

Expression und Regulation von Chemokinen und
Chemokinrezeptoren in Hodgkin Lymphom- und Burkitt
Lymphomzelllinien

Expression und Regulation von
Chemokinen und Chemokinrezeptoren in
Hodgkin Lymphom- und Burkitt
Lymphomzelllinien

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES (DR. RER. NAT.).

Von Astrid K. Michels aus Köln an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn vorgelegt.
Köln, Dezember 2002

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 1999 bis Dezember 2002 im Institut für Virologie der Universität zu Köln unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Pfister angefertigt.

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. H. Pfister

2. Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann

Tag der Promotion: 14.02.2003

Diese Dissertation ist elektronisch veröffentlicht und unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/90/ulb_bonn/diss_online/math_nat_fak/2003/michels_astrid archiviert.

Die in dieser Arbeit erwähnten Materialien und Gerätesysteme sind zum Teil eingetragene Warenzeichen und unterliegen als solche den gesetzlichen Bestimmungen.

Diese Arbeit wurde mit pdfL^AT_EX unter Verwendung der jkthesis Dokumentklasse aus der Palatino gesetzt.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Verwendete Symbole und Abkürzungen	XI
1 Einleitung	1
1.1 Hodgkin Lymphom	1
1.2 Zytokine und Chemokine	5
1.3 CD40	12
1.4 Transkriptionsfaktoren	14
1.5 Das Epstein-Barr-Virus	16
1.6 Ziele der Arbeit	18
2 Material	21
2.1 Eukaryontische Zelllinien	21
2.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur	22
2.3 Primäres Hodgkin Lymphomgewebe	23
2.4 Puffer und Lösungen	23
2.5 Gele	26
2.6 Nukleotide	26
2.7 Chemokine	27
2.8 Antikörper	27
2.9 Inhibitoren	30
2.10 <i>Multi-Probe Template Sets</i> für den <i>RNase protection assay</i>	30
2.11 Reagenziensysteme	30
2.12 Sonstige Materialien	31

3	Methoden	33
3.1	Zellbiologische Methoden	33
3.2	Molekularbiologische Methoden	36
3.3	Immunologische Methoden	46
4	Ergebnisse	51
4.1	Expression von Chemokinrezeptoren und Chemokinen	51
4.2	Einfluss der CD40L/CD40 Wechselwirkung	61
4.3	Inhibitoreinfluss auf die CCR7 Expression in L428-Zellen	70
4.4	CD40 Spleißvarianten	72
5	Diskussion	77
5.1	Konstitutive Expression von CCR7 und CXCR4 in HL Zelllinien	77
5.2	Andere Chemokinrezeptoren	79
5.3	Konstitutive Expression von Chemokinen in HL Zelllinien	80
5.4	SLC und CCR7 Expression in primären H/RS Zellen	82
5.5	Aktivierung von NF- κ B und AP-1 in BL-2-Zellen	83
5.6	Induktion der IP-10 und RANTES Produktion	86
5.7	Inhibition der induzierten IP-10 Produktion	87
5.8	IRF Expression in Lymphomzelllinien	87
5.9	Hinweise auf CD40 Spleißvarianten	88
6	Zusammenfassung	91
	Literaturverzeichnis	93
A	Danksagung	113

Tabellenverzeichnis

1.1	Expression von Chemokinen in HL Zelllinien und primären H/RS Zellen.	13
2.1	Oligonukleotide für den EMSA.	26
2.2	Primer für die PCR	27
2.3	Verwendete Chemokine	27
2.4	Verwendete Primärantikörper	28
2.5	Verwendete Negativkontrollseren	29
2.6	Verwendete Sekundärantikörper	29
3.1	Bedingungen bei der Fixierung adhärenter BHK Zellen	35
4.1	Chemotaktische Reaktion von L428-Zellen auf unterschiedliche Chemokine.	53
4.2	Übersicht der Ergebnisse von der IHC-Färbung von HL Gefrierschnitten.	56
4.3	Ergebnisse der Chemokin-ELISAs mit HL und BL Zellüberständen.	59

Abbildungsverzeichnis

4.1	<i>RNase protection assay</i> für Chemokinrezeptoren von Hodgkin und Burkitt Lymphomzelllinien.	52
4.2	Oberflächenexpression von CCR7 und CCR4 auf HL und BL Zellen	54
4.3	Migrationsraten der HL und BL Zellen.	55
4.4	Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen von Gefrierschnitten aus primären HL Geweben. . .	59
4.5	<i>RNase protection assay</i> für Chemokine von HL und BL Zelllinien.	60
4.6	IP-10 und RANTES Nachweis in HL und BL Zellüberständen.	61
4.7	IP-10 und RANTES Konzentrationen in HL und BL Zellüberständen nach Stimulation mit CD40L.	62
4.8	IP-10 und RANTES Konzentrationen in EBV-positiven BL Zellen.	64
4.9	Inhibition der CD40 vermittelten IP-10 und RANTES Induktion in BL-2 Zellen.	65
4.10	Expression der Transkriptionsfaktoren IRF-1, IRF-3 und IRF-7.	66
4.11	Einfluss der CD40 Stimulation auf die Expression von IRF-7 in BL-2-Zellen.	67
4.12	AP-1 - EMSA der Zelllinien L428, L1236 und BL-2 nach CD40 Stimulation.	68
4.13	NF- κ B- EMSA der Zelllinien L428, L1236 und BL-2 nach CD40 Stimulation.	69
4.14	Oberflächenexpression von ICAM-1 und CCR7 auf BL-2-Zellen nach CD40 Stimulation.	70
4.15	Oberflächenexpression von CCR7 auf der Zelllinie L428 nach Inhibition mit Kinaseinhibitoren.	71
4.16	<i>RNase protection assay</i> für CCR7 von L428-Zellen nach Inhibition mit Kinaseinhibitoren.	71
4.17	CD40 spezifische PCR und <i>Southern Blot</i> der L428-Zellen.	72
4.18	Ergebnisse der β -Aktin-PCR.	73

4.19	CD40 spezifischer <i>Southern Blot</i> der Zelllinien L428, L1236, BL-2 und BL-30.	74
------	--	----

Verwendete Symbole und Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonsäure)
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AGE	Agarosegelelektrophorese
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>B cell-attracting chemokine</i>
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BHK-CD40L	BHK Zellen, die den humanen CD40 Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren
BL	Burkitt Lymphom
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40 Ligand
CHL	klassisches Hodgkin Lymphom
Ci	Curie
CSF	koloniestimulierender Faktor
CTAR	C-terminale Aktivierungsregion
DBD	DNA Binde-Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EBER	<i>EBV-encoded RNA</i>
EBNA	Epstein-Barr-Virus spezifisches nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraazetat
ELC	<i>Epstein-Barr-virus-induced sDNA1-ligand chemokine</i>
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
ELR	Glutaminsäure-Leucin-Arginin
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GKF	Gewebekulturflasche
h	Stunde
H	Hodgkin
HCC	<i>hemofiltrate CC chemokine</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEV	<i>high endothelial venule</i>
HL	Hodgkin Lymphom
I κ B	inhibierendes Molekül κ B
ICS	<i>interferon consensus sequence</i>
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IP-10	<i>interferon-γ-inducible protein 10</i>
IRF	Interferon regulierender Faktor
IRF-E	<i>interferon regulatory factor element</i>
ISH	In Situ Hybridisierung
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
kDa	Kilodalton
LARC	<i>liver- and activation-regulated chemokine</i>
LDHL	lymphozytenarmes Hodgkin Lymphom
LMP	latentes Membran-Protein
LRCHL	lymphozytenreiches klassisches Hodgkin Lymphom
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCHL	gemischtzelliges Hodgkin Lymphom
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MDC	<i>monocyte-derived chemokine</i>
Mig	<i>monocyte induced by interferon-γ</i>
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MPIF	<i>myeloid progenitor inhibitory factor</i>
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK	natürliche Killerzelle
NLPHL	nodulär Lymphozyten-prädominantes Hodgkin Lymphom
NSHL	nodulär-sklerosierendes Hodgkin Lymphom

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARC	<i>pulmonary- and activation-regulated chemokine</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	<i>ribonuclease protection assay</i>
RS	Reed-Sternberg
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SDF-1	<i>stromal derived factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	<i>secondary-lymphoid-tissue-derived chemokine</i>
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat
TARC	<i>thymus and activation regulated chemokine</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris/EDTA
TECK	<i>thymus-expressed chemokine</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEN	Tris/EDTA/Natriumchlorid
TEN	Tris/EDTA/NaCl
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TRAF	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor
wt	Wildtyp

Einleitung

1.1 Hodgkin Lymphom

Das Hodgkin Lymphom (HL) ist ein maligner Tumor des lymphatischen Gewebes. Das HL unterscheidet sich von anderen malignen Lymphomen durch seine einzigartige zelluläre Zusammensetzung. Eine Minderheit von neoplastischen Zellen, die sogenannten Reed-Sternberg (RS) Zellen und deren Varianten, ist eingebettet in einem Infiltrat aus inflammatorischen Zellen. Die Diagnostik des HL basiert auf der Identifizierung dieser charakteristischen RS Zellen, die als vielkernige Riesenzellen im reaktiven Infiltrat erkennbar sind. Die Tumorphopulation umfasst ebenfalls eine variable Anzahl der einkernigen Variante, der Hodgkin (H) Zellen. Das Infiltrat, das bis zu 99 % des Tumorgewebes ausmachen kann, besteht aus Lymphozyten, Histiozyten, Neutrophilen, Eosinophilen, Plasmazellen und Fibroblasten in quantitativ unterschiedlicher Zusammensetzung. Das HL wird in zwei unterschiedliche Formen eingeteilt, in das klassische HL (CHL) und in das nodulär Lymphozyten-prädominante HL (NLPHL) [56, 57, 82]. Je nach Morphologie und Immunphänotyp der H/RS Zellen und der Zusammensetzung des zellulären Infiltrates wird das CHL weiter in verschiedene histologische Varianten unterteilt [55].

1.1.1 KLASSISCHES HODGKIN LYMPHOM

Das CHL umfasst das nodulär-sklerosierende HL (NSHL), das gemischtzellige HL (MCHL), das lymphozytenarme HL (LDHL) und das lymphozytenreiche klassische HL (LRCHL) [82].

Nodulär-sklerosierendes Hodgkin Lymphom — Das NSHL ist mit 60–80 % der in entwickelten Ländern am häufigsten anzutreffende Subtyp des HL.

MORPHOLOGIE — Dieser Subtyp ist durch die folgenden Eigenschaften charakterisiert: bindegewebeartige Verhärtung des Lymphknoten (Sklerose),

noduläres Muster und Lacunarzellen. Die Sklerose führt zu breiten Kollagenbändern, die den Lymphknoten in große Noduli unterteilen [137]. Die neoplastischen Zellen im NSHL sind Lacunarzellen. Dies sind große Zellen mit ein- oder mehrlappigen Kernen, in der Größe variierenden Nukleoli und hellem Zytoplasma. Eine Formalin-Fixierung führt zur Kondensation des perinuklearen Zytoplasmas, das mit der Zellmembran durch schmale Filamente verbunden scheint und so leere „lacunare“ zytoplasmatische Zwischenräume bildet [137]. Das Infiltrat besteht für gewöhnlich aus Lymphozyten, Histiocyten, Plasmazellen, Eosinophilen und Neutrophilen.

Gemischtzelliges Hodgkin Lymphom — Circa 15–30 % der HL sind vom MCHL Typ.

MORPHOLOGIE — Das Infiltrat beim MCHL ist normalerweise diffus nodulär ohne Banden-bildende Sklerose. Die H/RS Zellen sind vom klassischen Typ. Es sind große Zellen mit zweilappigen, doppelten oder mehreren Zellkernen, mit großen, eosinophilen Nukleoli. Die Bezeichnung MCHL reflektiert die zelluläre Zusammensetzung des reaktiven Infiltrates, welches typischerweise Histiocyten, Eosinophile, Plasmazellen und T-Lymphozyten enthält. Letztere bilden Rosetten um die neoplastischen Elemente [137].

Lymphozytenarmes Hodgkin Lymphom — LDHL ist mit weniger als 1 % der Fälle die seltenste Form des HL. Es zeigt den schlechtesten klinischen Verlauf und die ungünstigste Prognose [137].

MORPHOLOGIE — Beim LDHL ist das Infiltrat diffus und wirkt durch Fibrose und Nekrose oft hypozellular. Es gibt eine große Anzahl an H/RS Zellen mit wenigen anderen inflammatorischen Zellen [55].

Lymphozytenreiches klassisches Hodgkin Lymphom — Nur 6 % der HL sind LRCHL.

MORPHOLOGIE — In einigen HL Fällen, die H/RS Zellen vom klassischen Typ aufzeigen, liegt ein Infiltrat vor, das vorwiegend aus Lymphozyten besteht und kaum Eosinophile enthält, das LRCHL. In den nodulären Gebieten sind die Lymphozyten überwiegend B-Lymphozyten [55].

Immunphänotyp des klassischen Hodgkin Lymphoms — Der Immunphänotyp lässt sich durch charakteristische Differenzierungsantigene (CD, *cluster of differentiation*) auf der Zelloberfläche definieren. Die H/RS Zellen exprimieren unter anderem CD15 und CD30. Beides sind diagnostischen Marker für das CHL. Moleküle, die mit der B-Zell Aktivierung und der T-Zell Interaktion assoziiert werden, sind CD40, CD80 und CD86 [53,55,118,128]. CD95 ist ein Apoptose-induzierender Rezeptor, der durch den Liganden CD95L gebunden wird [45,126]. In den beiden Subtypen MCHL und NSHL sind die Mehrheit der Lymphozyten im Infiltrat CD4+ T-Helfer-Zellen. Die unmittelbar die H/RS Zellen umgebenden T-Lymphozyten sind aktivierte Gedächtnis-T-Helfer-Zellen vom Th2-Subtyp. Sie exprimieren sowohl CD40 Ligand (CD40L), CD28 und CTLA-4, die Liganden für CD40, CD80 bzw. CD86 als auch den Rezeptor CD95. Es wurde spekuliert, dass die H/RS Zellen aufgrund der aufgeführten Rezeptoren und Liganden einerseits als antigenpräsentierende Zellen fungieren, andererseits in den umgebenden Lymphozyten Apoptose auslösen können. Jedoch scheint keine effektive Immunantwort induziert zu werden [138].

1.1.2 NODULÄR LYMPHOZYTEN-PRÄDOMINANTES HODGKIN LYMPHOM

Das nodulär Lymphozyten-prädominante HL liegt in 4–5 % der HL vor. Es unterscheidet sich sehr in Bezug auf Morphologie, Phänotyp, Genotyp und das klinische Verhalten vom CHL. Das einzige Merkmal, welches sich NLPHL und CHL teilen, ist die geringe Anzahl an neoplastischen Zellen [137].

MORPHOLOGIE — NLPHL besitzt zumindest teilweise ein noduläres Wachstumsmuster. Die Noduli sind veränderte Follikel oder Keimzentren. Die Tumorzellen unterscheiden sich von den „klassischen“ H/RS Zellen: Sie haben vesikuläre, mehrlappige Zellkerne und ausgeprägte, aber kleine, gewöhnlich periphere Nukleoli. Diese Zellen werden aufgrund ihrer Erscheinungsform *Popcorn* Zellen genannt. Das reaktive Infiltrat besteht vorwiegend aus polyklonalen B-Lymphozyten und zahlreichen T-Lymphozyten [55]. Die T-Lymphozyten bilden kleine Aggregate, die dem Follikel häufig eine aufgebrochene, unregelmäßige Kontur geben. Typischerweise umgeben sie die neoplastischen Zellen und bilden dabei Rosetten. Im Gegensatz zum CHL exprimieren die T-Lymphozyten keinen CD40L, so dass eine CD40/CD40L Interaktion hier auszuschließen ist [32].

IMMUNPHÄNOTYP — Der Immunphänotyp spielt eine wichtige Rolle bei der Definition und Diagnose des NLPHL. Die *Popcorn* Zellen exprimieren das Leukozytenantigen CD45, B-Zell-assoziierte Antigene (CD19, CD20, CD22, CD40 und CD79a), nicht aber CD30 und CD15. Zusätzlich kommt es in über 90 % der Fälle zur Expression von der J-Kette sowie dem epithelialen Membranantigen [48, 55]. Die meisten der *Popcorn* Zellen befinden sich im Zellzyklus [137].

1.1.3 ZELLULÄRE ABSTAMMUNG DER NEOPLASTISCHEN ZELLEN

Die H/RS Zellen des CHL stammen zu 95–98 % von Keimzentrums-B-Zellen ab, in den restlichen 2–5 % der Fälle liegt eine T-Zell-Natur vor [23, 48, 90, 97, 110, 111, 155, 160]. Sie sind monoklonalen Ursprungs, das heißt, dass sich das Lymphom aus einer einzelnen transformierten Zelle gebildet hat und sich durch klonales Wachstum vergrößert. Das transformierende Ereignis verändert dabei die Morphologie und den Immunphänotyp der Ursprungszelle komplett: Es kommt zum Verlust von CD20, CD10, dem nukleären Transkriptionsrepressor BCL-6 und IgM und gleichzeitig zum Auftreten von CD15 und CD30 [160].

