung des Notchsignalweges in PMBCLs bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Bisher fehlt es an Studien, die sich mit Notch in PMBCLs eingehend befassen. Es gibt eine Analyse von Hajdu et al. 2010, welche in geringem Umfang die Notchexpression in PMBCLs untersuchte. Diese zeigte, dass MedB-1 weder HES1- noch HES7-mRNA exprimiert. Ferner konnte in MedB-1 eine vermehrte HES1-mRNA-Expression auch nicht durch Inkubation mit Delta-like-4 Liganden induziert werden (Hajdu et al. 2010). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit meinen Resultaten, da auch meine Arbeit zeigte, dass in MedB-1 keine HES1-mRNA-Expression detektiert wird, obwohl MedB-1-Zelllinien Notchrezeptoren und Delta-like-Liganden exprimieren. Daraus lässt sich jedoch nicht schließen, dass der Notchsignalweg in MedB-1 inaktiv vorliegt. Obwohl auch unsere Ergebnisse und die von Hajdu et al. Ähnliches zeigen, kann man nicht sicher daraus schließen, dass der Notchsignalweg in MedB-1 inaktiv vorliegt, da in beiden Studien lediglich das Notchzielgen HES1 als Indikator für eine Notchaktivierung herangezogen wurde. Es ist bekannt, dass Notch auch andere Zielgene induzieren kann wie z.B. HES5 oder HES7 {{68 Iso,T. 2003;}}. Deswegen sind weitere Studien notwendig um den Notchsignalwegsstatus in MedB-1 zu klären.

Mittlerweile sind drei PMBCL-Zelllinien etabliert: MedB-1, Karpas1106 und U-2940 (Sambade et al. 2006). In der Arbeit von Hajdu et al. wurde nur eine PMBCL-Zelllinie untersucht, in der vorgelegten Arbeit wurden MedB-1 und Karpas1106 analysiert. Somit wäre es von Interesse die neu etablierte U-2940 Zelllinie auf die Notchsignalkomponente und deren Expression zu untersuchen. Desweiteren wurde in der Studie von Hajdu et al. die Notchaktivierung mit einem Delta-like 4 Liganden durchgeführt. Es gibt fünf verschiedene Notchliganden, die jeweils unterschiedliche Effekte auf den Zellprozess ausüben können (Sprinzak et al. 2010)}}. Es ist denkbar, dass sich der Notchsignalweg in PMBCL-Zellen durch Jagged- aktivieren ließe,

jedoch nicht durch Delta-like-Liganden. Ähnliches wurde in anderen malignen B-Zell Erkrankungen wie im cHL und Multiples Myelom berichtet, in denen lediglich Jagged-Liganden als Notchaktivatoren beschrieben wurden (Mirandola et al. 2011).

Eine weiter interessante Fragestellung wäre, inwiefern sich eine Aktivierung der Notchkaskade auf die Zellbiologie in PMBCLs auswirkt. Ein Hinweis dazu könnten Forschungsergebnisse des Notchsignalweges an cHLs geben, das wahrscheinlich denselben zellularen Ursprung besitzt und einige klinische und molekulare Gemeinsamkeiten zum PMBCL aufweist (Faris et al. 2009). Im Gegensatz zu PMBCLs wurde die Funktionalität des Notchsignalweges in cHLs umfassend untersucht. So zeigte Jund et al. 2002, dass die Aktivierung des Notchsignalweges in cHL-Zelllinien *in vitro* in einer erhöhten Zellproliferation und Hemmung der Apoptose resultiert, wogegen eine Hemmung des Notchsignals durch Gamma-sekretase-inhibitoren (GSI) sich gegen die Zellproliferation auswirkt und die Apoptose induziert (Jundt et al. 2002). Ob ähnliche physiologische Effekte auch bei PMBCLs auftreten könnten, bedarf noch weiteren Untersuchungen. Eine der Möglichkeiten dies zu eruieren, wäre eine Kokultivierung der PMBCL-Zelllinien mit Zellen, die Notchliganden produzieren. Eine anschließende Analyse der Zellproliferation and der Apoptoserate könnte klären, ob die Notchaktivierung eine pathophysiologische Auswirkung auf die PMBCL-Zellen hat. Zugleich wäre interessant, ob eine Blockierung der Notchkaskade mit beispielsweise GSIs das Tumorzellwachstum beeinträchtigt. Sollte der Notchsignalweg in PMBCLs eine Rolle spielen, so könnte man dies therapeutisch nutzen, indem man neben der etablierten Chemoherapie, GSIs zur Wachstumshemmung und Apoptoseinduzierung der Tumorzellen einsetzt. Den Effekt einer GSI-Therapie auf das Tumorwachstum wurde in T-ALLs untersucht. In Mausmodellen konnte ein antitumoraler Effekt bei Monotherapie mit GSIs beobachtet werden, welcher jedoch mit starken intestinalen Nebenwirkungen einherging (Tammam et al. 2009). Eine medikamentöse Phase 1 Studie an 7 Probanden, welche ein T-ALL-Rezidiv aufwiesen, wurde jedoch frühzeitig wegen dosislimitierenden intestinalen Beschwerden und fehlender antitumoröser Wirkung abgebrochen (Ferrando 2009). Um die intestinalen Nebenwirkungen zu verringern, wurde GSI mit Kortikoiden kombiniert und Mäusen, welche an Glukokortikoid-resistenter T-ALL erkrankt waren, verabreicht. Dabei zeigte sich unter der Kombinationstherapie zum einen eine protektive Wirkung auf die GSI-induzierte intestinale Toxizität, zum Anderen ein antileukämischer Effekt (Real et al. 2009).

Neuere Therapieansätze versuchen die Notchkaskade mit spezifischen Anti-Notchrezeptor-Antikörpern zu blockieren. Eine Behandlung mit Anti-Notch1-Antikörpern führte in Mausmodellen zu einer Regression der T-ALL in den Mäusen, ohne dass intestinale Nebenwirkungen auftraten (Wu et al. 2010). Letztlich scheint die Blockierung der Notchkaskade ein erfolgsversprechender Therapieansatz zu sein, welche jedoch noch weiterer Untersuchungen auch in B-Zell Lymphomen bedarf (Swaminathan 2009).