Durch Immunglobulin (Ig) Gen-Umlagerungen konnten B-Lymphozyten als Ursprung der H/RS Zellen identifiziert werden. Im Gegensatz zu B-Lymphozyten werden jedoch in den H/RS Zellen keine Ig exprimiert. Man hielt sogenannte „verkrüppelnde“ (*crippling*) Mutationen für die Ursachen: Somatische Mutationen innerhalb einer ursprünglich funktionellen, variablen-Region des Ig Gens haben zu Stoppkodons geführt. Dadurch verlieren Zellen die Fähigkeit, funktionelle Antikörper zu bilden [96]. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass 75 % der CHL keine „verkrüppelnden“ Mutationen aufweisen. Diese sind daher nicht für die Abwesenheit der Ig RNA und Proteine verantwortlich. Es werden eher Defekte in der Transkriptionsmaschinerie vermutet [111]. Die Unfähigkeit von Keimzentrums-B-Zellen, Ig Moleküle zu bilden, führt normalerweise schnell zur Apoptose dieser Zellen. Für den Schutz der H/RS Zellen vor Apoptose wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B verantwortlich gemacht, der in den Zellen konstitutiv aktiv ist [14, 15].

In den *Popcorn* Zellen beim NLPHL wurden ebenfalls monoklonale Ig Gen-Umlagerungen und eine hohe Anzahl an somatischen Mutationen innerhalb der variablen Genregion beobachtet. Die Tumorzellen exprimieren jedoch sowohl auf transkriptioneller als auch auf Protein Ebene Ig [111]. Sie re-

präsentieren eine monoklonale Population, die zu 100 % von Keimzentrums-B-Zellen abstammen [48, 96, 110, 137]. In der Hälfte der NLPHL Fälle wurden noch ablaufende (*ongoing*) Mutationen entdeckt. Diese Entdeckung identifiziert mutierende Keimzentrums-B-Zellen als Vorläufer der neoplastischen Zellen [96, 110, 137]. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass sie von transformierten Zentroblasten abstammen, da die noch ablaufenden Mutationen in einer Keimzentrums-ähnlichen Umgebung stattfinden [32].

1.2 Zytokine und Chemokine

Zytokine sind hormonähnliche regulatorische Moleküle, die durch Lymphozyten und viele andere Zellarten in unterschiedlichen Organen sezerniert werden. Als Zytokine, die eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und im Immunsystem spielen, gelten im allgemeinen Interleukine (IL), Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (CSF), transformierende Wachstumsfaktoren (TGF) und andere Wachstumsfaktoren [72]. Ihre Vielfalt an regulatorischen Funktionen beinhaltet unter anderem die Kontrolle von zellulärer und humoraler Immunantwort, Entzündung, Chemotaxis, Tumorregression, Apoptose, Hämatopoese, Fieber und Akute-Phase Reaktion [8, 54, 157, 171]. Zytokine können abhängig von der Ausprägung entsprechender Rezeptoren und Signalfaktoren auf Zellen unterschiedlicher Herkunft wirken [8].

Im Hinblick auf die potenten und tief gehenden biologischen Effekte der Zytokine ist es nicht erstaunlich, dass ihre Aktivitäten streng reguliert werden. Unter normalen Bedingungen ist die Zytokinproduktion durch Immunzellen ausbalanciert: Zytokine werden von der Zelle nur dann produziert, wenn sie benötigt werden [4, 20, 40, 171]. Diese wirken typischerweise parakrin, um die Aktivität umgebender Zellen zu modulieren, oder in einer autokrinen Art, um die Zelle, die sie produziert, zu beeinflussen. Es könnte sein, dass in Lymphomzellen solche eng kontrollierten regulatorischen Mechanismen defekt sind und somit gewisse Zytokine kontinuierlich sezerniert werden. Die Sekretion dieser Zytokine könnte einen Wachstumsvorteil für Tumorzellen durch einen autokrinen Mechanismus bewirken [114]. Beim CHL werden die durch die H/RS Zellen produzierten Zytokine für die Pathogenese der Krankheit mit verantwortlich gemacht. Sie dienen als autokrine Wachstumsfaktoren und unterstützen die Initiation und Aufrechterhaltung des Infiltrates [157].

Es ist bereits seit langem bekannt, dass Zytokine beim HL eine Rolle spielen. H/RS Zellen zeigen sowohl in Kultur als auch in Geweben eine veränder-

liche Expression der Zytokine IL-1, -2, -4 bis -7, -9, -10, -13, -17, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), IFN- γ , *basic Fibroblast growth factor* (ein potenter Stimulator für Fibroblasten), Granulozyten-CSF (G-CSF), Makrophagen-CSF (M-CSF), und TGF- β [18, 25, 42, 44, 46, 47, 64, 70–76, 85, 86, 88, 92, 107, 113, 114, 124, 129, 133, 138, 145, 151, 157, 165, 173]. Diese Zytokine und die sekundären Zytokine, welche durch die reaktiven Zellen sezerniert werden, sind wahrscheinlich für die unterschiedlichen histopathologischen und klinischen Änderungen, die bei Patienten mit HL auftreten, verantwortlich. IL-6 und IL-13 sind hierbei in einigen Fällen autokrine Wachstumsfaktoren [85, 157], während die anderen Zytokine meist als parakrine Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren fungieren [25, 46, 70, 71, 73, 75, 76, 85, 88, 114, 124, 133, 145, 151].

Zelluläre Reaktion — Die gesteigerte T-Zell Reaktion im HL wird teilweise auf die Sekretion von IL-1, IL-6, IL-9 und TNF- α durch H/RS Zellen, vielleicht auf die Ausschüttung von IL-2, IL-4, IL-9 und anderen Zytokinen durch reaktive T-Lymphozyten und von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α durch Histiozyten zurückgeführt [25, 46, 70, 71, 73, 75, 76, 85, 88, 114, 124, 133, 145, 151]. Der Grund für die histiozytische Reaktion kann sich aus sehr unterschiedlichen Mechanismen ergeben haben. Möglicherweise spielen M-CSF, IFN- γ und TGF- β dabei eine Rolle. Diese Zytokine ziehen Monozyten und Makrophagen an und aktivieren Histiozyten [121, 141, 143]. Für die Anwesenheit der Eosinophilen ist höchstwahrscheinlich IL-5, ein essentielles Zytokin für Wachstum und Differenzierung von Eosinophilen, verantwortlich [151]. Auch das Chemokin IL-8 ist in der Lage, eosinophile Zellen anzuziehen [16, 17, 26].

Die Zytokine IL-1, IL-6, TNF- α und TGF- β so wie Arachidonsäure Metabolite aus H/RS oder den reaktiven Zellen können sowohl die Fibroblasten Proliferation als auch die Synthese von Kollagen und extrazellulärer Matrix stimulieren. Diese Substanzen können für die Sklerose, die in den involvierten Lymphknoten stattfindet, verantwortlich sein [135, 136, 140, 142].

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass insbesondere Chemokine beim HL wesentlich für die Anziehung reaktiver Zellen verantwortlich sind.

1.2.1 KLASSIFIZIERUNG DER CHEMOKINE

Die Chemokine sind chemotaktisch aktive Zytokine, die rezeptorvermittelt die normale Leukozytenmigration steuern [36], aber auch die Leukozytenentwicklung, Hämatopoese, Angiogenese, Tumorstadium und Metastasier-

rung beeinflussen [78, 93, 144, 170]. Sie bilden die größte Unterfamilie der Zytokine. Chemokine sind hoch basische Proteine aus 70 bis 125 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 6 bis 14 kDa [93, 132]. Sie enthalten vier konservierte Cysteinemotive in ihrer Aminosäuresequenz, die essentielle Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten und dem zweiten und vierten Cystein bilden. Anzahl und Abstand der ersten Cysteine werden dazu benutzt, die Chemokine in vier Unterfamilien zu unterteilen: CC, CXC, CX₃C und C Chemokine [78, 119, 144]. Folgen die ersten beiden Cysteine unmittelbar aufeinander, so gehören sie der CC Familie an, die aus den Chemokinen CCL1–27 besteht. Die CXC Familie hat eine einzelne Aminosäure zwischen den beiden initialen Cysteinen und beinhaltet die Chemokine CXCL1–15. In der CX₃C Familie werden die initialen Cysteine durch drei Aminosäuren voneinander getrennt. Fraktalkin/CX₃CL1 ist das bisher einzig bekannte Mitglied dieser Familie. Ebenso beschränkt sich die C Familie auf ein Mitglied, das Lymphotactin- α und - β , zwei Isoformen. Diese Familie hat nur zwei Cysteine, welche dem Zweiten und Vierten der anderen Familien entsprechen [119].

Die Chemokine haben im Allgemeinen keine transmembranen Domänen und werden sezerniert. Eine Ausnahme bildet das Fraktalkin, das sowohl in einer membranständigen als auch in einer löslichen Form vorkommt [79]. Chemokine vermitteln ihr Signal über die sogenannten Chemokinrezeptoren. Mit Hilfe der Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktion gelangen z. B. Leukozyten vom Blut ins Gewebe. Die Chemokine sind in der Lage über Glucosaminglykane an die Plasmamembran zu binden. Dort können sie von passierenden Leukozyten durch den Chemokinrezeptor erkannt werden, die daraufhin β_2 -Integrine (Adhäsionsmoleküle) aktivieren, an das Endothel binden und vom Blut ins Gewebe transmigrieren [68, 99, 119, 132, 164].

Je nach An- oder Abwesenheit des Tripeptidmotivs Glutaminsäure-Leucin-Arginin (ELR) N-terminal vom ersten Cystein können CXC Chemokine in ELR+ und ELR– Chemokine eingeteilt werden. ELR+ CXC Chemokine weisen eine Spezifität für Neutrophile auf, wohingegen ELR– CXC Chemokine eine Vielzahl an Leukozyten anziehen. ELR+ Chemokine sind angiogenetisch. Sie stimulieren endotheliale Zellen, was eine gesteigerte Gefäßbildung zur Folge hat. Die meisten ELR– Chemokine sind angiostatisch, indem sie die Stimulation der endothelialen Zellen durch die ELR+ Chemokine inhibieren [58, 78, 119, 132, 144, 162].

Unter funktionellen Gesichtspunkten können die Chemokine in zwei Gruppen eingeteilt werden: Eine inflammatorische/induzierbare Gruppe, die

durch proinflammatorische Stimuli wie Lipopolysaccharide und primäre Zytokine wie IL-1 und TNF reguliert wird, und die zusammen das angeborene und adaptive Immunsystem regulieren. Es antworten gewöhnlich nur aktivierte Effektor-Lymphozyten auf inflammatorische Chemokine, da naive Zellen typischer Weise die benötigten Rezeptoren nicht exprimieren. Eine homöostatische/konstitutive Gruppe ist für die Wanderung von Lymphozyten und dendritischen Zellen während der Immunüberwachung von Bedeutung. Diese Chemokine werden gewebespezifisch exprimiert. Sie dirigieren diverse Leukozytensubpopulationen in die jeweiligen Gewebe [36, 119, 132].

Chemokine haben wichtige Funktionen bei vielen Krankheiten, wie z. B. bei Autoimmunerkrankungen, Infektionen, Allergien, Neoplasien und Gefäßanomalitäten [19, 78, 91, 156, 161]. Sie greifen unter anderem regulierend in Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung ein [19, 78, 144, 156].

1.2.2 KLASSIFIZIERUNG DER CHEMOKINREZEPTOREN

Chemokinrezeptoren sind heptahelicale G Protein-gekoppelte Rezeptoren mit folgenden gemeinsamen Merkmalen: ein saures N-terminales Segment, typischerweise 340–370 Aminosäuren, die Sequenz DRYLAIVHA oder eine Variante davon in der zweiten intrazellulären Schleife, eine kurze basische dritte intrazelluläre Schleife und ein Cystein in jeder der vier extrazellulären Domänen [119, 132]. Obwohl die meisten Chemokinrezeptoren mehr als ein Chemokin erkennen können, sind sie fast immer auf eine Unterfamilie begrenzt. Daher werden die Chemokinrezeptoren nach den an sie bindenden Chemokinfamilien eingeteilt [119]. Es gibt die Chemokinrezeptoren CCR1–11, CXCR1–6, CX₃CR1 und XCR1 [132].

Jeder Chemokinrezeptor hat eine andere Chemokin und Leukozyten Spezifität, wobei die Spezifitäten auch überlappen können, da einige Chemokine an mehrere Rezeptoren binden und einige Rezeptoren mehrere Chemokine erkennen. Im Gegensatz zu homöostatischen Chemokinen tendieren inflammatorische Chemokine und deren Rezeptoren dazu, überlappend zu interagieren [119, 132].

Signaltransduktion und Konsequenzen der Rezeptor Bindung — Die Rezeptorligation bewirkt in der den Rezeptor exprimierenden Zelle die Chemotaxis zu Arealen mit höheren Chemokinkonzentrationen [132]. Weitere Effekte sind spezifisch für die jeweiligen Chemokine und beinhalten unter anderem die Veränderung der Oberflächengestalt der Zelle. Es bilden sich lamellenartige

Ausläufer, die als Arme und Beine der migrierenden Zelle fungieren. Zudem werden Sauerstoffradikale, Histamin und zytotoxische Proteine jeweils von Neutrophilen, Basophilen und Eosinophilen abgesondert [12]. Chemokinrezeptoren vermitteln ihr Signal wahrscheinlich durch die $G\beta\gamma$ Untereinheit um die Phosphatidylinositol-3 Kinase und die phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C zu aktivieren. Letztere führt über Inositoltriphosphat und Diacylglycerol zu einem vorübergehenden Anstieg des cytosolischen freien Ca^{2+} [103, 132].

1.2.3 CHEMOKINE IM KLASSISCHEN HODGKIN LYMPHOM

Die meisten Chemokine, die im CHL untersucht worden sind, lassen sich basierend auf dem Expressionsmuster der Rezeptoren von T-Helfer-Zellen in Th1 bzw. Th2 Chemokine einteilen. Th1-Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 [147] und werden von den entsprechenden Liganden zum Ort der Chemokinproduktion angezogen. Die Liganden für CXCR3 sind die Chemokine *IFN- γ -inducible protein* (IP)-10 (CXCL10) und *monocyte induced by IFN- γ* (Mig, CXCL9). An CCR5 binden das *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) und das Chemokin *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES, CCL5). Th2-Zellen exprimieren die Rezeptoren CCR3, CCR4 und CCR8. Eotaxin (CCL11) ist ein Ligand für CCR3, wohingegen das *thymus and activation regulated chemokine* TARC (CCL17) und das *monocyte-derived chemokine* (MDC, CCL22) Liganden für CCR4 darstellen. Der Ligand für CCR8 ist I-309 (CCL1). Eosinophile exprimieren ebenfalls hohe Level an CCR3 und werden demnach zusammen mit den CCR3+ Th2-Zellen durch Eotaxin angelockt. RANTES ist sowohl ein Ligand für CCR5 als auch für CCR3.

1.2.3.1 Th2 Chemokine

Eine hohe TARC Expression wird in HL Zelllinien und in den H/RS Zellen beim CHL gefunden, nicht aber im NLPHL [21, 108, 130, 134]. Im NSHL ist die Expression am höchsten. Eine große Anzahl der die H/RS Zellen umgebenden CD4+ Th2-Lymphozyten ist CCR4+, nicht aber die H/RS Zellen [21]. Zur CCR4 Expression in HL Zelllinien gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen. Van den Berg et al. [21] beobachteten mit Hilfe der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), dass alle untersuchten HL Zelllinien CCR4 positiv sind. Höpken et al. konnten andererseits keine

CCR4 mRNA mittels *RNase protection assay* in den gleichen Zelllinien detektieren [69].

Eine deutliche MDC Expression in H/RS Zellen kann als weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen CHL und NLPHL verwendet werden, da sie spezifisch für das CHL ist [61, 165, 166]. Im Vergleich der Subtypen ist die MDC Expression im NSHL signifikant höher als im MCHL.

Die Eotaxin Expression im CHL ist erhöht [86, 165, 166]. Innerhalb der Subtypen sind die höchsten Eotaxin Level im NSHL anzutreffen. Dort wird es durch Fibroblasten, Makrophagen, glatte Muskelzellen der Blutgefäße und Lymphozyten exprimiert. Zudem korreliert die Eotaxin Expression mit der Anzahl an Eosinophilen in CHL Gewebe, was die Vermutung unterstützt, dass Eotaxin die Eosinophilen Rekrutierung ins Gewebe fördert. Bezüglich der Eotaxin Expression in den H/RS Zellen gibt es gegensätzliche Ergebnisse. Teruya-Feldstein et al. [165] zeigten, dass Eotaxin in primären H/RS Zellen exprimiert wird. Jundt et al. [86] fanden jedoch die Eotaxin Expression nur in einer von fünf Zelllinien, nicht aber in primären H/RS Zellen. Sie identifizierten Fibroblasten als Hauptquelle der Eotaxin Expression, die durch von HL Zellen sezerniertes TNF- α zur Eotaxin Produktion stimuliert wurden. Die Eotaxin RNA Expression in der Zelllinie wurde von Maggio et al. [108] bestätigt.

Es konnte keine Expression von CCR3 auf primären H/RS Zellen gezeigt werden [24]. Eine starke CCR3 Expression wurde jedoch in circa 50 % der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten und B-Lymphozyten des Infiltrates gefunden. In Bezug auf die CCR3 Expression in HL Zelllinien gibt es wieder konträre Aussagen. Buri et al. [24] konnten keine CCR3 Expression auf der Oberfläche der HL Zelllinien detektieren. Höpken et al. [69] beobachteten in einigen HL Zelllinien eine CCR3 mRNA und Protein Expression.

Eine I-309 Expression liegt in einigen HL Zelllinien vor [108]. Der entsprechende Rezeptor CCR8 wurde durch Van den Berg et al. [21] in HL Zelllinien detektiert, Höpken et al. [69] konnten jedoch keine CCR8 Expression in den HL Zelllinien nachweisen.

1.2.3.2 *Th1 Chemokine*

Die Th1 assoziierten Chemokine IP-10, Mig, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sind im CHL verstärkt exprimiert [24, 130, 166]. Im Gegensatz zu Eotaxin, TARC und MDC, die mit NSHL assoziiert werden, sind die Expressionsspiegel von IP-10, Mig und MIP-1 α im MCHL höher. Die IP-10 und Mig Expres-

sion ist in den H/RS Zellen am stärksten und auch in Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten präsent. CCR5 wird nicht durch H/RS Zellen, sondern stark in etwa der Hälfte der CD4+ T-Lymphozyten und B-Lymphozyten des reaktiven Infiltrates exprimiert. Eine mäßige CXCR3-Hochregulierung findet man in den CD4+ T-Lymphozyten. H/RS Zellen sind CXCR3 negativ.

1.2.3.3 Weitere Chemokine im Hodgkin Lymphom

Das *monocyte chemotactic protein* (MCP)-1 (CCL2) und MCP-4 (CCL13), potentielle Attraktanten für T-Lymphozyten, wurden in Makrophagen des Infiltrates bzw. in den H/RS Zellen des Tumors entdeckt [24, 105, 107].

IL-8 (CXCL8) ist ein potenter Neutrophilen Rekrutierungsfaktor, der an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 auf Neutrophilen bindet. Auch IL-8 ist in CHL Geweben exprimiert und seine Spiegel korrelieren mit der Dichte der Gewebeneutrophilie. IL-8 wird überwiegend durch Zellen innerhalb des Infiltrates exprimiert und wird nur in vereinzelt Fällen in den H/RS Zellen gefunden [105, 108, 157].

Desweiteren können im HL Chemokine und deren Rezeptoren nachgewiesen werden, die für die Migration von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen in den Lymphknoten verantwortlich sind. Dazu gehört das *Epstein-Barr-virus-induced sDNA1-ligand chemokine* ELC (CCL19) und das *secondary-lymphoid-tissue-derived chemokine* SLC (CCL21), die physiologisch in den T-Zellzonen der Lymphknoten exprimiert werden, und die die Migration der T-Lymphozyten und dendritischen Zellen über den Rezeptor CCR7 in dieses Kompartiment vermitteln [87]. Außerdem zählt das *B cell-attracting chemokine* BCA-1 (CXCL13) dazu, das konstitutiv in den B-Zell Follikeln exprimiert wird und das Follikel-*Homing* der B-Lymphozyten via CXCR5 vermittelt [36]. Das *liver- and activation-regulated chemokine* (LARC, CCL20) spielt eine Rolle bei der Gedächtnis-T-Zell Rekrutierung und dem *Homing* von dendritischen Zellen in sekundäre lymphatische Organe [119]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die H/RS Zellen im CHL eine starke CCR7 Expression und eine mäßige CXCR5 Expression aufweisen [69]. Die Chemokine SLC, ELC und BCA-1 werden nicht in den H/RS Zellen, aber im Infiltrat stark exprimiert. Eine sehr schwache SLC Expression wurde in HL Zelllinien beobachtet, wohingegen ELC nur in einer Zelllinie nachgewiesen werden konnte [108]. Die *Popcorn* Zellen im NPLPHL waren CCR7 negativ aber vermutlich CXCR5 positiv [69]. Ähnliche Ergebnisse wurden

für CXCR4 und den Liganden *stromal derived factor* (SDF)-1 (CXCL12) gefunden [69]. CXCR4 ist mit seinem Auftreten in Neutrophilen, Monozyten, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, B-Vorläuferzellen, CD34+ Vorläuferzellen aus Blut und Knochenmark, dem Blut entstammenden dendritischen Zellen, Langerhans Zellen, T-Lymphozyten und Makrophagen, im Thymus vorkommenden unreifen und reifen T-Lymphozyten sehr weit verbreitet [119, 132]. SDF-1 induziert unter anderem die Migration von B-Lymphozyten und es wird postuliert, dass es zusammen mit CCR7 beim *Homing* der H/RS Zellen eine Rolle spielt [69]. In einem Teil der HL Zelllinien konnte LARC RNA nachgewiesen werden [108]. Eine Übersicht über die geschilderte Expression von Chemokinen in HL Zelllinien und primären H/RS Zellen ist in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

1.3 CD40

CD40 ist ein Oberflächenrezeptor, der zur Familie der Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren (TNFR) gehört [95]. Er teilt mit den anderen Mitgliedern der TNFR-Familie Signaleigenschaften, die wichtig für Zellwachstum und -überleben sind. Die Aktivierung von CD40 erfordert den Kontakt mit CD40L, welcher an der Oberfläche benachbarter Zellen exprimiert wird. Der CD40/CD40L vermittelte Kontakt zwischen B- und T-Lymphozyten ist eine essentielle Voraussetzung für die Erzeugung der T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort. Die Aktivierung von CD40 auf B-Lymphozyten stimuliert deren Proliferation und vermittelt den Ig Klassen Wechsel in Verbindung mit IL-4 und IL-13 [13, 104]. Die Reifung von dendritischen Zellen durch CD40L bewirkt *in vitro* eine starke Hochregulierung des Chemokinrezeptors CCR7 [149, 159]. Sowohl kultivierte als auch primäre H/RS Zellen exprimieren CD40 auf ihrer Oberfläche [30, 53, 128]. CD40L wird nicht durch kultivierte und primäre H/RS Zellen exprimiert, er befindet sich aber auf den CD4+ T-Lymphozyten, die die H/RS Zellen rosettenartig umgeben [31, 53, 157]. Es wurde beschrieben, dass die Behandlung von HL Zelllinien mit CD40L zu einer gesteigerten Zytokinsekretion führt, das klonale Wachstum zweier HL Zelllinien steigert und deren Überlebensrate *in vitro* erhöht [31, 157]. Von CD40 existieren mehrere Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen [167]. Einige dieser Isoformen können die CD40-Signaltransduktion verringern.

Tabelle 1.1: Expression von Chemokinen in HL Zelllinien und primären H/RS Zellen. „+“ bedeutet, dass das jeweilige Chemokin in den Tumorzellen exprimiert wird. „(+)-“ bedeutet, dass das Chemokin nur sehr schwach, „-“, dass das entsprechende Chemokin nicht in den Tumorzellen exprimiert wird. Wurde das Chemokin nicht in allen untersuchten Zelllinien gefunden, steht die Anzahl der chemokinexprimierenden Zelllinien im Verhältnis zur Anzahl der untersuchten Zelllinien in Klammern. Von einigen Chemokinen liegen noch keine Expressionsdaten vor (n.D.). DC sind dendritische Zellen.

Chemokin	biol. Aktivität	Expression in HL Zelllinien	Expression in primäre H/RS Zellen	Kommentare
TARC	Th2-Zell Rekrutierung	+	+	NLHPL negativ, mehr im NSHL Subtyp
MDC	Th2-Zell, Eosinophilen Rekrutierung	+	+	NLPHL negativ, mehr im NSHL Subtyp
Eotaxin	Eosinophilen, Th2-Zell Rekrutierung	+(1/6)	+/-	mehr im NSHL Subtyp, assoziiert mit Gewebeseosinophilie
IP-10, Mig, MIP-1 α	Th1-Zell Rekrutierung	+(4/5), n.D.	+ , + , -	mehr im MCHL Subtyp und EBV+ Fällen.
IL-8	Neutrophilen Rekrutierung	-	(+)	assoziiert mit Neutrophilie
RANTES	T-Zell Rekrutierung	+	-	von T-Lymphozyten exprimiert
SLC, ELC	T-Zell, DC <i>Homing</i>	(+/-)(+/-)(1/5)	- , -	
BCA-1	B-Zell <i>Homing</i>	-	-	
SDF-1	Monozyten, B-Zell Rekrutierung	-	-	
MCP-1, MCP-4	Monozyten, T-Zell, Eosinophilen Rekrutierung	n.D., +(1/5)	- , +	
MIP-1 β	T-Zell Rekrutierung	n.D.	-	
LARC	Gedächtnis-T-Zell, DC Rekrutierung	+(2/5)	n.D.	von Makrophagen exprimiert
I-309	Th2-Zell, Monozyten Rekrutierung	+(4/5)	n.D.	

1.4 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die positiv oder negativ regulierend auf die Transkription eines oder mehrerer Gene einwirken.

1.4.1 NUKLEÄRER FAKTOR κ B

Die Familie der Transkriptionsfaktoren Nukleärer Faktor κ B (NF- κ B) spielt eine zentrale Rolle bei Entzündung, Proliferation und Verhinderung der Apoptose. Ein funktionelles NF- κ B Molekül ist ein Heterodimer aus Mitgliedern der Rel Familie, bestehend aus RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 und 52 [2]. Besonders häufig tritt der RelA/p50 Komplex auf. NF- κ B wird durch den Inhibitor I κ B in einer inaktiven Form im Zytoplasma gehalten, indem das nukleäre Lokalisierungssignal des NF- κ B maskiert wird. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über die Signaltransduktion der TNFR Familie. Die intrazelluläre Signaltransduktion der TNFR Mitglieder wird durch TNFR assoziierte Faktoren (TRAFs) vermittelt. TRAFs binden im Zytoplasma an die Rezeptoren und rekrutieren andere Proteine zur Bildung eines aktiven Signalkomplexes, der ultimativ die Aktivierung der I κ B Kinasen (IKKs) auslöst [157]. Die IKKs phosphorylieren daraufhin zwei Serinreste im I κ B, was eine Ubiquitinierung und Degradation des I κ Bs zur Folge hat. Das NF- κ B ist somit frei und kann in den Nukleus wandern, wo es unter anderem die Transkription der Gene von Zytokinen, Zelladhäsionsmolekülen und Akute-Phase-Proteinen, die in Proliferation, Überleben und inflammatorische Antwort involviert sind, stimuliert [157]. Von den sechs identifizierten TRAF Molekülen ist die Signaltransduktion über TRAF2, TRAF5 und TRAF6 mit einer NF- κ B Aktivierung verbunden [168]. Alle drei TRAFs sind in der Lage mit CD40 zu interagieren. TRAF2 und TRAF6 wurden in HL Zelllinien, TRAF2 außerdem in primären H/RS Zellen gefunden [81].

NF- κ B im klassischen Hodgkin Lymphom — Sowohl in kultivierten als auch in primären H/RS Zellen ist NF- κ B konstitutiv aktiv und wird mit der Proliferation und dem Schutz vor Apoptose assoziiert [14, 15, 80, 98, 174]. Drei Mechanismen wurden bisher für die konstitutive NF- κ B Aktivierung identifiziert. Die Dysregulation der I κ B α vermittelten Kontrolle durch Mutationen im I κ B α Gen bzw. durch eine Überfunktion der IKKs und die kon-

stitutive Stimulation des CD40 Rezeptors durch eine positive Rückkopplung [14, 27, 43, 67, 98, 174].

1.4.2 AKTIVATOR PROTEIN-1

Die Aktivator Protein-1 (AP-1) Familie der Transkriptionsfaktoren ist dafür bekannt, eine große Anzahl an inflammatorischen Genen zu aktivieren. Dazu gehören die Gene für IL-2, IL-5, Granulozyten/Makrophagen-CSF, IFN- γ , den T-Zell Rezeptor und Matrix Metalloproteinasen [2]. Die Mitglieder der AP-1 Familie können über eine Leucin Zipper Region Hetero- oder Homodimere bilden. Die AP-1 Heterodimere bestehen aus einem Protein der Jun-Gruppe (cJun, JunB, JunD) und einem Protein der Fos-Gruppe (cFos, fosB, Fra1, Fra2), wohingegen die AP-1 Homodimere nur aus Proteinen der Jun-Gruppe zusammen gesetzt sind [2, 112]. Diese Dimere sind in der Lage, sequenzspezifisch an DNA-Bindestellen zu binden, und dort die Transkription der spezifischen Gene zu regulieren.

Auch AP-1 ist in kultivierten und primären H/RS Zellen vom CHL konstitutiv aktiv. cJun und JunB sind darin die Hauptbestandteile [112]. AP-1 und NF- κ B kooperieren in den HL Zellen und stimulieren unter anderem die Expression des Lymphozyten-*Homing* Rezeptors CCR7 [69, 112].

1.4.3 INTERFERON REGULIERENDE FAKTOREN

Interferone üben ihre biologischen Funktionen aus, indem sie die Expression von über 30 Genen induzieren, die für Proteine mit antiviraler, antiproliferativer und immunmodulatorischer Funktion kodieren. Zu diesen Proteinen gehören die Interferon regulierenden Faktoren (IRFs), eine Familie von mehr als zehn Transkriptionsregulatoren. Einer dieser Regulatoren ist das IRF-7, von dem bis dato die vier Spleißvarianten IRF-7A, B, C und H existieren [10, 175]. IRF-7 wird vorwiegend in lymphoiden Zellen exprimiert und seine Expression kann in vielen Zelltypen durch Virusinfektion und IFN Behandlung weiter stimuliert werden [104]. In einer homologen Region innerhalb der 115 N-terminalen Aminosäuren befindet sich die DNA Binde-Domäne (DBD). Über diese DBD binden die IRFs an ähnliche DNA Motive, die als *interferon stimulated response element* ISRE, *interferon consensus sequence* (ICS) oder *interferon regulatory factor element* IRF-E bezeichnet werden [125].

Im RANTES Promotor gibt es vier NF- κ B Bindestellen und eine ISRE Stelle. Es wurde gezeigt, dass NF- κ B und IRF-7 eine synergistische Aktivie-

nung des RANTES Promotors bewirken [51]. Der IP-10 Promotor hat zwei NF- κ B Bindestellen und eine ISRE Stelle [33, 109]. Ob hier eine synergistische Aktivierung des IP-10 Promotors durch NF- κ B und IRF-7 erreicht werden kann, ist zur Zeit nicht bekannt.

1.5 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde in Tumorzellen diverser bösartiger Erkrankungen gefunden [52, 127]. Zu diesen Erkrankungen gehört unter anderem das Burkitt Lymphom (BL), aus dem das Virus erstmalig isoliert wurde, das Nasopharynxkarzinom, das Hodgkin Lymphom und andere lymphoproliferative Krankheiten, die vorwiegend bei Immunsupprimierten auftreten, wie z. B. das Post-Transplantations lymphoproliferative Syndrom. Eine EBV Infektion hat sicher eine entscheidende Rolle in der Pathogenese dieser Tumoren, die exakten Pathomechanismen bleiben dabei jedoch noch zu klären. [84, 127]

Das EBV gehört zur γ -Subfamilie der Herpesviren [52, 127], deren Mitglieder durch ihren Lymphtropismus charakterisiert sind. Sie verbleiben nach einer Primärinfektion latent im Organismus und können unter Umständen reaktiviert werden. Das EBV besitzt ein für Viren großes Genom von 172 kBp. Im infektiösen Virion liegt es als lineare, doppelsträngige DNA, im Kernplasma der infizierten Zelle extrachromosomal ringförmig vor. Aufgrund seiner Größe kann es potentiell für über 100 Proteine kodieren. Die viralen Proteine werden bei einer Infektion in drei aufeinanderfolgenden Zeitabschnitten translatiert. Die *immediate early* Proteine werden unmittelbar nach der Infektion der Wirtszelle gebildet und starten unter anderem die Transkription der *early* Proteine und der *late* Proteine, welche Enzyme bzw. Strukturproteine darstellen und erst im späteren Verlauf der Infektion gebildet werden. Die während der Latenz exprimierte Proteine werden je nach intrazellulärer Lokalisation in zwei Gruppen eingeteilt: in die Epstein-Barr-Virus spezifischen nukleären Antigene (EBNA) 1, 2, -LP, 3A, 3B und 3C und in die latenten Membran-Proteine (LMP) 1, 2A und 2B [127].

In vitro kann EBV menschliche B-Lymphozyten zu einem Status der kontinuierlichen Proliferation transformieren, bekannt als Zell-„Immortalisierung“ [28, 127]. In den immortalisierten B-Lymphozyten werden nur wenige der über 100 Gene aktiv transkribiert. Zusätzlich werden zwei kleine, nichtpolyadenylierte RNAs, die *EBV-encoded RNA* (EBER) 1 und 2, während der Latenz exprimiert. Dadurch werden permanent die physiolo-

gischen Signaltransduktionswege aktiviert, die zur B-Zell Aktivierung und somit zur Zellteilung führen.

Im Verlauf der Transformation ist das LMP1 Onkogen die treibende Kraft. Es ist ein integrales Membranprotein mit sechs transmembranen Domänen, das multimere Aggregate formen kann und für seine Aktivierung keinen Liganden benötigt. Es besitzt zwei C-terminale Aktivierungsregionen (CTAR), über die es den TNF-Rezeptor-/CD40-Signaltransduktionsweg aktivieren kann [77, 169]. Die ligandunabhängige und konstitutive Expression von LMP1 führt unter anderem zu einer Aktivierung von NF- κ B. 30 % der NF- κ B Aktivierung läuft über die CTAR1 ab, welche mit den TRAFs interagiert, 70 % der NF- κ B Aktivierung erfolgt über die CTAR2, die an die *tumor necrosis factor-associated death domain* bindet, die ihrerseits mit TRAF2 interagiert [94]. In vitro führt eine LMP1 Transfektion in BL Zelllinien durch die Induktion der antiapoptotischen Gene Bcl2 und A20 zum Schutz vor Apoptose [62, 100, 117].