Jundt et al. 2002 zeigte, dass cHL-Zellen eine vermehrte Notchrezeptorexpression aufweisen, was sich mit unseren Ergebnissen in den zwei PMBCL-Zelllinien deckt. Dabei wirkt sich nach Jundt et al. 2002 eine Notchaktivierung proliferationssteigernd auf die Tumorzelle aus (Jundt et al. 2002). Interessanterweise konnten wir bei unserer Analyse eine verstärkte Expression von Notch2- und Jagged2-mRNA in cHL-Zelllinien beobachten, obwohl in der Studie von Jundt et al. 2002 vorwiegend eine Notch1/Jagged1-Interaktion erwähnt wurde. Eine von Kochert et al. 2011 angefertigte Expressionsanalyse von Notchkomponenten an cHL-Zelllinien (L428, L1236, KM-H2, L591 (EBV+), HDLM-2, L540 and L540Cy) und anderen B-Zell Lymphomen Zelllinien (pro-B lymphoblastic leukemia (Reh), Burkitt's lymphoma (Namalwa, BL-60 and BJAB), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL; SU-DHL-4), T lymphoblastic lymphoma (SUP-T1) unterstützt hierbei meine Ergebnisse. In der Studie wurden zunächst 102 Notchassoziierte-Gene untersucht und ergänzend dazu mit real-time-PCR und Westernblot die Expression von Notch1 – 4 und den Notchliganden, Jagged und Delta-like, analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass das Expressionsmuster an Notchkomponenten so charakteristisch ist, dass es als Unterscheidungskriterium von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zellen herangenommen werden kann, und dass HRS-Zellen vermehrt Notch2 und Jagged2 auf mRNA- und Proteinebene exprimieren (Kochert et al. 2011). So könnte neben Notch1 auch Notch2 eine wichtige Funktion auf die Tumorzelle ausüben. Bei Jundt et al. 2002 wurden mit der GSI alle Notchrezeptoren gleichermaßen blockiert, so dass man bezweifeln kann, dass Notch1 alleinig für den antiproliferativen Effekt verantwortlich ist. Wenn man die Rezeptoren gezielt mit beispielsweise blockierenden Antikörpern oder siRNAs hemmen würde, könnte man sich Klarheit über die Rolle der einzelnen Notchrezeptoren auf die HRS-Zell-Physiologie verschaffen.

Interessanterweise ging in cHL-Zelllinien eine Expression von Notchrezeptoren und –liganden nicht mit einer vermehrten HES1-Expression einher. Man sollte aber

beachten, dass Notch auch andere Zielgene regulieren kann. Dabei sind aus der „enhancer of split“ Familie neben HES1 auch HES5 und HES7 sowie die verwandten basic helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren HERP1 und 2 (HES-related repressor Protein) bekannt von Notch aktiviert werden zu können (Iso et al. 2003b). Folglich kann in cHL-Zelllinien eine Notchaktivierung, zumal sie über eine Notch2/Jagged2-Interaktion aktiviert wurde, zur Transkription anderer Zielgene als HES1 führen. Diese Vermutung wird von einer Studie gestützt, in der berichtet wird, dass cHL-Zelllinien im Vergleich zu anderen B-Zell Lymphomen vermehrt HES7- und HERP1-mRNA exprimieren, und dass ihre Expression durch inhibitorische Intervention in den Notchsignalweg negativ beeinflusst wird (Kochert et al. 2011). In der Studie wurde auch bestätigt, dass die Inhibition des Notchsignalweges zu einer Hemmung der Proliferation und Induktion der Apoptose führt. Das Besondere dabei war, dass Notch nicht durch GSI inhibiert wurde, wie in anderen Studien, sondern durch den knock-out von Mastermind-like 2 (MAML-2), eines Coaktivators des Notchsignalweges auf Transkriptionsebene (Kochert et al. 2011).

Es wurde jedoch nicht nur eine wachstumsfördernde Rolle des Notchsignalweges in cHL-Zellen postuliert. Zweidler-McKay et al. berichtete, dass verschiedene B-Zell Lymphom Zelllinien, darunter auch die cHL-Zelllinie, L428, auf eine Aktivierung der Notchkaskade durch Jagged1 proliferationshemmend und apoptosesteigernd reagieren. Dagegen wird bei Notchinhibition durch GSIs das Wachstum gefördert und die Apoptose blockiert (Zweidler-McKay et al. 2005). Diese Ergebnisse stehen im starken Gegensatz zu den vorherig erwähnten Studien, so dass weitere detaillierte Analysen des Notchsignalweges in cHL notwendig sind. Insgesamt kann man sagen, dass Notch in den cHLs exprimiert wird und anscheinend eine wichtige Rolle in der Wachstumskinetik der cHLs spielt. Ob sich ein aktiver Notchsignalweg positiv auf das Wachstum von HRS-Zellen auswirkt, bleibt mit Zweifel behaftet und sollte durch eingehende Studien an cHL-Zelllinien bestätigt werden, da man sich dies therapeutisch zu Nutze machen könnte, indem man adäquat in den Notchsignalweg interveniert und somit Apoptose und Wachstumsstop induziert.

Neben der Auswirkung des Notchsignalweges auf die Wachstumskinetik werden in HRS-Zellen auch andere, sehr bedeutsame Effekte auf die Tumorbilogie, diskutiert. So wird Notch ein wesentlicher Beitrag zur Dedifferentierung der HRS-Zellen beigemessen. Gleichzeitig induziert Notch in HRS-Zellen die Transkription von T-Zell spezifischen Genen (Jundt et al. 2008). Eine weitere wichtige Funktion von Notch in

cHL-Zelllinien ist dessen Eingreifen in den feinregulierten NF- $\kappa$ B-Signalweg. So führt eine Notchaktivierung zu einem aktiven NF- $\kappa$ B-Signalweg, der unter anderem das Zellwachstum kontrolliert und bei Aktivierung die Proliferation der Tumorzelle fördert (Schwarzer et al. 2011).

Laut Schwarzer et al. 2011 scheint Notch drei wichtige Effekte in cHL-Zelllinien auszuüben: Notch induziert 1) die Proliferation, 2) die Dedifferenzierung sowie die Expression von T-Zell spezifischen Genen und 3) den NF- $\kappa$ B-Signalweg, der Apoptose und Wachstum reguliert. Ein konstitutiv aktiver NF- $\kappa$ B-Signalweg ist sowohl in cHLs als auch in PMBCLs ein Charakteristikum (Faris et al. 2009).