1.5.1 EBV ASSOZIIERTE LYMPHOME

Das Burkitt Lymphom ist ein hoch aggressiver, peripherer B-Zell Tumor aus der Klasse der *Non-Hodgkin* Lymphome [59]. Es kommt endemisch in äquatorial-Afrika und Papua-Guinea vor, wo es ein Kindheits-Malignom darstellt [127]. Bei 60 % der erkrankten Individuen manifestiert sich der Tumor am Kiefer oder anderen Gesichtsknochen. In westlichen Ländern kommt das BL nur sporadisch vor. Hier ist oft der Bauchraum befallen. Außerdem tritt das BL in HIV-infizierten Individuen relativ früh im Laufe der Progression zu AIDS auf. Es verteilt sich dort im ganzen Körper und kann das Zentrale Nervensystem und das Knochenmark befallen [29]. Die BL Tumorzellen stammen von Keimzentrums-B-Lymphozyten ab und tragen eine charakteristische chromosomale Translokation: t(8;14), t(8;2) oder t(8;22) [117]. Die Translokation plaziert das Protoonkogen *c-myc*, einen Hauptregulator von Zellwachstum und -differenzierung, unter die Kontrolle eines Immunglobulins, was eine Überexpression von *c-myc* zur Folge hat. 100 % der endemischen BL tragen das EB-Virus, wohingegen nur 30 % der sporadischen und HIV-assoziierten BL EBV positiv sind [29]. Die Expression der viralen Latenzgene ist im BL auf die EBERs und EBNA1 beschränkt [127].

Beim klassischen Hodgkin Lymphom gibt es ein ähnliches Verteilungsmuster des EBV wie beim BL. In den westlichen Ländern ist das EBV zu

20–50 % in den Tumorzellen vorhanden, in Entwicklungsländern befindet es sich in nahezu 100 % der H/RS Zellen [65, 83, 127]. Auch die CHL, die in der Kindheit auftreten, scheinen häufiger mit dem EBV assoziiert zu sein. Das Virus ist überwiegend in der MCHL Form anzutreffen, während die NSHL Form und die LDHL Form seltener EBV-positiv sind [139]. NLPHL ist bisher immer EBV-negativ. In allen EBV-assoziierten HL Fällen werden LMP1 und LMP2A sowie die EBERs und EBNA1 exprimiert [127].

Da die EBV Genome der Tumorzellen monoklonalen Ursprungs sind, scheint eine Infektion vor der Ausbreitung der malignen Zellklone stattgefunden zu haben [127]. Es stellt sich die Frage, warum die EBV-assoziierten Tumoren nicht durch das Immunsystem eliminiert werden. Beim BL ist die Abwesenheit der viralen Antigene, die vom Immunsystem erkannt werden, eine Erklärung. Zusätzlich ist EBNA1 in der Lage, die Tumorzellen für CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten unsichtbar zu machen. Es besitzt eine repetitive Aminosäuresequenz, die die ubiquitinabhängigen intrazellulären Prozesse und Präsentationen im Zusammenhang mit den MHC Klasse I Molekülen blockiert. Ebenso gibt es Hinweise, dass c-myc die Expression der MHC Klasse I-Gene reprimiert und somit die Moleküle auf der Zelloberfläche reduziert [117]. Im Gegensatz dazu werden die im HL exprimierten LMP1 und LMP2A Antigene durch zytotoxische T-Lymphozyten erkannt und *in vitro* auch durch diese eliminiert.

1.6 Ziele der Arbeit

Das HL geht mit einer anormalen Zytokinproduktion einher. Die Zytokine tragen zu einer geschwächten Immunantwort im Patienten bei. Es wurde angenommen, dass die H/RS Zellen potente Zytokine sezernieren, die ihr eigenes Wachstum stimulieren und es ihnen ermöglichen, der Immunantwort zu entkommen [21]. Jedoch ist dieses systemische Zytokinungleichgewicht nicht ausreichend, um das charakteristische Infiltrat, das die H/RS Zellen umgibt, zu erklären. Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass die Natur des zellulären Infiltrates eher durch bestimmte Chemokine, die lokal produziert und sezerniert werden, determiniert wird [165, 166].

Das Ziel dieser Arbeit ist, das Expressionsmuster von Chemokinen und deren Rezeptoren in HL Gewebematerial und in etablierten HL Laborzelllinien zu untersuchen. Das Expressionsmuster soll mit dem von etablierten BL Zelllinien verglichen werden, da das BL im Gegensatz zum HL ein peripheres Lymphom ist und kein lymphozytäres, reaktives Infiltrat aufweist.

Desweiteren sollen Versuche durchgeführt werden, die zur Klärung von molekularen Mechanismen der Chemokin- und Chemokinrezeptor Expression im HL beitragen. Dazu wird die konstitutive Expression der Chemokine und Rezeptoren mit der induzierbaren Expression in den Zelllinien verglichen: Da primäre H/RS Zellen CD40 exprimieren und von CD4+ T-Lymphozyten im Infiltrat umgeben werden, die ihrerseits CD40L exprimieren, soll untersucht werden, ob eine CD40/CD40L Wechselwirkung einen Einfluss auf das Expressionsmuster der Chemokine hat. Außerdem soll untersucht werden, ob EBV einen Einfluss auf die Expression der Chemokine und Rezeptoren hat, da EBV positive HL das LMP1 exprimieren, welches diverse TNFR Signaltransduktionswege aktivieren kann [14, 15, 51, 67, 80, 98, 174].

Material

2.1 *Eukaryontische Zelllinien*

2.1.1 HODGKIN LYMPHOM ZELLINIEN

L428 Zelllinie mit B-Zell Ursprung, die aus dem Pleuraerguss eines 37 Jahre alten, weiblichen Patienten mit NSHL gewonnen wurde [153]. Artikelnummer der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ): ACC 197.

L1236 Zelllinie mit B-Zell Ursprung, die aus peripheren Blutzellen eines 34-jährigen, männlichen Patienten mit MCHL etabliert wurde [173].

KM-H2 Zelllinie mit B-Zell Ursprung, die aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen, männlichen Patienten mit MCHL entwickelt wurde [89]. DSMZ-Nr.: ACC 8.

HDLM-2 Zelllinie mit T-Zell Ursprung, die aus dem Pleuraerguss eines 74 Jahre alten, männlichen Patienten mit NSHL etabliert wurde [38]. DSMZ-Nr.: ACC 17.

Diese Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Diehl, Abteilung für Innere Medizin I der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 BURKITT LYMPHOM ZELLINIEN

BL-2 Zelllinie mit B-Zell Ursprung, die aus dem Tumormaterial eines 7 Jahre alten, männlichen Patienten entwickelt wurde [102].

BL-30 Zelllinie mit B-Zell Ursprung, die aus dem Knochenmark eines 19-jährigen, männlichen Patienten gewonnen wurde [102].

BL-41 Zelllinie mit B-Zell Ursprung, die aus dem Tumormaterial eines 8 Jahre alten, männlichen Patienten etabliert wurde [102]. DSMZ-Nr.: ACC 160

Alle drei Patienten waren Kaukasier.

BL-2 B95-8, BL-30 B95-8, BL-41 B95-8 sind die entsprechenden BL Zelllinien, die mit dem immortalisierenden EBV-Stamm B95-8 infiziert worden sind und somit in stabile EBV-positive Zelllinien konvertiert wurden [28].

BL-2 P3HR-1, BL-30 P3HR-1, BL-41 P3HR-1 sind die entsprechenden BL Zelllinien, die mit dem nichtimmortalisierenden EBV-Isolat P3HR-1 infiziert worden sind. Dem P3HR-1 Isolat fehlt die codierende Sequenz für EBNA2 [28]. Die BL Zelllinien sind somit EBV-positiv, aber EBNA2 negativ und exprimieren dadurch kein LMP1 auf ihrer Oberfläche.

Die BL Zelllinien stammen von G. M. Lenoir von der *International Agency for Research on Cancer* [28].

2.1.3 *Baby Hamster Kidney* ZELLEN

BHK-wt Subklon einer parentalen *Baby Hamster Kidney* (BHK) Zelllinie, etabliert aus Baby-Hamsternierenfibroblasten. *American Type Culture Collection*-Nr.: CCL-10

BHK-CD40L BHK Zelllinie, die mit der cDNA des humanen CD40 Liganden (pEF BOS/CD40L cDNA) und einem Vektor, der eine Geneticinresistenz trägt (pTCF Vektor), stabil kotransfiziert wurde. Diese Zelllinie wurde im Labor von Ingo Hirsch etabliert.

2.2 *Medien und Reagenzien für die Zellkultur*

- RPMI 1640 Medium mit Glutamax.
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit Glutamax.
- Fötales Kälberserum (FCS), welches 30 min auf 56 °C erhitzt wurde. Diese Behandlung inaktiviert die Komplement Proteine [22].
- Penicillin-Streptomycin-Lösung: 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin.
- Natrium-Pyruvat-Lösung, 100 mmol/l.

- 1 × Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05 % Trypsin und 0,02 % Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA).
- Geneticin.

Die aufgelisteten Medien und Reagenzien wurden alle von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

Standardmedium für Lymphomzelllinien (RPMI-Medium) RPMI 1640 mit Glutamax mit folgenden Zusätzen: 8 % FCS; 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung; 1 % Natrium-Pyruvat-Lösung.

Standardmedium für BHK-wt Zellen (DMEM-Medium) DMEM mit folgenden Zusätzen: 8 % FCS; 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung; 1 % Natrium-Pyruvat-Lösung.

Standardmedium für BHK-CD40L Zellen (DMEM-Geneticin-Medium)
DMEM-Medium, das zusätzlich Geneticin in einer Konzentration von 90 mg/l enthält.

Einfrieremedium 90 % FCS; 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO).

2.3 Primäres Hodgkin Lymphomgewebe

Hodgkin Lymphom Biopsien wurden von Herrn Dr. Re und Prof. Dr. Diehl, Abteilung für Innere Medizin I der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Von den Biopsien wurden von Frau Priv. Doz. Dr. Wickenhauser, Pathologie der Universität zu Köln, Gefrierschnitte angefertigt und diese in Azeton vorfixiert. Bei den HL Biopsien handelt es sich um zwei NSHL-Subtypen, fünf Rezidiven vom CHL und zwei NLPHL-Subtypen. Beim Vorliegen eines Rezidivs ist eine weitere Subtypisierung nicht zulässig, da durch eine vorangegangene Therapie die zelluläre Zusammensetzung des Tumors stark verändert ist.

2.4 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Stammlösungen für molekularbiologische Experimente wurden soweit nicht anders angegeben nach Sambrook et al. [150] oder nach Ausubel et al. [11] angesetzt: 10 % Ammoniumpersulfat

(APS), 1 mol/l Dithiothreitol (DTT), 0,5 mol/l EDTA-Lösung, 0,01 mol/l Ethylenglykol-bis(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraazetat (EGTA)-Lösung, Ethidiumbromidlösung, Gelfixierlösung, 3 mol/l KCl-Lösung, Lösung D zur RNA-Isolierung, 1 mol/l $MgCl_2$ -Lösung, 5× Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Lösung, 5 mol/l NaCl-Lösung, 2 mol/l Natriumazetatlösung, Ponceau S Lösung, *phosphate-buffered saline* (PBS), 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 20× Natriumchlorid/Natriumcitrat (SSC)-Lösung, 1× STE Puffer, 10× Tris/Borat/EDTA (TBE) Elektrophoresepuffer, 10× *Tris-buffered saline* (TBS), Tris/EDTA Puffer (TE), Tris/EDTA/NaCl (TEN) 50-Lösung, Transferpuffer für den *Western Blot*, Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer.

Die für die Herstellung der Puffer und Stammlösungen verwendeten Laborchemikalien wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia (Freiburg), Applichem (Darmstadt), BioRAD (München), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemicals (Taufkirchen) bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „pa.“

In den nachfolgend aufgeführten Puffern und Lösungen beziehen sich die in Klammern angegebenen pH-Werte und Konzentrationen auf die Wasserstoffionenkonzentration bzw. die Konzentration der jeweilig eingesetzten Stammlösung.

ABTS-Substrat 2 g/l 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonsäure) (ABTS); 0,2 ml/l H_2O_2 (30 %); in ABTS-Citratpuffer (6,5 ml Natriumcitratlösung (1 mol/l, pH 7,8); 3,5 ml Zitronensäure (1 mol/l, pH 2); 90 ml H_2O).

AEC-Substrat 1,25 ml Natriumazetatpuffer (pH 5); 83,75 μ l AEC-Stock (1 Tablette 3-Amino-9-ethylcarbazol in 5 ml DMSO gelöst); 1,25 μ l H_2O_2 (30 %).

AP-1 Bindepuffer 25 mmol/l N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)-KOH (pH 7,9); 60 mmol/l KCl; 20 mmol/l $MgCl_2$; 0,2 mmol/l EDTA; 10 % Glycerin; 1,25 mmol/l DTT; 5 % poly (dI/dC); 0,2 mmol/l Phenylmethylylsulfonylfluorid (PMSF); 20 mg/l Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine* (BSA)).

Lämmli-puffer 40 % Glycerin; 8 % SDS; 250 mmol/l Tris (pH 6,8); 0,4 % Bromphenolblau. Vor Gebrauch wurden zu 60 μ l Lämmli-puffer 9 μ l β -Mercaptoethanol zugegeben.

Mayers Hämalaun 0,1 % Hämatoxylin; 0,02 % NaJO_3 ; 5 % $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$; 5 % Chloralhydrat; 0,1 % Zitronensäure.

Natriumazetatpuffer pH 5 74 ml Essigsäure (0,2 mol/l); 3,218 g Natriumazetat; mit Eisessig pH 5,0 einstellen; mit H_2O auf 1 l auffüllen.

NF- κ B Puffer

10 × Bindepuffer 0,1 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5); 0,5 mmol/l NaCl; 10 mmol/l EDTA (pH 8,0); 50 % Glycerin.

Puffer D+ 20 mmol/l HEPES (pH 7,9); 5 % Glycerin; 100 mmol/l KCl; 5 nmol/l EDTA (pH 8,0); 1 % Nonidet NP-40.

Reaktionsmix 22,6 % 10 × Bindepuffer; 22,6 % Puffer D+; 22,6 % poly (dI/dC) (1 g/l); 22,6 % BSA (10 g/l); 3,5 % 0,1 molares PMSF; 3,5 % Aprotinin (2,1 g/l); 2,6 % DTT (1 mol/l).

Farbmarker 14 % 10 × Bindepuffer; 14 % Puffer D+; 0,5 % Bromphenolblau; 0,5 % Xylencyanol.

Puffer für die Kernextraktion nach Dignam

Puffer A 10 mmol/l HEPES (pH 7,9); 10 mmol/l KCl; 1,5 mmol/l MgCl_2 .

Puffer B 20 mmol/l HEPES (pH 7,9); 25 % Glycerin; 420 mmol/l NaCl; 1,5 mmol/l MgCl_2 ; 0,2 mmol/l EDTA (pH 8,0).

Puffer D 20 mmol/l HEPES (pH 7,9); 20 % Glycerin; 100 mmol/l KCl; 50 mmol/l EDTA (pH 8,0).

Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu Puffer A, B und D jeweils 2 mmol/l DTT, 1,26 mg/l Aprotinin, 0,6 mmol/l PMSF dazugegeben, zu Puffer D zusätzlich 1 % Nonidet NP-40.

Puffer für die Kernextraktion nach Schreiber

Puffer A 10 mmol/l HEPES (pH 7,9); 10 mmol/l KCl; 0,1 mmol/l EDTA; 0,1 mmol/l EGTA; 1 mmol/l DTT; 0,5 mmol/l PMSF.

Puffer C 20 mmol/l HEPES (pH 7,9); 400 mmol/l NaCl; 1 mmol/l EDTA; 1 mmol/l EGTA; 1 mmol/l DTT; 1 mmol/l PMSF.

Puffer für die Ganzzellextraktion 500 mmol/l LSDB (*low salt dilution buffer*): 20 % Glycerin; 50 mmol/l Tris HCl (pH 7,9); 1 mmol/l DTT; 500 mmol/l

KCl; 0,1 % Nonidet NP-40. Kurz vor Gebrauch wurden 1 mmol/l Natrium-ortho-vanadat, 6 mmol/l PMSF, 2 mmol/l DTT und 9,7 mg/l Aprotinin hinzugegeben.

RNA-Proben-Puffer 66 % Formamid, deionisiert; 8 % Formaldehyd; 0,1 % Xylenblau; 0,1 % Bromphenolblau; in 1 × MOPS.

2.5 Gele

2.5.1 DISKONTINUIERLICHES SDS-POLYACRYLAMIDGEL

Gelzusammensetzung:

5%iges Sammelgel 3,075 ml H₂O; 625 µl 0,5 molares Tris-HCl, SDS, 0,4 %ig (pH 6,8); 750 µl Acrylamid, 30 %ig / Bisacryl-amid, 0,8 %ig; 5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED); 50 µl APS, 10 %ig.

Trenngel 12 % (10 %) 2,75 ml (4,15 ml) H₂O; 2,5 ml 1,5 molares Tris-HCl, SDS 0,4 %ig (pH 8,8); 4 ml (3,35 ml) Acrylamid, 30 %ig / Bisacrylamid, 0,8 %ig; 5 µl TEMED; 50 µl APS, 10 %ig.

2.5.2 NATIVES POLYACRYLAMIDGEL FÜR DEN *electrophoretic mobility shift assay*

4%iges Gel 1,5 ml 10 × TBE; 50 ml H₂O; 8 ml Acrylamid, 30 %ig / Bisacrylamid, 0,8 %ig; 42 µl TEMED; 540 µl APS, 10 %ig.

2.6 Nukleotide

Alle Oligonukleotide, die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und den *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) verwendet wurden, stammten von der Firma Eurogentec (Brüssel).

Tabelle 2.1: Oligonukleotide für EMSA. Die fett gedruckten Buchstaben stellen die jeweiligen Bindestellen der Transkriptionsfaktoren dar.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
NF-κBs	AGCTTCAGAGGGG ACTT CCCGAGAGG
NF-κBa	TCGACCTCTCGG AAAGT CCCCCTCTGA
AP-1s	AGCTCGCG TGACT CAGCTGGATC
AP-1a	GATCCAGCT GAGT CACGCGAGCT

Tabelle 2.2: PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Art
hCD40splneu	GGTCCTGCCGCTGGTCTCAC	5'-Primer
hCD40splas	CCTCCTGGGTGACCGTTGGC	3'-Primer

Plasmide: pEF Bos/CD40: Eukaryontischer Expressionsvektor, dessen CD40-Gen von dem Promotor des humanen Elongationsfaktors EF-1 α reguliert wird.

2.7 Chemokine

Die verwendeten Chemokine sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

2.8 Antikörper

Die benutzten Primärantikörper sind in Tabelle 2.4 aufgelistet, Negativkontrollseren in Tabelle 2.5 und Sekundärantikörper in Tabelle 2.6.

Tabelle 2.3: Die Chemokine wurden in der angegebenen Konzentration für den ^{c)} ELISA oder ^{e)} Chemotaxisassay verwendet.

Bezeichnung	Firma	Quelle	Konzentration
rekombinantes humanes MCP-1	Tebu	E.coli	5 $\mu\text{g/l}^c$
rekombinantes humanes MIG	Tebu	E.coli	5 $\mu\text{g/l}^c$
rekombinantes humanes MIP-1 α	Tebu	E.coli	5 $\mu\text{g/l}^c$
rekombinantes humanes ELC	Tebu	E.coli	200 $\mu\text{g/l}^e$
rekombinantes humanes IP-10	Tebu	E.coli	200 $\mu\text{g/l}^e$
rekombinantes humanes SDF-1 α	Tebu	E.coli	100 $\mu\text{g/l}^e$
rekombinantes humanes SLC	Tebu	E.coli	200 $\mu\text{g/l}^e$
rekombinantes humanes TARC	Tebu	E.coli	200 $\mu\text{g/l}^e$

Tabelle 2.4: Primärantikörper. Die Antikörper wurden in ^{a)} Immunhistochemie, ^{b)} Fluoreszenzfärbung, ^{c)} ELISA, ^{d)} Western Blot eingesetzt.

Bezeichnung	Klonalität	Klon	Spezie, Isootyp	Firma	Arbeitskonzentration
anti human CCR4	monoklonal	IG1	Maus, IgG ₁	BD Pharmingen (Heidelberg)	5 mg/l ^b , 50 µl
anti human CCR7	monoklonal	2H4	Maus, IgM κ	BD Pharmingen	2 mg/l ^c ; 5 mg/l ^b , 50 µl
anti human CD3	monoklonal	UCHT1	Maus, IgG ₁ , κ	Dako (Hamburg)	1:50 ^a
anti human CD20	monoklonal	L26	Maus, IgG _{2a} , κ	Dako	1:50 ^a
anti human CD30	monoklonal	K1-1	Maus, IgG ₃ , κ	Dako	1:50 ^a
anti human EIC	polyklonal	TÜ39	Kaninchen, IgG ₁	Tebu (Frankfurt a. M.)	0,2 mg/l ^a
FITC anti human HLA-DR, DQ, DP			Maus, IgG _{2a} , κ	BD Pharmingen	10 µl ^b
anti human ICAM-1		P3.58BaII	Maus, IgG ₁		50 µl ^b
anti human IRE-1	polyklonal	C-20	Kaninchen, IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	1:2500, 2 h ^d
anti human IRE-3	polyklonal	FL-425	Kaninchen, IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:8000, 2,5 h ^d
anti human IRE-7	polyklonal	H-246	Kaninchen, IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:2000, 2,5 h/1:1000 ü.N. ^d
anti human MCP-1, capture	monoklonal	5D3-F7	Maus, IgG ₁	BD Pharmingen	1 mg/l ^c
anti human MCP-1, detection	polyklonal		Kaninchen	Tebu	0,5 mg/l ^c
anti human MIG, capture	monoklonal	B8-11	Maus, IgG ₁	BD Pharmingen	0,5 mg/l ^c
anti human MIG, detection	polyklonal	D217	Kaninchen	Tebu	0,25 mg/l ^c
anti human MIP-1 α , capture	monoklonal	14215	Maus, IgG _{2a}	R&D Systems (Wiesbaden)	4 mg/l ^c
anti human MIP-1 α , detection	polyklonal		Kaninchen	Tebu	1 mg/l ^c
anti human SLC	polyklonal		Kaninchen, IgG ₁	Tebu	0,4 mg/l ^a

Tabelle 2.5: Negativkontrollseren

Bezeichnung	Klonalität	Klon	Firma
Maus, IgG ₁	monoklonal	MOPC-21	Sigma
Maus, IgM κ	monoklonal	C48-6	BD Pharmingen
Chrompure Kaninchen, IgG			Dianova (Hamburg)
Maus, IgG _{2a} , κ (anti-TNP)	monoklonal	G155-178	BD Pharmingen

Tabelle 2.6: Sekundärantikörper. Die Antikörper wurden in der jeweiligen Verdünnung in ^{a)} Immunhistochemie, ^{b)} Fluoreszenzfärbung, ^{c)} ELISA, ^{d)} *Western Blot* eingesetzt. FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin.

Bezeichnung	Spezie	Firma	Verdünnung
biotinylierter anti Maus IgG (H+L)	Ziege	Vector Lab	1:1000 ^a
biotinylierter anti Kaninchen IgG	Ziege	Vector Lab	1:1000 ^a
FITC gekoppelter anti Maus IgG F(ab') ₂	Ziege	Dianova	1:50 ^b
PE gekoppelter anti Maus IgG F(ab') ₂	Ziege	Dianova	1:50 ^b
Peroxidase gekoppelter anti Kaninchen	Ziege	Dianova	1:2000 ^c ; 1:5000 ^d

2.9 Inhibitoren

Inhibitor	Firma	inhibierte Kinase
SB 202190	Calbiochem (Schwalbach)	p38 MAP-Kinase
SB 203580	Calbiochem	p38 MAP-Kinase
PD 98059	Calbiochem	ERK MAP-Kinase
N-Azetylcystein	Sigma	I κ B Kinase α und β

2.10 Multi-Probe Template Sets für den RNase protection assay

hCK-5 enthält cDNA Plasmide für die Chemokine RANTES, IP-10, MIP-1 β , MIP-1 α , MCP-1, IL-8 und I-309.

hCK-9 beinhaltet DNA *Templates* für die Chemokine *thymus-expressed chemokine* (TECK, CCL25), *myeloid progenitor inhibitory factor* (MPIF-1, CCL23), MDC, SLC, LARC, ELC, *pulmonary- and activation-regulated chemokine* (PARC, CCL18), TARC, *hemofiltrate CC chemokine* (HCC)-4 (CCL16) und HCC-2 (CCL15).

hCR-5 umfasst die DNA *Templates* für die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CCR2a+b, CCR2a und CCR2b.

hCR-6 enthält cDNA Plasmide für die Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR7 und CX₃CR1.

2.11 Reagenziensysteme

<i>Blocking Kit</i>	Vector Lab (CA, USA)
TSA Biotin System	PerkinElmer (Zaventem, B)
<i>Vectastain ABC Kit</i>	Vector Lab
<i>RiboQuant Ribonuclease Protection Assay Kit</i>	BD Pharmingen
<i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i>	Quiagen (Hilden)
<i>SuperScript First-Strand Synthesis System for PCR</i>	Invitrogen (Groningen, NL)

<i>Expand High Fidelity PCR System</i>	Roche (Mannheim)
<i>Random Primers DNA Labeling System</i>	Gibco BRL
<i>ExpressHyb Hybridization Solution</i>	Clontech (Heidelberg)
<i>DuoSet ELISA Development System, Rantes / IP-10</i>	R&D Systems
<i>BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)</i>	Roche
<i>Human β-Actin RT-PCR Control Amplimer Set</i>	Clontech

2.12 Sonstige Materialien

<i>NucTrap Probe Purification Column</i>	Stratagene (Amsterdam, NL)
<i>S&S Nytran SuPerCharge Nylonmembran</i>	Schleicher & Schuell (Dassel)
<i>Coverplates und Färbeschlitten</i>	Shandon (Frankfurt a. M.)
<i>Hybond ECL Nitrocellulosemembran</i>	Amersham-Pharmacia
<i>transwell culture inserts</i>	Costar Corning (NY, USA)
<i>Hyperfilm ECL</i>	Amersham-Pharmacia

Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Die Lymphomzelllinien wurden in Suspension mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml RPMI-Medium bei 37°C , 5 % CO_2 und 80–90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum Passagieren der Suspensionszellen wurden diese 5 min bei 250 g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet je nach Bedarf und Wachstumsgeschwindigkeit in einem zwei- bis dreifachen Kulturvolumen in RPMI-Medium aufgenommen. Um jeweils gleiche Voraussetzungen zu schaffen wurden die Zellen 16–20 h vor jedem Versuch zu einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml ausgesät.

Die BHK Zellen wurden adhärent in DMEM-Medium bzw. DMEM-Geneticin-Medium unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen kultiviert. Bei Erreichen von 90–100 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 3 ml (mittlere Gewebekulturflasche (GKF)) bzw. 5 ml (große GKF) Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet und das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche wurde die Flasche zum vollständigen Lösen der Zellen abgeschlagen und die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von 7 bzw. 10 ml Standardmedium abgestoppt. Die Zellen wurden je nach Dichtegrad, Bedarf und Wachstumsgeschwindigkeit in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in 15 bzw. 30 ml Medium in eine neue Flasche ausgesät.

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden die Zellen 1:6 mit Trypanblau gemischt und ein $15\ \mu\text{l}$ Aliquot mit Hilfe der Neubauerkammer gezählt. Nekrotisierende Zellen sind durchlässig für Trypanblau und erscheinen blau im Mikroskop.

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen bei -80°C eingefroren. Dafür wurde DMSO-haltiges FCS verwendet. DMSO ist eine kryoprotektive Substanz, die den Gefrierpunkt der Lösung herabsetzt. Dadurch wird die

Kristallbildung in den Zellen verhindert und die Zellen vor einer Zellschädigung durch die Kristalle geschützt. Zum Einfrieren wurden die Zellen 5 min bei 250 g und RT zentrifugiert. Adhärente Zellen wurden dafür wie oben beschrieben abgelöst. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium (1 ml pro 15 ml Zellsuspension bzw. 7 ml pro große GKF adhärenter Zellen) aufgenommen und in 1 ml Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Bei Bedarf wurden die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Zellen zügig aufgetaut und in 15 ml Standardmedium aufgenommen. Um Reste des DMSO zu entfernen wurden die Zellen unter den oben genannten Bedingungen durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in jeweils 15 ml Standardmedium resuspendiert und in eine mittlere GKF überführt. 24 h nach dem Auftauen der Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.1.2 STIMULATION MITTELS BHK ZELLEN

In dieser Arbeit wurden die BHK-CD40L Zellen dazu verwendet, den Rezeptor CD40 der Lymphomzellen über CD40L der BHK-CD40L Zellen zu stimulieren, um anschließend die Folgen einer CD40-CD40L Wechselwirkung in den Lymphomzellen zu untersuchen. BHK-wt Zellen dienten als Kontrolle zur Detektierung BHK-abhängiger Einflüsse. Die BHK Zellen mussten vor der Stimulation mit Hilfe von Paraformaldehyd fixiert werden, um die Konservierung und Strukturverfestigung der Zellen in möglichst natürlichem Zustand zu gewährleisten.

3.1.2.1 Fixierung adhärenter BHK Zellen

20 h vor der Fixierung wurden die BHK Zellen zu $1\cdot 10^5$ Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche im Standardmedium ausgesät. Für die unterschiedlichen Lochplatten und Kulturschalen ergaben sich die in Tabelle 3.1 angegebenen Bedingungen.

Nach 20-stündiger Inkubation unter Kulturbedingungen wurde der Überstand der Zellen verworfen und die Zellen zweimal mit nach Größe der Kulturfläche variierendem Waschvolumen an DMEM gewaschen (Waschvolumina siehe Tabelle 3.1). Im Anschluss daran wurde 1,5 %iges Paraformaldehyd ((PFA) in PBS, Volumen siehe Tabelle 3.1) für exakt 5 min auf die Zellen gegeben. Nach Absaugen des PFAs wurde die Fixierung durch Zugabe von RPMI-Medium abgestoppt. Es folgten fünf Waschschrte mit PBS.

Tabelle 3.1: Bedingungen bei der Fixierung adhärenter BHK Zellen

	Zellzahl	Paraformaldehyd	Waschvolumina
24-Lochplatte	$2 \cdot 10^5$ in 1 ml	0,5 ml	1 ml
6-Lochplatte	$9 \cdot 10^5$ in 2 ml	1 ml	2,5 ml
6 cm Schale	$2,2 \cdot 10^6$ in 6 ml	2 ml	3 ml
10 cm Schale	$6 \cdot 10^6$ in 10 ml	6 ml	10 ml

Zum Schluss wurde RPMI-Medium auf die Zellen gegeben und diese 30 min bei RT stehengelassen. Die fixierten BHK Zellen wurden entweder sofort für die Stimulation weiterverwendet oder bis zu zwei Tage im Medium bei 8 °C aufbewahrt.

3.1.3 CD40 STIMULATION DER LYMPHOMZELLINIEN

Die Lymphomzellen wurden im Verhältnis von 1:1 auf die BHK Zellen gegeben und für 2, 24 oder 48 h unter Kulturbedingungen stimuliert.

3.1.4 GEWINNUNG VON ZELLEN UND ZELLFREIEN ÜBERSTÄNDEN NACH DER CD40 STIMULATION

Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen in Falcon Tubes überführt und durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 660 g und 4 °C von den Überständen separiert. Die Überstände wurden anschließend mittels ELISA (siehe Abschnitt 3.3.4) auf Chemokine untersucht, die Zellen wurden für molekularbiologische und immunologische Untersuchungen, wie z. B. *Western Blot* (siehe Abschnitt 3.2.12) oder Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 3.3.1), weiterverarbeitet.

3.1.5 CHEMOTAXISASSAY

In dieser Arbeit wurde mit dem Chemotaxisassay untersucht, ob die Chemokinrezeptoren CCR4, CCR7, CXCR3 und CXCR4 der Lymphomzellen funktionell aktiv sind. Dafür wurden die Zellen mit den entsprechenden Chemokinen TARC, SLC, ELC, IP-10 und SDF-1 α stimuliert.

In jedes Loch einer 24-Lochplatte wurden 500 μ l Chemokinverdünnung in RPMI 1640 Medium mit Glutamax, das 2,5 % BSA enthält (RPMI-BSA),

gefüllt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, dem RPMI-BSA ohne Chemokin zugegeben wurde. Oberhalb der Chemokinverdünnung wurden *transwell* Membraneinsätze mit 5 μm großen Poren plaziert. In die Einsätze wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen in 100 μl RPMI-BSA gegeben. Waren die Chemokinrezeptoren der Zellen funktionell aktiv, migrierten die Zellen in der folgenden 4-stündigen Inkubationszeit unter Kulturbedingungen durch die Poren der Membran in die chemokinhaltige untere Kammer. Die Migration wurde quantifiziert, indem die durch die Membran gewanderten Zellen gezählt wurden und der prozentuale Anteil der aufgrund von Chemokinzugabe migrierten Zellen berechnet wurde.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA

Das hier verwendete Protokoll beruht auf der Ein-Schritt RNA Isolierung von Chomczynski und Sacchi [34]. Alle Lösungen für die RNA-Isolierung wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, einem starken RNase-Inhibitor)-behandeltem Wasser angesetzt.

$1 \cdot 10^7$ Suspensionszellen wurden durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 250 g und RT pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 600 μl Lösung D, einer denaturierenden, Guanidinthiocyanat-haltigen Lösung, sorgfältig resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 60 μl 2 molare Natriumazetatlösung pH 4,0 sowie 720 μl Phenol-Chloroform (5:1, Roth) dazugegeben und die Mischung bis zur Emulsionsbildung gemischt. Es folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis. Durch die sich anschließende Zentrifugation (20 min bei 12.000 g und 4 °C) wurde die Proteine und DNA enthaltende Phenol-Chloroformphase von der RNA-haltigen wässrigen Phase abgetrennt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit einem gleich großen Volumen an 100 % Isopropanol versetzt. Es folgte eine 1–24-stündige Inkubation bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$, in der die isolierte RNA gefällt wurde, an die sich eine Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g für 20 min anschloss. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit je 1 ml 66 % Ethanol gewaschen, wobei die Zentrifugationsschritte jeweils 5 min bei 4 °C und 12.000 g umfassten. Anschließend wurde das Pellet für 5 min an der Luft getrocknet, in 50 μl DEPC-Wasser resuspendiert und bei 65 °C für 10 min

gelöst. Der RNA-Gehalt wurde bestimmt (3.2.2) und die RNA-Integrität mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (3.2.3).

3.2.2 PHOTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON RNA

Die Konzentration der RNA wurde durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm haben Nukleinsäuren in wässriger Lösung ein Absorptionsmaximum. Die RNA Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung der Messlösung (1:100 in DEPC-Wasser) und den für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor von 40.

3.2.3 QUALITÄTSKONTROLLE DER RNA-PRÄPARATION

Ob eine RNA-Präparation intakt ist, lässt sich am einfachsten durch denaturierende Agarosegelelektrophorese (AGE) feststellen. Die Separierung der RNA erfolgt dabei nicht nur durch unterschiedliche Ladung der RNA im elektrischen Feld, sondern auch aufgrund der unterschiedlichen Größe und Gestalt der zu trennenden Moleküle.