Da über ein Drittel der hochregulierten Gene in PMBCLs auch in cHLs exprimiert werden, vermutet man, dass entweder beide Tumorentitäten von derselben Zelle, einer thymischen B-Zelle, abstammen oder in beiden wichtige Signalwege hochreguliert sind, so dass dies zu einer ähnlichen Genexpression führt (Rosenwald et al. 2003). Einer der Signalwege, der hierzu in Frage käme, wäre der NF- $\kappa$ B- bzw. der JAK/STAT-Signalweg (Rosenwald et al. 2003). Ein weiterer jedoch könnte der Notchsignalweg sein, der den aktiven NF- $\kappa$ B-Signalweg induziert und damit eine weitere Ähnlichkeit zwischen cHL und PMBCL darstellt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PMBCLs eine sogar noch stärkere Expression an Notchrezeptoren als in cHLs aufweisen. Inwiefern der Notchsignalweg eine weitere, wichtige Gemeinsamkeit zwischen PMBCLs und cHLs darstellt und ob der Signalweg ähnlich starke Einflüsse auf die Tumorbologie in PMBCLs wie in cHLs ausübt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

In dieser Arbeit wurde auch DLBCLs auf ihre Notchexpression untersucht. Die DLBCLs stellen die größte Gruppe der Non-Hodgkin Lymphome dar. Klinisch, therapeutisch und prognostisch unterscheiden sich die DLBCLs untereinander, so dass sie in verschiedenen Subgruppen unterteilt werden. Eine Möglichkeit der Einteilung der DLBCLs ist in ihren zellulären Ursprung (cell-of-origin). Daraus ergeben sich die beiden Subgruppen, GC-like (germinal center) und ABC-like (activated B-cell) DLBCL (Alizadeh et al. 2000).

Meine Expressionsanalysen haben gezeigt, dass DLBCL-Zelllinien weder Notchrezeptoren noch HES1 exprimieren. Bei Betrachtungen der DLBCL-Fälle fiel auf, dass die Notchkomponentenexpression, darunter vor allem die Notch1-expression, sehr heterogen war. Dies lässt vermuten, dass Notch in einem großen Teil der DLBCLs inaktiv vorliegt. Eine Studie von Chiarmonte et al. 2003 in der die

Expression von Notchkomponenten mitunter in zwei GC-like DLBCL-Zelllinien (Val, Oci-Ly7) untersucht wurde, stützt diese Behauptung. In beiden untersuchten DLBCL-Zelllinien konnte weder Notch1 noch HES1 detektiert werden, was die Autoren zu dem Entschluss kommen ließ, dass die Notchsignalkaskade inaktiv in den DLBCL-Zelllinien vorliegt (Chiaramonte et al. 2003). Im Gegensatz zu dieser Studie und unseren Ergebnisse haben einige Arbeitsgruppen einen aktiven Notchsignalweg in DLBCLs postuliert. Tohda et al. 2006 zeigte, dass eine neue DLBCL Zelllinie, TMD8. Notchrezeptoren-, -liganden- und HES1-mRNA exprimiert. Desweiteren konnte die Zellproliferation in TMD8 mittels GSI gehemmt werden (Tohda et al. 2006). In einer anderen Studie wurde eine große Anzahl an DLBCL-Fälle auf Auffälligkeiten im Notch2-Rezeptor untersucht. Dabei wurde in 8% der untersuchten DLBCL-Fälle Mutationen bzw. Alleldublikationen von Notch2 beschrieben. Diese Aberrationen sind für die Notch2-Überexpression verantwortlich, wie es an Modelzelllinien gezeigt wurde. Interessanterweise waren die Mutationen und Dublikationen ausschließlich in Non-GC-like DLBCLs gefunden worden (Lee et al. 2009). So ist es durchaus möglich, dass innerhalb der DLBCLs Subgruppen existieren, in denen Notch aktiv und inaktiv vorliegt. Bisherige Studien über DLBCLs und deren Notchaktivität sowie unsere Ergebnisse führen zu dem Verdacht, dass die Einteilung der DLBCLs nach ihrem zellulären Ursprung mit ihrer Notchaktivität korrelieren könnte. Und zwar zeigten GC-like DLBCLs, zu denen die in dieser Arbeit untersuchten DLBCL-Zelllinien Karpas422 und SUDHL-4 gehören, sowie die von Chiaramonte et al. 2003 untersuchten Zelllinien Val und Oci-Ly7 (Chiaramonte et al. 2003), keine Notchaktivität. Demgegenüber weist die Zelllinie TMD8, welche zu den ABC-like DLBCLs gehört, einen aktiven Notchsignalweg auf. Ferner wurden Notch2-Mutationen und Alleldublikationen, wie zuvor schon berichtet, ausschließlich in non-GC-like DLBCLs gefunden. Interessanterweise wurde nur in ABC-like DLBCLs eine konstitutive Aktivität vom NF- $\kappa$ B-Signalweg nachgewiesen. Dies könnte zum Teil als Folge der erhöhten Notchaktivität in der ABC-Subgruppe betrachtet werden. Allerdings fehlt es an genauen Analysen des Crosstalks zwischen dem Notch- und dem NF- $\kappa$ B-Signalweg in ABC-like DLBCLs. Zusammenfassend stelle ich die Behauptung auf, dass GC-like DLBCLs einen inaktiven, ABC-like DLBCLs einen aktiven Notchsignalweg aufweisen. Diese Vermutung muss jedoch noch durch weitere Studien verifiziert werden. Man müsste eine größere Anzahl an ABC- und GC-like DLBCL-Zelllinien und -Fälle auf ihre Notchkomponentenexpression

untersuchen. Dabei scheint vor allem die Notch1- und 2-Expression ein wichtiger Parameter zu sein, da sich hier die größte Heterogenität zeigte. Sollte sich ein Zusammenhang zwischen Notchaktivität bzw. -expression von Notchrezeptoren und den DLBCL-Subgruppen, GC- und ABC-like herausstellen, so könnte dies als Diagnoseparameter zwischen diesen zwei Subgruppen genutzt werden.

Ferner könnte der Notchsignalweg auch therapeutisch genutzt werden. Bislang werden sowohl GC- als auch ABC-like DLBCL nach demselben Regime mit R-CHOP behandelt. Seit der Einführung von Rituximab hat sich das Gesamtüberleben in den DLBCLs insgesamt deutlich gebessert, jedoch besteht weiterhin ein Unterschied beim Outcome unter R-CHOP zwischen GC- und non-GC-like DLBCLs (3-jahres Überleben 85% vs 69%) (Iqbal et al. 2011, Fu et al. 2008). Sofern man leichter zwischen GC- und Non-GC-like DLBCLs unterscheiden könnte, könnte man die Stärke der Chemotherapie je nach Risikoprofil anpassen. Möglicherweise würden non-GC like DLBCL von einer Eskalation der Chemotherapie profitieren, wohingegen es bei GC-like DLBCLs bei Eskalation eher zu einer Potenzierung der Chemonebenwirkungen kommen würde. Auch wäre es interessant, ob eine Blockade der Notchkaskade einen antitumoralen Effekt in non-GC-like DLBCLs hätte. So könnte man durch selektive Blockade der Notchkaskade mit GSIs oder anderen Notchkaskadehemmern eine synergistische Wirkung zur etablierten R-CHOP-Therapie erreichen, welche zu einem bessern Gesamtüberleben in den non-GC-like DLBCLs führt.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass Notchsignalwegskomponenten in PMBCL, cHL und einer Subgruppe der DLBCLs vermehrt exprimiert werden. Dabei korrelieren die Ergebnisse weitgehend mit denen der Literatur und ergänzen diese, so dass ich abschließend zu der Vermutung komme, dass der Notchsignalweg neben der bekannten Rolle in cHLs auch eine wichtige Rolle in PMBCLs und in einem Teil der DLBCLs spielt. Außerdem vermute ich anhand meiner Ergebnisse und unter Einbezug der Literatur, dass sich das Expressionsmuster der Notchkomponenten als Unterscheidungsparameter zwischen GC- und ABC-like DLBCLs eignen würde.

Diese Arbeit legt die ersten Bausteine zu weiteren Analysen des Notchsignalweges in B-Zell Lymphomen, welche dann folgende Vermutungen klären werden, nämlich ob 1) die Notchkaskade ein erfolgsversprechendes therapeutisches Target wird, mit dessen Inhibition man die Prognose der PMBCLs und ABC-like DLBCLs verbessern könnte und ob 2) die Notchexpression als Unterscheidungskriterium zwischen GC-

und ABC-like DLBCLs dienen, und somit die Diagnostik der Subgruppen erleichtern und damit individuellere, spezifischere Therapieansätzen bei GC- und non-GC-like DLBCLs schaffen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Der Notchsignalweg ist ein stark konservierter Signalweg, der in zahlreichen Entwicklungsprozessen und Zellschicksalsentscheidungen bei einer Vielzahl von Zelltypen involviert ist. Dabei spielt er auch eine zunehmend wichtigere Rolle in der Hämatopoese und in der Pathogenese hämatologischer Erkrankungen. So kann eine konstitutive Aktivität der Notchkaskade ursächlich für eine T-ALL sein. Beim Hodgkin Lymphom scheint sich ein aktiver Notchsignalweg positiv auf die Proliferation und negativ auf die Apoptose der Tumorzellen auszuwirken. Für Non Hodgkin Lymphome ist die Rolle von Notch jedoch noch unzureichend verstanden. In dieser Arbeit wurde eine Expressionsanalyse der Notchsignalwegskomponenten im klassischen Hodgkin Lymphom (cHL), im diffus großzelligen B-Zell Lymphom (DLBCL) und im primären mediastinalen B-Zell Lymphom (PMBCL), welches viele Gemeinsamkeiten zum cHL aufweist, vorgenommen. Die Expression der Notchrezeptoren und –liganden sowie des Notchzielgens hairy enhancer of split 1 (HES1) wurden in humanen Zelllinien und primären Fällen analysiert.

Dabei zeigte sich, dass Notchsignalwegskomponenten in PMBCL, cHL und einer Subgruppe der DLBCLs vermehrt exprimiert werden. Unsere Ergebnisse korrelierten weitgehend mit den publizierten Daten und ergänzen diese, so dass ich abschließend zu der Annahme komme, dass der Notchsignalweg neben der bekannten Rolle in cHLs auch eine wichtige Rolle in PMBCLs und in einem Teil der DLBCLs spielt. Außerdem weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass sich das Expressionsmuster der Notchkomponenten als ein Unterscheidungsparameter zwischen GC- und ABC-like DLBCLs eignen könnte.

Obwohl es weiterer Studien bedarf, um die genaue Rolle des Notchsignalweges in PMBCLs und DLBCLs festzustellen, öffnet diese Arbeit neue Perspektiven bezüglich der Nutzung der Notchkaskade als therapeutisches Target und als prognostischen Faktor in PMBCLs und DLBCLs.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, and others, 'Distinct Types of Diffuse Large B-cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling', *Nature*, 403 (2000), 503–511
- [2] Allenspach, E. J., I. Maillard, J. C. Aster, and W. S. Pear, 'Notch Signaling in Cancer', *Cancer biology & therapy*, 1 (2002), 466–476
- [3] Allman, David, Jon C. Aster, and Warren S. Pear, 'Notch Signaling in Hematopoiesis and Early Lymphocyte Development', *Immunological reviews*, 187 (2002), 75
- [4] Aster, J. C., L. Xu, F. G. Karnell, V. Patriub, J. C. Pui, and W. S. Pear, 'Essential Roles for Ankyrin Repeat and Transactivation Domains in Induction of T-cell Leukemia by Notch1', *Molecular and cellular biology*, 20 (2000), 7505–7515
- [5] Bargou, R. C., F. Emmerich, D. Krappmann, K. Bommert, M. Y. Mapara, W. Arnold, and others, 'Constitutive Nuclear factor-kappaB-RelA Activation Is Required for Proliferation and Survival of Hodgkin's Disease Tumor Cells', *The Journal of clinical investigation*, 100 (1997), 2961–2969
- [6] Van Besien, K., M. Kelta, and P. Bahaguna, 'Primary Mediastinal B-cell Lymphoma: a Review of Pathology and Management', *Journal of clinical oncology* □: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 19 (2001), 1855–1864
- [7] Bishop, P. C., W. H. Wilson, D. Pearson, J. Janik, E. S. Jaffe, and P. C. Elwood, 'CNS Involvement in Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma', *Journal of clinical oncology* □: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 17 (1999), 2479–2485