3.2.3.1 Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 1,5 g Agarose in 90 ml deionisiertem Wasser und 30 ml 5×MOPS in der Mikrowelle aufgekocht und gelöst. Anschließend wurden 22,5 ml 37,5 %ige Formaldehydlösung und 2,5 μ l Ethidiumbromid-Lösung (10 g/l) zugegeben. Danach wurde die Lösung mit erhitztem, deionisiertem Wasser auf 150 ml aufgefüllt und in die Gelkammer gegossen. Nach der Verfestigung des Gels wurde dieses mit 1×MOPS überschichtet.

Jeweils 5 μ g RNA wurden bei der AGE eingesetzt. Die RNAs wurden mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 20 μ l aufgefüllt und mit je 8 μ l RNA-Proben-Puffer versehen. Nach 10-minütigem Denaturieren bei 65 °C wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert und bei 20 V für 14–18 h aufgetrennt. Die RNA-Banden konnten unter UV-Licht visualisiert und fotografiert werden. Zwei diskrete Banden für die 18 S und 28 S rRNA zeigen eine intakte Präparation an.

3.2.4 Ribonuclease Protection Assay

Das *ribonuclease protection assay* (RPA) ist eine hoch sensitive und spezifische Methode um mRNA Spezies zu detektieren und quantifizieren. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass gleichzeitig mehrere RNA Spezies in einer einzigen RNA-Probe untersucht werden können. Zur Durchführung des RPAs wurde das *RiboQuant Ribonuclease Protection Assay Kit* nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Es wurden cDNA Fragmente eingesetzt, die für die zu detektierenden RNA Spezies kodieren. In diesem Fall sind das cDNA Fragmente für humane Chemokinrezeptoren und Chemokine, die in den verwendeten *Multi-Probe Template Sets* enthalten sind (siehe Abschnitt 2.10). Die cDNA Fragmente sind in Plasmide subkloniert, welche den T7-Promotor von Bakteriophagen enthalten. Nach Zugabe von DNA-abhängiger-T7-RNA-Polymerase und [α - 32 P]UTP wurde von den Plasmiden radioaktiv markierte *antisense* RNA hergestellt. Die radioaktive *antisense* RNA wurde dann im Überschuss mit der zuvor aus den Lymphomzellen isolierten RNA hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde nichthybridisierte und somit unspezifische RNA und überschüssige radioaktive *antisense* RNA durch Ribonuclease (RNase) -Behandlung zerstört. Die übrigbleibenden RNase-geschützten (*RNase protected*) Proben wurden aufgereinigt und durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die Quantität jeder mRNA Spezies wurde anschließend durch Exposition eines Röntgenfilmes visualisiert und bestimmt.

3.2.5 REVERSE TRANSKRIPTASE-POLYMERASE-KETTENREAKTION

Mit Hilfe der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) sollte die RNA der Lymphomzellen auf Transkripte des Rezeptors CD40 untersucht werden. Die RT-PCR wurde in zwei getrennten Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde aus der mRNA cDNA hergestellt, im zweiten Schritt wurde die hergestellte cDNA spezifisch amplifiziert.

3.2.5.1 cDNA Erststrangsynthese mit Hilfe der reversen Transkriptase

Für die cDNA Erststrangsynthese wurde das *SuperScript First-Strand Synthesis Kit* verwendet. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Mit einem 12–18 bp langen Oligo(dT)-Primer, der im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryontischen mRNA hybridisiert, wurden aus zuvor isolierter Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle mit Hilfe der reversen Transkriptase

selektiv in cDNA umgeschrieben. Vor der weiteren Verwendung wurde die cDNA 1:5 mit Wasser verdünnt. Die Effizienz der cDNA Synthese wurde anhand einer β -Aktin-PCR überprüft (siehe Abschnitt 3.2.5.2).

3.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* (PCR)) ist es möglich, *in vitro* von bestimmten Nukleotidsequenzen millionenfach Kopien herzustellen [50]. In dieser Arbeit sollten mit Hilfe der PCR Transkripte für den Rezeptor CD40 amplifiziert werden. Bei der Amplifikation synthetisiert ein Enzymgemisch, das hier die thermostabile Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) und die Pwo-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*), eine Polymerase mit 3'-5'-Korrekturleseaktivität, enthält, ausgehend von Startermolekülen (*Primern*) einen neuen DNA-Strang an der zuvor synthetisierten cDNA (*Template*). Die PCR wurde mit dem *Expand High Fidelity PCR System* durchgeführt. Standardmäßig wurden folgende Reagenzien auf Eis zusammengegeben: 200 $\mu\text{mol/l}$ dNTPs, 400 $\mu\text{mol/l}$ hCD40splsneu-Primer, 400 $\mu\text{mol/l}$ hCD40splas-Primer, 2 μl Template-DNA, 5 μl 10 \times Expand HF Puffer, 2,6 U *Expand High Fidelity PCR Systemenzyme mix*. Das Reaktionsgemisch wurde mit H_2O auf 50 μl aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte die PCR. Das Reaktionsgemisch wurde bei 94 °C denaturiert, dabei trennten sich die beiden *Template*-Stränge. Anschließend wurde die Temperatur auf 65 °C gesenkt, so dass eine Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngigen *Template*-DNAs stattfand. Es folgte die Verlängerung der Primer bei 72 °C an beiden *Templates*, so dass zwei doppelsträngige DNA-Stränge entstanden, die der ursprünglichen *Template*-DNA exakt gleichen. Durch 20–22faches Wiederholen der einzelnen PCR-Schritte wurden die CD40 Transkripte amplifiziert.

Die PCR wurde im Thermocycler (Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Denaturierung 94 °C 3 min
2. Denaturierung 94 °C 45 s
3. Hybridisierung 65 °C 1 min
4. Verlängerung 72 °C 1 min 20–22 \times zu Schritt 2
5. Auffüllen 72 °C 7 min
6. Kühlen 4 °C bis zur Entnahme

Das Resultat jeder PCR wurde anschließend durch AGE überprüft.

Um die Effizienz der cDNA Synthese zu überprüfen wurde eine β -Aktin-PCR durchgeführt. Da das β -Aktin-Gen in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert wird, ist es dafür geeignet. Vor der PCR wurde von den synthetisierten cDNAs eine Verdünnungsreihe, bestehend aus vier Verdünnungsschritten von jeweils 1:5, hergestellt. 1 μ l jeder Verdünnungsreihe wurde anschließend mit dem *Human β -Actin RT-PCR Control Amplimer Set* nach dem Protokoll des Herstellers amplifiziert und mittels AGE überprüft.

3.2.6 HERSTELLUNG DER CD40-SONDE FÜR DEN *Southern Blot*

Mit Hilfe des *Southern Blots* sollten CD40 Transkripte in den Lymphomzellen detektiert werden. Das Plasmid pEF Bos/CD40, das die für CD40 kodierende cDNA enthält, wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease XbaI spezifisch gespalten und lieferte nach Isolierung und Aufreinigung die im *Southern Blot* benötigte CD40-Sonde: Zu 20 μ g Plasmid-DNA wurden 3 μ l 10 \times REAct Puffer und 3 μ l XbaI (10 μ g/ μ l, 10 U/ μ l, Gibco BRL) gegeben, die Mischung mit Wasser auf 30 μ l aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert. 10 % des Reaktionsgemisches wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 80–100 V elektrophoretisch getrennt. Nach erfolgter Auftrennung der Fragmente wurde das Agarosegel für circa 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 mg/l in H₂O) geschwenkt, die DNA-Fragmente mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Sofern das Testgel eine ausreichende Restriktionsspaltung bestätigte, wurde das übrige Reaktionsgemisch auf einem präparativen, 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und das CD40-Fragment bei UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. In Anschluss daran wurde das Fragment mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

3.2.7 RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER CD40-SONDE DURCH *random priming*

Für die radioaktive Markierung der CD40-Sonde wurde das *Random Primers DNA Labeling System* nach Angaben des Herstellers benutzt. Nach einer Denaturierung der aufgereinigten CD40-DNA wurden Hexanukleotide statistischer Zusammensetzung als Primer eingesetzt (*random primer*). Die radioaktive Markierung erfolgte mit Hilfe der *Large Fragment DNA-Polymerase I* in Gegenwart eines Desoxynukleotidgemisches sowie 50 μ Ci [α -³²P]dCTP bzw. [α -³²P]dATP (Amersham-Pharmacia). Nicht eingebaute Radioaktivität

wurde mit Hilfe der NucTrap *Probe Purification Column* nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

3.2.8 Southern Blot

Die durch die CD40 PCR amplifizierte cDNA wurde auf einem 1,2 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Agarosegel für circa 15 min im Ethidiumbromid-Bad geschwenkt, die DNA mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Im Anschluss daran wurde das Gel 10 min in 0,25 mol/l HCl depuriniert, mit Leitungswasser gespült und für 20 min in 0,4 mol/l NaOH geschwenkt. Der Blot wurde nach dem Prinzip des *downward capillary transfer* [150] aufgebaut. Der *Southern Blot* erfolgte für 5 h oder über Nacht mit 0,4 mol/l NaOH auf Nytran SuPerCharge Membran, wobei die DNA Fragmente aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden. Nach dem Transfer wurden die Fragmente durch UV-Strahlen mit einer Energie von 120 mJ auf der Membran fixiert. Im Anschluss daran wurden sie mit der radioaktiv markierten CD40 Sonde und der *ExpressHyb Hybridization Solution* nach den Angaben des Herstellers hybridisiert. Zum Schluss wurden die hybridisierten CD40-Fragmente autoradiografisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.2.14).

3.2.9 PRÄPARATION VON PROTEINEXTRAKTEN

3.2.9.1 Herstellung von Zellkernextrakten nach Dignam

Das hier zugrundeliegende Protokoll für die Herstellung von Zellkernextrakten beruht auf der Methode von Dignam et al. [39]. $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 250 g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 250 g, 4 °C). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100 μ l Puffer A resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Puffer A ist ein hypotoner Puffer, der bewirkt, dass die Zellen anschwellen. Die Zellsuspension wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend im Ultraschallbad zweimal für 5 s sonifiziert. Das Zellysate wurde 10 min bei 5.200 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das die Zellkerne enthaltende Pellet in 10–20 μ l Puffer B resuspendiert. Zur Extraktion der Kernproteine wurde das Gemisch 45 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 5.200 g, 4 °C). Der den Zellkernextrakt enthaltende Überstand wurde

in ein gleiches Volumen Puffer D gegeben und bis zur Weiterverarbeitung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.9.2 Herstellung von Zellkernextrakten nach Schreiber

Eine andere Technik zur Herstellung von Zellkernextrakten ist die Methode nach Schreiber et al. [154]. Sie ist schneller und mit einer geringeren Ausgangszellzahl durchzuführen.

$0,5\text{--}1\cdot 10^6$ Zellen wurden durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 250 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 1.200 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Anschließend wurde das Pellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und durch eine weitere Zentrifugation (15 s, 20.800 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wieder pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 400 μl kaltem Puffer A sorgfältig resuspendiert. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 25 μl einer 10 %igen Nonidet NP-40 Lösung für 10 s gründlich gemischt. Das Homogenisat wurde für 30 s bei 20.800 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der das Zytoplasma und RNA enthaltende Überstand verworfen. Das Kernpellet wurde anschließend in 50 μl kaltem Puffer C resuspendiert und 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf dem Thermomixer kräftig geschüttelt. Zum Schluss folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 20.800 g. Der den Zellkernextrakt enthaltende Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.9.3 Herstellung von Ganzzelextrakten

$5\cdot 10^6$ HL Zellen bzw. $1\cdot 10^7$ BL Zellen wurden durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 250 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Das Pellet wurde in 750 μl 100 $\mu\text{mol/l}$ Natrium-o-vanadat in PBS resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und zweimal mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Natrium-o-vanadat/PBS gewaschen. Die Zentrifugationsschritte dabei waren 250 g, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 1.380 g, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Pellet wurde anschließend in 100 μl 500 mmol/l LSDB resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension viermal abwechselnd für je 2 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad wieder aufgetaut. Danach wurde die Suspension bei 17.900 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.10 QUANTIFIZIERUNG VON PROTEINEN

Zur Quantifizierung der extrahierten Proteine wurde die Bradford-Methode angewandt. Sie beruht darauf, dass Coomassie Brilliant Blau R 250 unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Die Coomassie-Protein Komplexe haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 595 nm, während der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Dieser Farbstoff ist im Protein Assay Reagenz (BioRad) enthalten. Es wurde im Verhältnis 1:5 mit H₂O gemischt und vor der photometrischen Messung für 5 min mit der zu messenden Probe und einem Standard aus Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. Die Absorptionen der Proben wurden im Spektralphotometer (Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug dabei 405 nm. Die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe wurde anhand des eingesetzten BSA-Standards mit Hilfe des Programms *easy fit* der Firma SLT Instruments (Crailsheim) berechnet.

3.2.11 ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON PROTEINEN MITTELS SDS-POLY-ACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurden die extrahierten Proteine im elektrischen Feld getrennt. Dazu wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet, das aus einem Sammelgel mit großer Porenweite und einem Trenngel mit kleineren Poren bestand. In beiden Gelen wurde Polyacrylamid als Träger verwendet. Ein Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkte, dass die Proteine denaturiert wurden und eine negative Gesamtladung erhielten. 25 µg Proteinextrakt wurden mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 6 µl Lämmli-puffer inklusive β-Mercaptoethanol 10 min bei 95 °C denaturiert. Nachdem das Gel in die mit 1 × Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer gefüllte Vertikal-Gelelektrophoreseapparatur eingesetzt wurde, wurden die Proteinextrakte und ein Größenmarker (*low range, prestained* Proteinmarker, BioRAD) in die Geltaschen aufgetragen. Die Fokussierung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei einem konstanten Strom von 15 mA pro Gel. Hatte die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht, wurde der Strom auf 20 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, kurz bevor die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreicht hatte.

3.2.12 *Western Blot*

Mit Hilfe des *Western Blots* sollten die extrahierten Proteine nach gelelektrophoretischer Trennung auf eine proteinbindende Membran überführt und anschließend in einer spezifischen Nachweisreaktion auf die Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren IRF-1, IRF-3 und IRF-7 untersucht werden.

Nach der PAGE wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und das Trenngel in einem Blotting-Sandwich aufgebaut: Auf das Kunststoffgitter der Blotkammer wurden nacheinander, in Transferpuffer getränkt, Schwamm, Whatmanpapier, Gel, Nitrocellulosemembran, Whatmanpapier und Schwamm gelegt. Das Sandwich wurde in den mit Transferpuffer gefüllten Puffertank geschoben, so dass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet war. Im Anschluss daran erfolgte der Transfer der Proteine bei 40 mA über Nacht oder bei 250 mA für 1,5–2 h unter Eiskühlung. Nach dem Transfer wurde die Membran erst 5 min in Ponceau S Lösung und dann 5 min in destilliertem Wasser inkubiert. Dadurch wurden die Proteine rot angefärbt, und es konnte kontrolliert werden, ob beim Transfer gleichmäßige Proteinmengen auf die Membran übertragen wurden. Anschließend wurde sie in 50 ml Blockierungsmedium (5 % Magermilch, 0,1 % NaN_3 , 0,1 % TWEEN 20 in PBS) 1 h auf dem Rotationsschüttler geschwenkt. Dabei wurden freie Proteinbindestellen der Membran saturiert um eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Im Anschluss daran wurde dreimal mit Waschpuffer (0,1 % TWEEN 20 in PBS) gewaschen. Danach wurde die Membran in 2 ml Blockierungsmedium mit dem für den Transkriptionsfaktor spezifischen Primärantikörper für die angegebenen Zeiten (siehe Tabelle 2.4) im Rotationshybridisierungssofen bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran mit Peroxidase gekoppeltem anti Kaninchen Antikörper (1:5000, in 5 % Magermilch in Waschpuffer) für 2,5 h bei RT inkubiert. Zum Schluss wurde die Membran erneut gewaschen und für 1 min mit 1 ml *BM Chemiluminescent Blotting Substrat* (10 μl Lösung A + 990 μl Lösung B) inkubiert, die überschüssige Lösung entfernt und die Chemilumineszenz durch Exposition eines ECL-Films dokumentiert.

3.2.13 *Electrophoretic mobility shift assay*

Der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) ist eine Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen *in vitro* [50].

In dieser Arbeit wurde der EMSA dazu verwendet, die hergestellten Kernextrakte auf Bindeaktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B zu untersuchen. Die Transkriptionsfaktoren, die an radioaktiv markierte Oligonukleotide binden, verzögern die Wanderung des Oligonukleotids während einer nativen PAGE und erzeugen diskrete Banden. Die Auswertung des EMSA erfolgt nach Autoradiografie des getrockneten Gels.

3.2.13.1 Radioaktive Markierung des AP-1 Oligonukleotids mit Polynukleotidkinase

Bei dieser Methode erfolgt die Markierung des Oligonukleotids durch den Anhang eines radioaktiv markierten Phosphates an das 5'-Ende mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (PNK) [115]. 25 ng der komplementären, hybridisierten Oligonukleotide AP-1s und AP-1a wurden zur Markierung mit 0,005 U T4 PNK (NEBiolabs, Frankfurt) und 5 μ Ci [γ - 32 P]-ATP (Amersham-Pharmacia) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Gemisch 10 min bei 70 °C erhitzt um die PNK zu inaktivieren. Anschließend wurde die Mischung langsam auf RT abgekühlt. Durch das langsame Abkühlen bildeten die markierten Oligonukleotide Doppelstränge und es wurden Fehlpaarungen vermieden. Die Mischung wurde 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Endkonzentration des markierten Oligonukleotids betrug 250 pg/ μ l.