- [8] Brauninger, A., R. Schmitz, D. Bechtel, C. Renne, M. L. Hansmann, and R. Kuppers, 'Molecular Biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg Cells in Hodgkin's Lymphoma', *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 118 (2006), 1853–1861
- [9] Bray, S. J., 'Notch Signalling: a Simple Pathway Becomes Complex', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7 (2006), 678–689
- [10] Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, and others, 'A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling: The Role of the Disintegrin-metalloprotease TACE', *Molecular cell*, 5 (2000), 207–216
- [11] Bulman, M. P., K. Kusumi, T. M. Frayling, C. McKeown, C. Garrett, E. S. Lander, and others, 'Mutations in the Human Delta Homologue, DLL3, Cause Axial Skeletal Defects in Spondylocostal Dysostosis', *Nature genetics*, 24 (2000), 438–441
- [12] Campo, E., S. H. Swerdlow, N. L. Harris, S. Pileri, H. Stein, and E. S. Jaffe, 'The 2008 WHO Classification of Lymphoid Neoplasms and Beyond: Evolving Concepts and Practical Applications', *Blood*, 117 (2011), 5019–5032
- [13] Cell Signaling Technology, Inc, 'Notch Signaling', 2011  
<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Notch.html>
- [14] Cheng, P., A. Zlobin, V. Volgina, S. Gottipati, B. Osborne, E. J. Simel, and others, 'Notch-1 Regulates NF-kappaB Activity in Hemopoietic Progenitor Cells', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167 (2001), 4458–4467
- [15] Chiamonte, R., A. Basile, E. Tassi, E. Calzavara, V. Cecchinato, V. Rossi, and others, 'A Wide Role for NOTCH1 Signaling in Acute Leukemia', *Cancer letters*, 219 (2005), 113–120

- [16] Choi, W. W., D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, M. A. Piris, A. H. Banham, J. Delabie, and others, 'A New Immunostain Algorithm Classifies Diffuse Large B-cell Lymphoma into Molecular Subtypes with High Accuracy', *Clinical cancer research*: an official journal of the American Association for Cancer Research, 15 (2009), 5494–5502
- [17] Cordle, J., S. Johnson, J. Z. Tay, P. Roversi, M. B. Wilkin, B. H. de Madrid, and others, 'A Conserved Face of the Jagged/Serrate DSL Domain Is Involved in Notch Trans-activation and Cis-inhibition', *Nature structural & molecular biology*, 15 (2008), 849–857
- [18] Csernus, B., B. Timar, Z. Fulop, A. Bognar, A. Szepesi, T. Laszlo, and others, 'Mutational Analysis of IgVH and BCL-6 Genes Suggests Thymic B-cells Origin of Mediastinal (thymic) B-cell Lymphoma', *Leukemia & lymphoma*, 45 (2004), 2105–2110
- [19] Curry, C. L., L. L. Reed, B. J. Nickoloff, L. Miele, and K. E. Foreman, 'Notch-independent Regulation of Hes-1 Expression by c-Jun N-terminal Kinase Signaling in Human Endothelial Cells', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86 (2006), 842–852
- [20] Die manuelle mikroskopische Zellzählung, 'Die Manuelle Mikroskopische Zellzählung' <[http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Neubauer\\_improved\\_schema.gif](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Neubauer_improved_schema.gif)> [accessed 21 November 2011]
- [21] Diehl, V., H. Burcher, M. Schaadt, H. H. Kirchner, C. Fonatsch, H. Stein, and others, 'Hodgkin's Disease Cell Lines: Characteristics and Biological Activities', *Haematology and blood transfusion*, 28 (1983), 411–417
- [22] Dyer, MJ, P. Fischer, E. Nacheva, W. Labastide, and A. Karpas, 'A New Human B-cell non-Hodgkin's Lymphoma Cell Line (Karpas 422) Exhibiting Both t (14;18) and T(4;11) Chromosomal Translocations', *Blood*, 75 (1990), 709–714

- [23] Edbauer, D., E. Winkler, J. T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, and C. Haass, 'Reconstitution of Gamma-secretase Activity', *Nature cell biology*, 5 (2003), 486–488
- [24] Ellisen, L. W., J. Bird, D. C. West, A. L. Soreng, T. C. Reynolds, S. D. Smith, and others, 'TAN-1, the Human Homolog of the Drosophila Notch Gene, Is Broken by Chromosomal Translocations in T Lymphoblastic Neoplasms', *Cell*, 66 (1991), 649–661
- [25] Epstein, Alan L., and Henry S. Kaplan, 'Feeder Layer and Nutritional Requirements for the Establishment and Cloning of Human Malignant Lymphoma Cell Lines', *Cancer research*, 39 (1979), 1748–1759
- [26] Faris, J. E., and A. S. LaCasce, 'Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma', *Clinical advances in hematology & oncology*: H&O, 7 (2009), 125–133
- [27] Farrell, K., and R. F. Jarrett, 'The Molecular Pathogenesis of Hodgkin Lymphoma', *Histopathology*, 58 (2011), 15–25
- [28] Feuerhake, F., J. L. Kutok, S. Monti, W. Chen, A. S. LaCasce, G. Cattoretti, and others, 'NFkappaB Activity, Function, and Target-gene Signatures in Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma Subtypes', *Blood*, 106 (2005), 1392–1399
- [29] Gazave, E., P. Lapebie, G. S. Richards, F. Brunet, A. V. Ereskovsky, B. M. Degnan, and others, 'Origin and Evolution of the Notch Signalling Pathway: An Overview from Eukaryotic Genomes', *BMC evolutionary biology*, 9 (2009), 249
- [30] Haines, N., and K. D. Irvine, 'Glycosylation Regulates Notch Signalling', *Nature reviews.Molecular cell biology*, 4 (2003), 786–797
- [31] Hoefnagel, J. J., R. Dijkman, K. Basso, P. M. Jansen, C. Hallermann, R. Willemze, and others, 'Distinct Types of Primary Cutaneous Large B-cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling', *Blood*, 105 (2005), 3671–3678

[32] Houde, C., Y. Li, L. Song, K. Barton, Q. Zhang, J. Godwin, and others, 'Overexpression of the NOTCH Ligand JAG2 in Malignant Plasma Cells from Multiple Myeloma Patients and Cell Lines', *Blood*, 104 (2004), 3697–3704

[33] Hubmann, R., J. D. Schwarzmeier, M. Shehata, M. Hilgarth, M. Duechler, M. Dettke, and others, 'Notch2 Is Involved in the Overexpression of CD23 in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia', *Blood*, 99 (2002), 3742–3747

[34] Immunhistochemie Grafik, 'Immunhistochemie Grafik', Academic dictionaries and encyclopedias <<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/651177>> [accessed 21 September 2011]

[35] Immunhistochemie Grafik 2, 'Immunhistochemie Grafik 2' <[http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lse/products/equipment\\_supplies/product\\_overlay\\_content/global/lse\\_colorimetric\\_det\\_proteins.jpg](http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lse/products/equipment_supplies/product_overlay_content/global/lse_colorimetric_det_proteins.jpg)> [accessed 21 September 2011]

[36] Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori, 'HES and HERP Families: Multiple Effectors of the Notch Signaling Pathway', *Journal of cellular physiology*, 194 (2003), 237–255

[37] Jaffe, E. S., 'The 2008 WHO Classification of Lymphomas: Implications for Clinical Practice and Translational Research', *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program, 2009, 523–531

[38] Jaleco, A. C., H. Neves, E. Hooijberg, P. Gameiro, N. Clode, M. Haury, and others, 'Differential Effects of Notch Ligands Delta-1 and Jagged-1 in Human Lymphoid Differentiation', *The Journal of experimental medicine*, 194 (2001), 991–1002

[39] Jarriault, S., O. Le Bail, E. Hirsinger, O. Pourquie, F. Logeat, C. F. Strong, and others, 'Delta-1 Activation of Notch-1 Signaling Results in HES-1 Transactivation', *Molecular and cellular biology*, 18 (1998), 7423–7431

- [40] Johnson, P. W., and A. J. Davies, 'Primary Mediastinal B-cell Lymphoma', Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2008, 349–358
- [41] Joos, S., M. Granzow, H. Holtgreve-Grez, R. Siebert, L. Harder, J. I. Martin-Subero, and others, 'Hodgkin's Lymphoma Cell Lines Are Characterized by Frequent Aberrations on Chromosomes 2p and 9p Including REL and JAK2', International journal of cancer. Journal international du cancer, 103 (2003), 489–495
- [42] Joos, S., M. I. Otano-Joos, S. Ziegler, S. Bruderlein, S. du Manoir, M. Bentz, and others, 'Primary Mediastinal (thymic) B-cell Lymphoma Is Characterized by Gains of Chromosomal Material Including 9p and Amplification of the REL Gene', Blood, 87 (1996), 1571–1578
- [43] Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, and others, 'Notch3 Mutations in CADASIL, a Hereditary Adult-onset Condition Causing Stroke and Dementia', Nature, 383 (1996), 707–710
- [44] Jundt, F., I. Anagnostopoulos, R. Forster, S. Mathas, H. Stein, and B. Dörken, 'Activated Notch1 Signaling Promotes Tumor Cell Proliferation and Survival in Hodgkin and Anaplastic Large Cell Lymphoma', Blood, 99 (2002), 3398–3403
- [45] Jundt, Franziska, Rolf Schwarzer, and Bernd Dörken, 'Notch Signaling in Leukemias and Lymphomas', Current Molecular Medicine, 8 (2008), 51–59
- [46] Kamesaki, H., S. Fukuhara, E. Tatsumi, H. Uchino, H. Yamabe, H. Miwa, and others, 'Cytochemical, Immunologic, Chromosomal, and Molecular Genetic Analysis of a Novel Cell Line Derived from Hodgkin's Disease', Blood, 68 (1986), 285–292
- [47] Kanzler, H., ML Hansmann, U. Kapp, J. Wolf, V. Diehl, K. Rajewsky, and others, 'Molecular Single Cell Analysis Demonstrates the Derivation of a Peripheral Blood-derived Cell Line (L1236) from the Hodgkin/Reed- Sternberg Cells of a Hodgkin's Lymphoma Patient', Blood, 87 (1996), 3429–3436

- [48] Kapp, U., W. C. Yeh, B. Patterson, A. J. Elia, D. Kagi, A. Ho, and others, 'Interleukin 13 Is Secreted by and Stimulates the Growth of Hodgkin and Reed-Sternberg Cells', *The Journal of experimental medicine*, 189 (1999), 1939–1946
- [49] Kogoshi, H., T. Sato, T. Koyama, N. Nara, and S. Tohda, 'Gamma-secretase Inhibitors Suppress the Growth of Leukemia and Lymphoma Cells', *Oncology reports*, 18 (2007), 77–80
- [50] Kuppers, R., 'The Biology of Hodgkin's Lymphoma', *Nature reviews.Cancer*, 9 (2009), 15–27
- [51] Kuppers, R., K. Rajewsky, M. Zhao, G. Simons, R. Laumann, R. Fischer, and others, 'Hodgkin Disease: Hodgkin and Reed-Sternberg Cells Picked from Histological Sections Show Clonal Immunoglobulin Gene Rearrangements and Appear to Be Derived from B Cells at Various Stages of Development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (1994), 10962–10966
- [52] De La Coste, A., and A. A. Freitas, 'Notch Signaling: Distinct Ligands Induce Specific Signals During Lymphocyte Development and Maturation', *Immunology letters*, 102 (2006), 1–9
- [53] Lai, E. C., 'Notch Signaling: Control of Cell Communication and Cell Fate', *Development (Cambridge, England)*, 131 (2004), 965–973
- [54] Lamarre, L., J. O. Jacobson, A. C. Aisenberg, and N. L. Harris, 'Primary Large Cell Lymphoma of the Mediastinum. A Histologic and Immunophenotypic Study of 29 Cases', *The American Journal of Surgical Pathology*, 13 (1989), 730–739
- [55] Lee, S. Y., K. Kumano, K. Nakazaki, M. Sanada, A. Matsumoto, G. Yamamoto, and others, 'Gain-of-function Mutations and Copy Number Increases of Notch2 in Diffuse Large B-cell Lymphoma', *Cancer science*, 100 (2009), 920–926