3.2.13.2 Radioaktive Markierung des NF- κ B Oligonukleotids mit Large Fragment DNA-Polymerase I

Hierbei werden einzelsträngige 5'-Überhänge einer doppelsträngigen DNA mit Hilfe der *Large Fragment DNA-Polymerase I* aufgefüllt, wobei wenigstens ein radioaktiv markiertes Nukleotid für die Füllreaktion eingesetzt wird [115]. 50 ng der komplementären, hybridisierten Oligonukleotide NF- κ Bs und NF- κ Ba wurden zur Markierung mit 2 U der *Large Fragment DNA-Polymerase I* (Klenow, Gibco BRL), je 50 mmol/l der Nukleotide dTTP/dCTP/dGTP (Boehringer Mannheim) und 3,8 μ Ci [α - 32 P]-ATP (Amersham-Pharmacia) 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte eine Verdünnung der Probe von 1:20 in TE. Die Endkonzentration des markierten Oligonukleotids betrug 250 pg/ μ l.

3.2.13.3 AP-1 Bindereaktion

2,5 μ g Kernextrakt wurden in einem Endvolumen von 19 μ l mit 13 μ l AP-1 Bindepuffer für 10 min bei RT inkubiert. Es wurde 1 μ l radioaktives

AP-1 Oligonukleotid dazugegeben und die Mischung weitere 15 min bei RT inkubiert.

3.2.13.4 *NF- κ B Bindereaktion*

5 μ g Kernextrakt wurden in einem Endvolumen von 18 μ l mit 2 μ l TEN 50 und 8 μ l NF- κ B Reaktionsmix für 15 min bei RT inkubiert. Es wurde 1 μ l radioaktives NF- κ B Oligonukleotid dazugegeben und die Mischung weitere 15 min bei RT inkubiert.

3.2.13.5 *EMSA*

Die Reaktionsmischungen wurden zusammen mit dem Farbmarker auf ein 4 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und die Elektrophorese in 0,25 \times TBE bei 160 V über eine Laufstrecke von 10 cm durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel für 20 min bei RT in Gelfixierlösung fixiert, um die Schärfe der Banden zu verbessern und die Empfindlichkeit leicht zu erhöhen, und im Vakuum getrocknet.

3.2.14 *AUTORADIOGRAFIE*

Mit Hilfe der Autoradiografie wurden die radioaktiv markierten Nukleinsäuren oder Proteine in Gelen und auf Membranen visualisiert und dokumentiert. Die Autoradiografie beruht auf der Schwärzung eines Röntgenfilmes durch die energiereiche Strahlung der radioaktiven Proben, indem die Silberbromidkristalle auf der Filmoberfläche erst aktiviert und beim Entwickeln zu schwarzen Silberkörnern reduziert werden. Da aktivierte Silberbromidkristalle bei tiefen Temperaturen stabilisiert werden, erfolgte die Exposition des Filmes auf dem Gel bzw. auf der Membran bei -70 °C [22, 50]. Die Filme wurden anschließend in der Entwicklermaschine M35 X-OMAT (Kodak) entwickelt.

3.3 *Immunologische Methoden*

3.3.1 *INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG*

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung lassen sich Oberflächenmoleküle auf der Zelloberfläche detektierbar machen. Antikörper, die an das zu untersuchende Molekül binden, werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekop-

pelt. In dieser Arbeit sollten mit dieser Methode die Rezeptoren CCR4, CCR7 und ICAM-1 der Lymphomzellen detektiert werden. Wurden die Zellen vor der Immunfluoreszenzfärbung mit BHK-Zellen stimuliert, erfolgte eine Köfärbung der Lymphomzellen mit dem Fluoresceinsothiocyanat (FITC) anti human HLA-DR, DQ, DP Antikörper, der die MHC Klasse II Moleküle auf der Oberfläche der Lymphomzellen erkennt. Dadurch konnten bei der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse die MHC II positiven Lymphomzellen von den humanen-MHC II negativen BHK-Zellen unterschieden werden.

10^6 Zellen wurden durch Zentrifugieren für 5 min bei RT und 250 g pelletiert. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 500 μ l PBS aufgenommen. Die Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt, die 500 μ l 2 % PBB (2 % BSA in PBS) enthielten. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden daraufhin 5 min bei 4 °C und 200–250 g zentrifugiert. Nach Zugabe des ersten Antikörpers wurden die Zellen 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, wobei die Zentrifugationsbedingungen 5 min bei 4 °C und 200–250 g betragen. Danach wurden 50 μ l einer 1:50 Verdünnung des FITC gekoppelten anti Maus Antikörpers hinzugegeben. Für den Fall, dass eine anti human MHC II-Köfärbung folgen sollte, wurde anstelle des FITC ein Phycoerythrin (PE) gekoppelter anti Maus Antikörper verwendet. Die Zellen wurden 1 h lichtgeschützt auf Eis inkubiert und anschließend einmal mit PBS (s.o.) gewaschen. Wurden die Zellen vor der Färbung durch BHK Zellen stimuliert, wurde eine 30-minütige Inkubation mit FITC gekoppelten humanen MHC II-Antikörpern lichtgeschützt auf Eis angeschlossen. Danach wurden die Zellen in 1 % Paraformaldehyd (in PBS) aufgenommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

3.3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

Die durchflusszytometrische Analyse erlaubt die Detektion einzelner Zellen, die den Fokus eines Laserstrahls passieren. Die Zellen wurden hier zuvor mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert (siehe Abschnitt 3.3.1) und mit dem FACSCalibur (FACS für *fluorescent activated cell sorting*, BD) analysiert. Die Fluorochrome wurden durch einen Argonionen-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission detektiert. Auf diese Weise konnte der Anteil fluoreszierender Zellen einer Zellpopulation

ermittelt werden. Für die Geräteeinstellungen wurden die Herstellerangaben befolgt.

3.3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Technik, mit der Proteine im Gewebe detektiert, visualisiert und lokalisiert werden können. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der IHC die Expression von CCR7 und den dazugehörigen Liganden SLC und ELC an Gefrierschnitten von primären HL Geweben untersucht werden. Gleichzeitig wurde auch die CD30 bzw. CD20 Expression untersucht, um die H/RS Zellen im CHL bzw. die *Popcorn* Zellen im NLPHL zu detektieren.

Für die IHC wurden Azeton-fixierte, 6 μm dicke, tiefgefrorene Gefrierschnitte zuerst 8 min in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Azeton, danach, um endogene Peroxidasen zu zerstören, 30 min in 0,33 % H_2O_2 , 0,02 % NaN_3 in $1\times\text{TBS}$ inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit der Materialseite auf mit $1\times\text{TBS}$ beträufelte *Coverplates* montiert und vertikal in den Färbeschlitzen eingesetzt. Zwischen Objektträger und *Coverplates* bildet sich eine Spalte, in der ein Volumen von 100 μl Flüssigkeit aufgrund von Kapillareffekten gehalten wird. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden und endogenes Avidin zu blockieren, wurden die Schnitte mit 100 μl Humanserum (HS, von der „Zentralen Dienstleistungseinrichtung für Transfusionsmedizin“ der Uni Köln), das 1 Tropfen Avidin D Block auf 250 μl enthält, für 30 min inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit 100 μl des jeweiligen primären Antikörpers (siehe Tabelle 2.4) in HS mit einem Tropfen Biotinblock pro 250 μl (über Nacht, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), wodurch endogenes Biotin blockiert wurde. Als Negativkontrolle wurden zur Spezies der primären Antikörper passende Isotypantikörper in derselben Konzentration eingesetzt. Danach wurden für 30 min 100 μl biotinylierter IgG Antikörper (1:1000 in HS) dazugegeben, der die Spezies des primären Antikörpers erkennt. Anschließend folgte eine Inkubation mit 100 μl Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HRP, 1:100 in HS) für 30 min, in der das Streptavidin an das Biotin bindet. Es wurden eine 5-minütige Inkubation mit 100 μl *Biotinyl Tyramide Working Solution* aus dem TSA Biotin Kit (1:50 in *Amplification Diluent*) und eine 30-minütige Inkubation mit 100 μl SA-HRP angeschlossen. Diese Schritte dienen zum Verstärken des Signals. Schließlich wurde die Antikörperreaktion mit dem Avidin und biotinyliertem Meerrettichperoxidase Komplex (10 μl Reagens A + 10 μl Reagens B in 1 ml HS, 100 μl , 30 min) und 200 μl AEC-Substrat als Farbstoff detektiert.

Dabei wurde das AEC durch die Peroxidase reduziert und ergab eine rostbraune Färbung. Diese Färbereaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und mit destilliertem Wasser abgestoppt. Die Zellkerne wurden daraufhin für 15 s mit Hämalaun angefärbt, mit Leitungswasser komplexiert und die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Schnitte mit $1 \times$ TBS gewaschen.

3.3.4 Enzyme-linked-immunosorbent assay

Mit Hilfe des *enzyme-linked-immunosorbent assay* (ELISA) können sich in Lösung befindende Proteine spezifisch detektiert und quantifiziert werden [11]. Mit dem hier verwendeten Antikörper-Sandwich-ELISA wurden die Chemokine MCP-1, MIP1 α und MIG in zellfreien Kulturüberständen der Lymphomzellen untersucht. Zunächst wurde eine Immuno MaxiSorp 96-Lochplatte mit 60 μ l der gegen das Chemokin spezifischen *Capture*-Antikörper-Verdünnung (in 0,02 % NaN₃ in PBS) über Nacht beschichtet und anschließend mit 100 μ l Blockierungspuffer (0,02 % NaN₃, 0,05 % TWEEN 20, 0,5 % BSA in PBS) 1 h blockiert. Es folgte eine Inkubation mit 50 μ l zellfreier Überstände bzw. einem spezifischen Chemokinstandard für 6 h. An das Chemokin hat in einer weiteren über-Nacht-Inkubation der spezifische Detektionsantikörper (50 μ l, Blockierungspuffer) gebunden. Es folgte eine 2-stündige Inkubation, in der ein gegen die Spezies des zweiten Antikörpers gerichteter, Peroxidase gekoppelter Antikörper (50 μ l, 0,05 % TWEEN 20, 0,5 % BSA in PBS) an den zweiten Antikörper bindet. Nach Zugabe von ABTS-Substrat wurde dieses durch die Peroxidase umgesetzt und es entstand ein Farbumschlag nach grün, der im Spektralphotometer (Tecan) bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm quantifiziert wurde. Nach dem Blockieren und allen weiteren Schritten wurde die Platte $4 \times$ für je 30 s mit 0,05 % TWEEN 20 in PBS gewaschen.

Die Chemokine IP-10 und RANTES wurden mit dem jeweiligen *DuoSet ELISA Development System* nach dem Protokoll des Herstellers quantifiziert, die beide nach dem oben beschriebenen Prinzip funktionieren. Das verwendete Substrat ergibt eine gelbe Färbung, die bei einer Wellenlänge von 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 540 nm quantifiziert wurde.

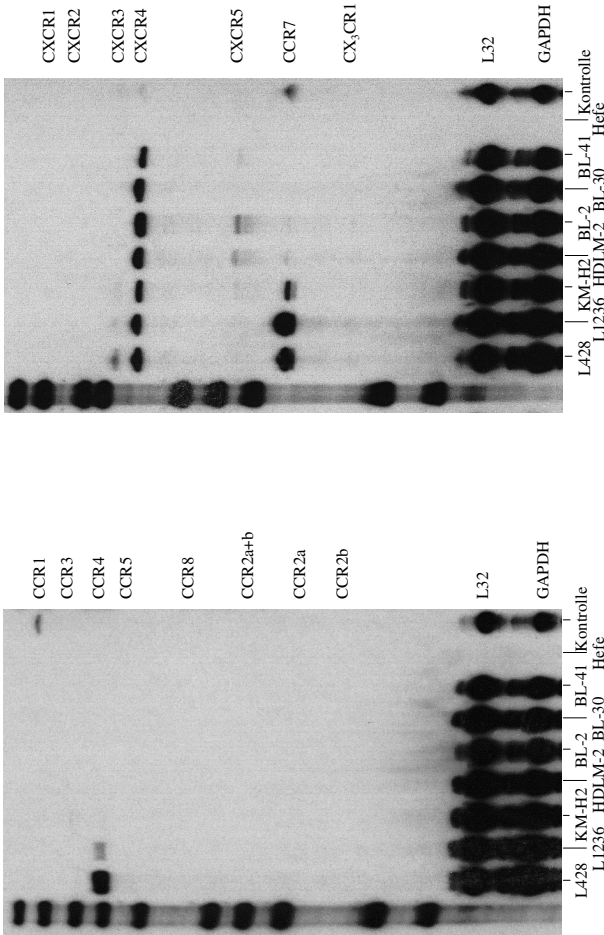
Ergebnisse

4.1 Expression von Chemokinrezeptoren und Chemokinen in Lymphomen

4.1.1 CHEMOKINREZEPTOR EXPRESSION IN HODGKIN UND BURKITT LYMPHOMZELLEN

Mit Hilfe des *RNase protection assays* (RPA) wurde die Chemokinrezeptor Expression der HL Zelllinien L428, L1236, KM-H2 und HDLM-2 auf mRNA Ebene untersucht und mit der Chemokinrezeptor Expression in den BL Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Die mRNA Expression der CC-Rezeptor-Familie in den HL Zelllinien unterscheidet sich zum Teil erheblich von der Expression in den BL Zelllinien. Eine deutliche CCR4 mRNA Expression konnte in den L428-Zellen nachgewiesen werden, eine sehr schwache in den L1236-Zellen (Abbildung 4.1(a)). Die beiden Zelllinien zeigten zudem eine starke mRNA Expression für CCR7. In den KM-H2-Zellen konnte eine schwache CCR7 Expression beobachtet werden (Abbildung 4.1(b)). Die mRNA der untersuchten CC-Rezeptoren war weder in den HDLM-2-Zellen noch in den analysierten BL Zelllinien nachweisbar. In Bezug auf die Expression der CXC-Rezeptor-Familie unterschieden sich die HL und BL Zelllinien offensichtlich nicht. Alle Zelllinien exprimierten ähnlich starke Mengen an CXCR4 mRNA (siehe Abbildung 4.1(b)). Eine geringe Expression für CXCR3 mRNA wurde in L428-Zellen gefunden. Ebenso schwach war die mRNA Expression von CXCR5 in HDLM-2- und BL-2-Zellen. Die übrigen getesteten Chemokinrezeptoren wurden in den Zelllinien nicht exprimiert. Anhand der in menschlichen Zellen konstitutiv exprimierten mRNAs, die für L32 und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) kodieren, kann man erkennen, dass einheitliche RNA Mengen eingesetzt wurden.

Die auf mRNA Ebene differentiell exprimierten Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR7 wurden auf der Oberfläche der HL und BL Zelllinien mittels der indirekten Immunfluoreszenzfärbung detektiert und mit Hilfe der



(a) Multi-Probe Template Set hCR-5

(b) Multi-Probe Template Set hCR-6

Abbildung 4.1: *RNAse protection assay* für Chemokinrezeptoren von HL und BL Zelllinien. Die analysierten Zelllinien sind unter der jeweiligen Spur, die untersuchten Chemokinrezeptoren rechts neben den Abbildungen aufgeführt. Hefe-rRNA wurde in beiden RPAs als Negativkontrolle eingesetzt. Die beiden konstitutiv exprimierten Genprodukte L32 und GAPDH dienen zum Mengenabgleich. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen.

Tabelle 4.1: Übersicht über die chemotaktische Reaktion von L428-Zellen auf unterschiedliche Chemokine. Positiv bedeutet, dass die L428-Zellen auf das entsprechende Chemokin mit chemotaktischer Bewegung reagierten, negativ bedeutet, dass in den L428-Zellen keine Chemotaxis als Reaktion auf das Chemokin nachgewiesen werden konnte.

Chemokin	TARC	ELC	SLC	IP-10	SDF-1 α
Chemotaxis	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv

Durchflusszytometrie analysiert. In Übereinstimmung mit den RNA Daten zeigt Abbildung 4.2 eine eindeutige Oberflächenexpression von CCR7 auf den HL Zelllinien L428 und L1236, eine schwächere Expression auf KM-H2-Zellen und keine Expression auf der HDLM-2-Linie und den BL Zelllinien. Die Histogramme für die CCR4-Analyse zeigen, dass dieser Rezeptor nur auf der Oberfläche von L428-Zellen detektiert werden konnte.