- [56] Leong, K. G., and A. Karsan, 'Recent Insights into the Role of Notch Signaling in Tumorigenesis', *Blood*, 107 (2006), 2223–2233
- [57] Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah, and others, 'The Notch1 Receptor Is Cleaved Constitutively by a Furin-like Convertase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1998), 8108–8112
- [58] Ma, S. K., T. S. Wan, and L. C. Chan, 'Cytogenetics and Molecular Genetics of Childhood Leukemia', *Hematological oncology*, 17 (1999), 91–105
- [59] Melzner, I., A. J. Bucur, S. Bruderlein, K. Dorsch, C. Hasel, T. F. Barth, and others, 'Biallelic Mutation of SOCS-1 Impairs JAK2 Degradation and Sustains phospho-JAK2 Action in the MedB-1 Mediastinal Lymphoma Line', *Blood*, 105 (2005), 2535–2542
- [60] Miele, L., T. Golde, and B. Osborne, 'Notch Signaling in Cancer', *Current Molecular Medicine*, 6 (2006), 905–918
- [61] Milner, L. A., and A. Bigas, 'Notch as a Mediator of Cell Fate Determination in Hematopoiesis: Evidence and Speculation', *Blood*, 93 (1999), 2431–2448
- [62] Mohr, O. L., 'Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*', *Genetics*, 4 (1919), 275–282
- [63] Moller, P., S. Bruderlein, J. Strater, F. Leithauser, C. Hasel, F. Bataille, and others, 'MedB-1, a Human Tumor Cell Line Derived from a Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma', *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 92 (2001), 348–353
- [64] Mumm, J. S., and R. Kopan, 'Notch Signaling: From the Outside In', *Developmental biology*, 228 (2000), 151–165

- [65] Nacheva, E., M. J. Dyer, C. Metivier, D. Jadayel, G. Stranks, R. Morilla, and others, 'B-cell non-Hodgkin's Lymphoma Cell Line (Karpas 1106) with Complex Translocation Involving 18q21.3 but Lacking BCL2 Rearrangement and Expression', *Blood*, 84 (1994), 3422–3428
- [66] Neubauer Zählkammer, 'Neubauer Zählkammer' <[http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf\\_demo/Demo\\_D/Lab/count\\_manual.htm](http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_D/Lab/count_manual.htm)> [accessed 21 September 2011]
- [67] Nickoloff, B. J., J. Z. Qin, V. Chaturvedi, M. F. Denning, B. Bonish, and L. Miele, 'Jagged-1 Mediated Activation of Notch Signaling Induces Complete Maturation of Human Keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma', *Cell death and differentiation*, 9 (2002), 842–855
- [68] Oda, T., A. G. Elkahloun, B. L. Pike, K. Okajima, I. D. Krantz, A. Genin, and others, 'Mutations in the Human Jagged1 Gene Are Responsible for Alagille Syndrome', *Nature genetics*, 16 (1997), 235–242
- [69] Okajima, T., A. Xu, L. Lei, and K. D. Irvine, 'Chaperone Activity of Protein O-fucosyltransferase 1 Promotes Notch Receptor Folding', *Science (New York, N.Y.)*, 307 (2005), 1599–1603
- [70] Parks, A. L., K. M. Klueg, J. R. Stout, and M. A. Muskavitch, 'Ligand Endocytosis Drives Receptor Dissociation and Activation in the Notch Pathway', *Development (Cambridge, England)*, 127 (2000), 1373–1385
- [71] Parks, A. L., J. R. Stout, S. B. Shepard, K. M. Klueg, A. A. Dos Santos, T. R. Parody, and others, 'Structure-function Analysis of Delta Trafficking, Receptor Binding and Signaling in *Drosophila*', *Genetics*, 174 (2006), 1947–1961
- [72] Paulli, M., J. Strater, U. Gianelli, M. T. Rousset, M. Gambacorta, E. Orlandi, and others, 'Mediastinal B-cell Lymphoma: a Study of Its Histomorphologic Spectrum Based on 109 Cases', *Human pathology*, 30 (1999), 178–187

- [73] Pileri, S. A., G. Gaidano, P. L. Zinzani, B. Falini, P. Gaulard, E. Zucca, and others, 'Primary Mediastinal B-cell Lymphoma: High Frequency of BCL-6 Mutations and Consistent Expression of the Transcription Factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the Absence of Immunoglobulins', *The American journal of pathology*, 162 (2003), 243–253
- [74] Pintar, A., A. De Biasio, M. Popovic, N. Ivanova, and S. Pongor, 'The Intracellular Region of Notch Ligands: Does the Tail Make the Difference?', *Biology direct*, 2 (2007), 19
- [75] Primer3 Input (version 0.4.0), 'Primer3 Input (version 0.4.0)' <<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>> [accessed 20 July 2011]
- [76] Radtke, F., F. Schweisguth, and W. Pear, 'The Notch "Gospel"', *EMBO reports*, 6 (2005), 1120–1125
- [77] Radtke, Freddy, Nicolas Fasnacht, and H. Robson MacDonald, 'Notch Signaling in the Immune System', *Immunity*, 32 (2010), 14–27
- [78] Rangarajan, A., C. Talora, R. Okuyama, M. Nicolas, C. Mammucari, H. Oh, and others, 'Notch Signaling Is a Direct Determinant of Keratinocyte Growth Arrest and Entry into Differentiation', *The EMBO journal*, 20 (2001), 3427–3436
- [79] Robey, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, and others, 'An Activated Form of Notch Influences the Choice Between CD4 and CD8 T Cell Lineages', *Cell*, 87 (1996), 483–492
- [80] Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner, 'Amino Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins: The PEST Hypothesis', *Science (New York, N.Y.)*, 234 (1986), 364–368
- [81] Ronchini, C., and A. J. Capobianco, 'Induction of Cyclin D1 Transcription and CDK2 Activity by Notch(ic): Implication for Cell Cycle Disruption in Transformation by Notch(ic)', *Molecular and cellular biology*, 21 (2001), 5925–5934

- [82] Rosenwald, A., G. Wright, W. C. Chan, J. M. Connors, E. Campo, R. I. Fisher, and others, 'The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse large-B-cell Lymphoma', *The New England journal of medicine*, 346 (2002), 1937–1947
- [83] Rosenwald, A., G. Wright, K. Leroy, X. Yu, P. Gaulard, R. D. Gascoyne, and others, 'Molecular Diagnosis of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma Identifies a Clinically Favorable Subgroup of Diffuse Large B Cell Lymphoma Related to Hodgkin Lymphoma', *The Journal of experimental medicine*, 198 (2003), 851–862
- [84] Savage, K. J., 'Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma', *The oncologist*, 11 (2006), 488–495
- [85] Schaadt, M., C. Fonatsch, H. Kirchner, and V. Diehl, 'Establishment of a Malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative Cell-line from the Pleura Effusion of a Patient with Hodgkin's Disease', *Blut*, 38 (1979), 185–190
- [86] Schwarzer, R, and F Jundt, 'Notch and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in the Biology of Classical Hodgkin Lymphoma', *Current molecular medicine*, 11 (2011), 236–245
- [87] Schwering, I., A. Brauninger, U. Klein, B. Jungnickel, M. Tinguely, V. Diehl, and others, 'Loss of the B-lineage-specific Gene Expression Program in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Hodgkin Lymphoma', *Blood*, 101 (2003), 1505–1512
- [88] Shi, S., and P. Stanley, 'Protein O-fucosyltransferase 1 Is an Essential Component of Notch Signaling Pathways', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003), 5234–5239
- [89] Shin, H. M., L. M. Minter, O. H. Cho, S. Gottipati, A. H. Fauq, T. E. Golde, and others, 'Notch1 Augments NF-kappaB Activity by Facilitating Its Nuclear Retention', *The EMBO journal*, 25 (2006), 129–138

- [90] Signaling Pathways: Notch Signaling, 'Signaling Pathways: Notch Signaling' <<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Notch.html>> [accessed 20 July 2011]
- [91] Simpson, P., 'Introduction: Notch Signalling and Choice of Cell Fates in Development', *Seminars in cell & developmental biology*, 9 (1998), 581–582
- [92] Steidl, C., and R. D. Gascoyne, 'The Molecular Pathogenesis of Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma', *Blood*, 118 (2011), 2659–2669
- [93] Swerdlow, S. H., E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, and others, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Fourth Edition (Lyon, France: IARC, 2008), 4.
- [94] Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa, and others, 'Physical Interaction Between a Novel Domain of the Receptor Notch and the Transcription Factor RBP-J kappa/Su(H)', *Current biology*: CB, 5 (1995), 1416–1423
- [95] Tohda, Shuji, and Nobuo Nara, 'Expression of Notch1 and Jagged1 Proteins in Acute Myeloid Leukemia Cells', *Leukemia & lymphoma*, 42 (2001), 467
- [96] Traverse-Glehen, A., S. Pittaluga, P. Gaulard, L. Sorbara, M. A. Alonso, M. Raffeld, and others, 'Mediastinal Gray Zone Lymphoma: The Missing Link Between Classic Hodgkin's Lymphoma and Mediastinal Large B-cell Lymphoma', *The American Journal of Surgical Pathology*, 29 (2005), 1411–1421
- [97] Vardar, D., C. L. North, C. Sanchez-Irizarry, J. C. Aster, and S. C. Blacklow, 'Nuclear Magnetic Resonance Structure of a Prototype Lin12-Notch Repeat Module from Human Notch1', *Biochemistry*, 42 (2003), 7061–7067
- [98] Weijzen, S., P. Rizzo, M. Braid, R. Vaishnav, S. M. Jonkheer, A. Zlobin, and others, 'Activation of Notch-1 Signaling Maintains the Neoplastic Phenotype in Human Ras-transformed Cells', *Nature medicine*, 8 (2002), 979–986

- [99] Weng, Andrew P., Adolfo A. Ferrando, Woojoong Lee, John P. Morris, Lewis B. Silverman, Cheryll Sanchez-Irizarry, and others, 'Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia', *Science*, 306 (2004), 269–271
- [100] Weniger, M. A., I. Melzner, C. K. Menz, S. Wegener, A. J. Bucur, K. Dorsch, and others, 'Mutations of the Tumor Suppressor Gene SOCS-1 in Classical Hodgkin Lymphoma Are Frequent and Associated with Nuclear phospho-STAT5 Accumulation', *Oncogene*, 25 (2006), 2679–2684
- [101] Western Blot Grafik, 'Western Blot Grafik' <<http://www.uni-kiel.de/immunologie/ag/janssen/praktikum3.html>> [accessed 21 September 2011]
- [102] Wu, L., and J. D. Griffin, 'Modulation of Notch Signaling by Mastermind-like (MAML) Transcriptional Co-activators and Their Involvement in Tumorigenesis', *Seminars in cancer biology*, 14 (2004), 348–356
- [103] Yoon, S. O., X. Zhang, P. Berner, B. Blom, and Y. S. Choi, 'Notch Ligands Expressed by Follicular Dendritic Cells Protect Germinal Center B Cells from Apoptosis', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183 (2009), 352–358
- [104] Zecchini, V., K. Brennan, and A. Martinez-Arias, 'An Activity of Notch Regulates JNK Signalling and Affects Dorsal Closure in *Drosophila*', *Current biology* □: CB, 9 (1999), 460–469
- [105] Zhang, Z., P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein, and others, 'Presenilins Are Required for Gamma-secretase Cleavage of beta-APP and Transmembrane Cleavage of Notch-1', *Nature cell biology*, 2 (2000), 463–465
- [106] Zweidler-McKay, P. A., Y. He, L. Xu, C. G. Rodriguez, F. G. Karnell, A. C. Carpenter, and others, 'Notch Signaling Is a Potent Inducer of Growth Arrest and Apoptosis in a Wide Range of B-cell Malignancies', *Blood*, 106 (2005), 3898–3906

## **Danksagungen**

Der erste Dank gilt Prof. Dr. Peter Möller für die Möglichkeit der Erstellung einer Dissertationsarbeit in der Pathologie.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Olga Ritz für die hervorragende Betreuung, insbesondere für ihre tatkräftige Unterstützung, ihre Geduld sowie für ihre fürsorgliche Begleitung.

Großen Dank für die geduldige Einführung in die Laborarbeit und für die große Hilfe bei den Experimenten gebührt Frau Karola Dorsch.

Auch bedanke ich mich bei Julia Kidaisch, Iwona Nerbas und allen anderen Mitarbeitern in der Pathologie, die mich während meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Vielen Dank an Bavaria Blue für die unentbehrliche und hoch geschätzte Kurzweil.

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, sowie Kathrin die während meiner gesamten Studienzeit stets zur Seite standen und mir Kraft gaben.