4.1.2 FUNKTIONALITÄT DER CHEMOKINREZEPTOREN VON HODGKIN UND BURKITT LYMPHOMZELLEN

Die Funktionalität der detektierten Chemokinrezeptoren wurde mit dem Chemotaxisassay untersucht. Da vorangegangene Versuche gezeigt haben, dass die HL Zelllinie L428 die meisten Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimiert, diente sie zur Etablierung dieses Versuchs. Es wurden die Chemokine getestet, deren Rezeptoren auf mRNA Ebene bzw. auf der Zelloberfläche nachgewiesen wurden: TARC, ein Ligand für CCR4, ELC und SLC, die Liganden für CCR7, IP-10, ein Ligand für CXCR3 und SDF-1 α , ein Ligand für CXCR4. In Tabelle 4.1 ist zusammengefasst, wie die L428-Zellen auf die unterschiedlichen Chemokine reagierten. Die Chemokine ELC, SLC und SDF-1 α bewirkten eine Chemotaxis in den L428-Zellen. Für TARC und IP-10 konnte in L428-Zellen keine chemotaktische Reaktion nachgewiesen werden. Mit den Chemokinen, die in L428-Zellen Chemotaxis auslösten und deren Rezeptoren auch auf den anderen Lymphomzellen detektiert worden waren, wurde der Versuch mit Ausnahme von BL-30 bei allen Lymphomzellen durchgeführt. In Abbildung 4.3 sind die Migrationsraten der einzelnen Zelllinien nach Stimulation mit dem jeweiligen Chemokin grafisch dargestellt. Wie schon im Vorversuch reagierte die Zelllinie L428 auf die Stimulation mit den Chemokinen ELC, SLC und SDF-1 α mit chemotaktischer Bewegung. Durch ELC wurde die höchste Migrationsrate (15,7%) erreicht, wobei hier

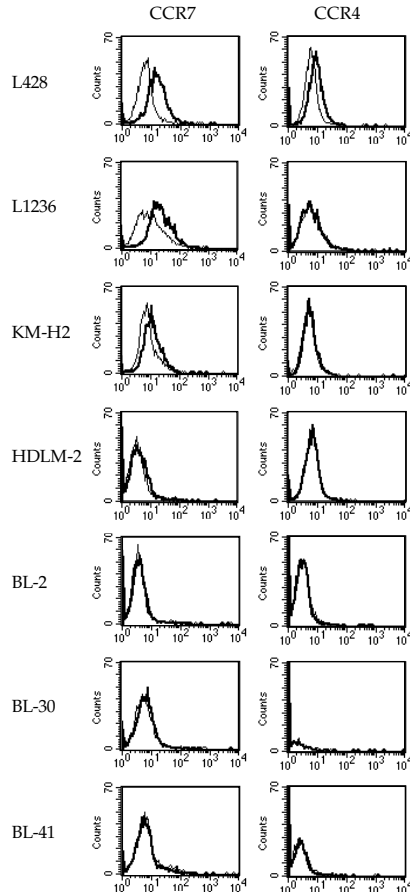


Abbildung 4.2: Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der links aufgeführten HL und BL Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung für CCR7 und CCR4. Auf der Abzisse ist die Fluoreszenzintensität, auf der Ordinate die Häufigkeit der Zellen aufgeführt. Die Rezeptorfärbung wird durch die dicken Linien dargestellt, die Färbung mit der Isotypkontrolle durch die dünnen Linien. Eine Verschiebung der Verteilung zu höheren Fluoreszenzintensitäten lässt eine positive Rezeptorfärbung erkennen. Die dargestellten Histogramme repräsentieren die Ergebnisse von bis zu vier unabhängigen Versuchswiederholungen.

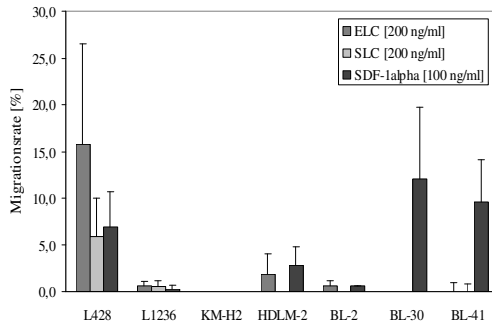


Abbildung 4.3: Grafische Darstellung der Migrationsraten von HL- und BL-Zellen im Chemotaxisassay. Die Migrationsrate lässt sich aus dem prozentualen Anteil der Zellen, die nach 4 h Migrationszeit durch die Poren der Membran zum Chemokin gewandert sind, ableiten. Nach Abzug der Zellen, die aufgrund von Medium migriert sind, erhält man die Migrationsrate. Diese kann der Ordinate entnommen werden. Die Zellen sind jeweils unter den dazugehörigen Balken aufgeführt. Mit der Zelllinie BL-30 wurde der Versuch mit dem Chemokin ELC nicht durchgeführt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei bzw. vier unabhängigen Versuchen mit ein- bis vierfach Bestimmungen.

allerdings der statistische Fehler mit ($\pm 10,8\%$) sehr hoch war. Auf SLC und SDF-1 α reagierten 5,9 ($\pm 4,1$) bzw. 6,9% ($\pm 3,8\%$) der L428-Zellen positiv chemotaktisch. In den HL Zelllinien L1236 und KM-H2 und in der BL Zelllinien BL-2 wurde keine nennenswerte Chemotaxis beobachtet. Die HL Zelllinie HDLM-2 reagierte schwach auf SDF-1 α Stimulation (2,8% ($\pm 2,0\%$)) und schwach auf ELC Stimulation (1,9% ($\pm 2,1\%$)). Der Betrag des Fehlers war hier größer als der ausgelöste Effekt. Für SLC konnte keine Reaktion in den HDLM-2-Zellen nachgewiesen werden. 12% ($\pm 7,8\%$) der BL-30-Zellen reagierten auf SDF-1 α Stimulation mit Chemotaxis. Für SLC konnte in den BL-30-Zellen keine Chemotaxis beobachtet werden. BL-41-Zellen migrierten deutlich auf SDF-1 α Stimulation bei einer Migrationsrate von 9,6% ($\pm 4,6\%$), nicht aber auf ELC und SLC Stimulation. Insgesamt wird deutlich, dass die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 in den Zelllinien L428, BL-30 und BL-41 funktionell aktiv waren, sofern sie exprimiert wurden, während das in den Zelllinien L1236, KM-H2, HDLM-2 und BL-2 nicht der Fall war.

Tabelle 4.2: Übersicht über die Ergebnisse der IHC-Färbung für CCR7, SLC und ELC an HL Gefrierschnitten. „+“ bedeutet, dass das untersuchte Molekül in den H/RS Zellen detektiert werden konnte, „-“ bedeutet, dass die primären H/RS Zellen für das Molekül nicht angefärbt werden konnten. Die CCR7 Färbung des Falles 5 konnte aufgrund von schlechtem Schnittmaterial nicht ausgewertet werden (n.a.). Bei den Färbungen von Fall 8 war ebenfalls eine Auswertung nicht möglich.

Fall-Nr.	Subtyp	CCR7	SLC	ELC
1	NSHL	+	+	-
2	NSHL	-	+	+
3	Rezidiv, CHL	-	+	-
4	Rezidiv, CHL	+	+	-
5	Rezidiv, CHL	n.a.	+	-
6	Rezidiv, CHL	-	-	-
7	Rezidiv, CHL	-	+	-
8	NLPHL	n.a.	n.a.	n.a.
9	NLPHL	-	-	-

4.1.3 EXPRESSION VON CCR7 UND SEINEN LIGANDEN SLC UND ELC IN PRIMÄREN HODGKIN/REED-STERNBERG ZELLEN

An Gefrierschnitten von primären Hodgkin Lymphomgeweben wurde untersucht, ob der Chemokinrezeptor CCR7 und seine Liganden SLC und ELC von primären H/RS Zellen exprimiert werden. Dazu wurden HL Gefrierschnitte immunhistochemisch angefärbt. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der Färbungen wiedergegeben.

Eine CCR7 Expression konnte in zwei Fällen des CHL, Fall 1 und 4, in den primären H/RS Zellen nachgewiesen werden. In den übrigen Fällen konnten keine CCR7 positiven H/RS Zellen detektiert werden. In beiden NSHL Fällen sowie in vier von fünf Rezidiven konnte eine SLC Expression in den primären H/RS Zellen gefunden wurde. Die IHC für ELC ergab, dass bis auf Fall 2 alle primären H/RS Zellen ELC-negativ waren. Das NLPHL von Fall 8 konnte nach erfolgter Färbung nicht ausgewertet werden, da keine *Popcorn* Zellen detektiert werden konnten. Es wurde daher eine CD20-Färbung zum Nachweis der *Popcorn* Zellen durchgeführt. Die mikroskopische Begutachtung der CD20-Färbungen unter Zuhilfenahme von CD20-Originalfärbungen aus dem Institut für Pathologie der Universität Köln ergab, dass in diesem Fall nur

vereinzelte *Popcorn* Zellen vorhanden waren und diese in den IHC-gefärbten Gefrierschnitten nicht wiedergefunden werden konnten. Abbildung 4.4 zeigt Aufnahmen der primären HL Gewebeschnitte nach immunhistochemischer Färbung. Die CD30 positive H/RS Zellpopulation im CHL (Abbildung 4.4 (a) linke Bildhälfte) ist weitgehend CCR7 positiv (rechte Bildhälfte). In Abbildung 4.4 (b) ist eine Detailaufnahme CCR7 positiver H/RS Zellen wiedergegeben. Die Pfeilspitzen zeigen auf zwei H/RS Zellen, deren Zytoplasma für CCR7 braun angefärbt ist. Ein Ausschnitt der SLC-Färbung von Fall 1 ist in Abbildung 4.4 (c) abgebildet. Die Pfeilspitze markiert dabei eine H/RS Zelle, deren Zytoplasma SLC enthält, erkennbar an der rotbraunen Färbung. Die Aufnahme der ELC-Färbung zu Fall 4 zeigt zwei H/RS Zellen mit ihren großen, im Vergleich zu den sie umgebenden Zellen etwas blasser angefärbten Zellkernen und dem farblosen Zytoplasma (Abbildung 4.4 (d)). Sezerniertes ELC konnte in den Zwischenräumen des Infiltrates durch die braune Färbung nachgewiesen werden. In Abbildung 4.4 (e) erkennt man deutlich eine *Popcorn* Zelle im NLPHL, die für den Marker CD20 positiv angefärbt ist. Anhand der CD20-Färbung kann man auch die B-Lymphozyten im Infiltrat ausfindig machen. Sie sind im Lymphknoten verteilt, befinden sich aber nicht in unmittelbarer Nachbarschaft der *Popcorn* Zellen. Es zeigt sich, dass die *Popcorn* Zellen im NLPHL weder CCR7, SLC noch ELC exprimierten, da sie für die jeweiligen Moleküle nicht immunhistochemisch angefärbt werden konnten (Abbildung 4.4 (f)–(h)).

4.1.4 CHEMOKIN EXPRESSION IN HODGKIN UND BURKITT LYMPHOMZELLEN

Neben dem Chemokinrezeptor Expressionsmuster wurde auch das Chemokin Expressionsmuster in den Lymphomzellen untersucht. Zunächst wurde die Chemokin Expression der HL Zelllinien L428, L1236, KM-H2 und HDLM-2 sowie der BL Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 auf mRNA Ebene analysiert. Dazu wurden *RNase protection assays* mit den *Multi-Probe Template Sets* hCK-5 und hCK-9 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt. In den HL Zelllinien L428 und KM-H2 war eine sehr starke und in den L1236-Zellen eine schwache mRNA Expression für RANTES vorhanden (Abbildung 4.5(a)). Auch IP-10 mRNA ist in diesen drei Zelllinien zu finden. Die Zelllinien L1236 und KM-H2 zeigen eine starke und L428-Zellen eine schwache Expression von IP-10. Ebenfalls konnte mRNA für I-309 in L428-Zellen und mRNA für MIP-1 α und MCP-1 in L1236-Zellen detektiert werden. Die untersuchten BL Zelllinien wiesen jedoch keine mRNA für die getesteten

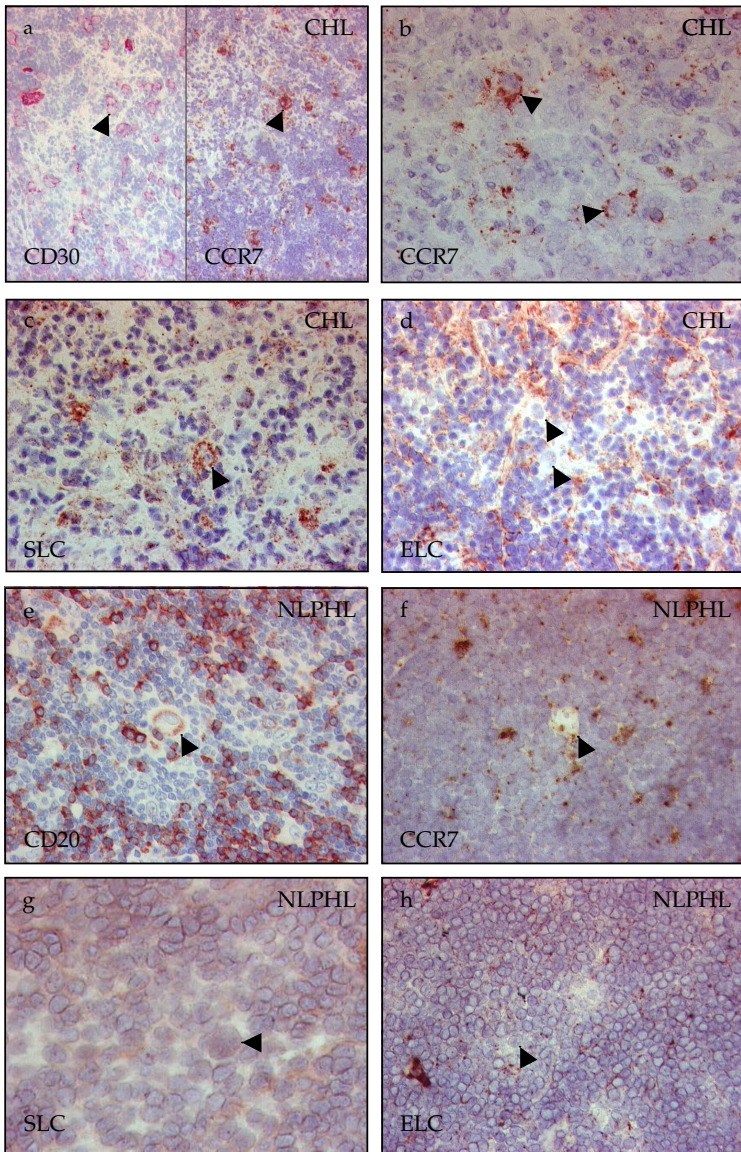


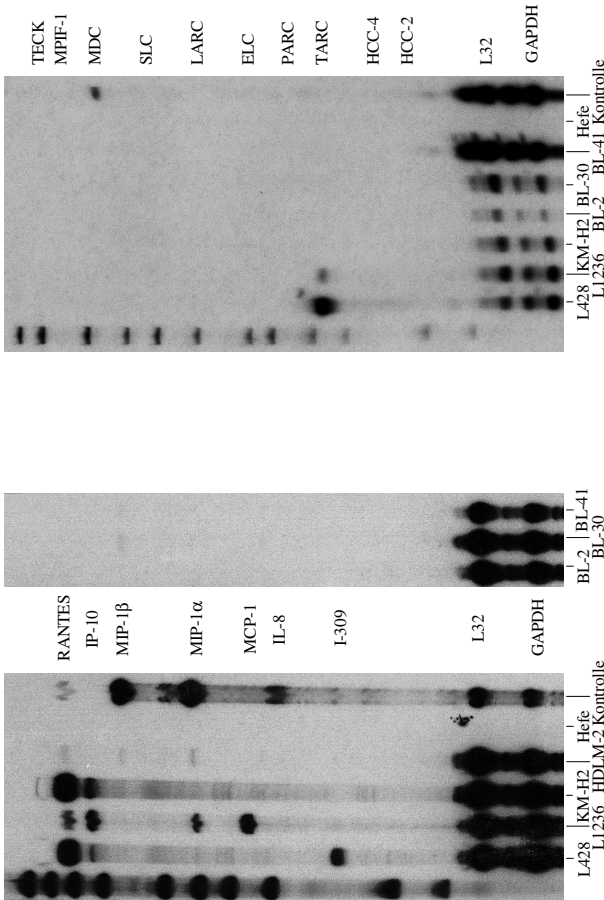
Abbildung 4.4: Gegenüberliegende Seite: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen von Gefrierschnitten aus primären HL Geweben. In den Abbildungen (a)–(d) sind CHL abgebildet, in den Abbildungen (e)–(h) ein NLPHL. (a) Übersichtsaufnahme von Fall 4. Die H/RS Zellen erscheinen als große, unregelmäßig konfigurierte, durch die CD30-Färbung rot markierte Zellen (linke Bildhälfte). Die rostbraune Färbung in der rechten Bildhälfte kennzeichnet eine positive CCR7-Färbung. (b) Detailaufnahme der CCR7-Färbung zu Fall 1. (c) Detailaufnahme der SLC-Färbung (rostbraun) zu Fall 1. (d) Detailaufnahme der ELC-Färbung von Fall 4. (e) Detailaufnahme von Fall 9. Die *Popcorn* Zelle ist an ihrem großen Kern zu erkennen, die Zellmembran ist für CD20 braun angefärbt. (f) Detailaufnahme der CCR7-Färbung von Fall 9. (g) Detailaufnahme der SLC-Färbung von Fall 9. (h) Detailaufnahme von Fall 9 für die ELC-Färbung. Die Pfeilspitzen markieren jeweils repräsentative H/RS bzw. *Popcorn* Zellen. Die Zellkerne aller Zellen sind durch Hämalaun blau gefärbt.

Chemokine auf. Ebenso verhält es sich für die HL Zelllinie HDLM-2. Die einheitliche Expression der konstitutiv exprimierten mRNAs für L32 und GAPDH zeigt den Auftrag gleicher RNA Mengen. Von den mit dem *Template Set* hCK-9 untersuchten Chemokinen wurde nur TARC stark von L428-Zellen und sehr schwach von L1236-Zellen exprimiert (Abbildung 4.5(b)). Die Zelllinie HDLM-2 wurde mit diesem *Template Set* nicht untersucht.

Auf Proteinebene wurde anschließend die Chemokin Expression mit Hilfe des ELISAs überprüft. Dafür wurden zellfreie 24 h-Überstände auf die Anwesenheit der Chemokine RANTES, IP-10, MIP-1 α , MCP-1 und Mig untersucht. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Tabelle 4.3 wiedergegeben. In Abbildung 4.6 sind die Ergebnisse des IP-10- und des RANTES ELISAs quantitativ dargestellt. Die höchste Chemokinproduktion konnte mit circa 2,8 ng/ml IP-10 in den L1236-Zellen beobachtet werden. Die KM-H2-Zellen sezernier-

Tabelle 4.3: Übersicht über die ELISA-Ergebnisse der Chemokin Expression in HL und BL Zellen. „+“ bedeutet, dass im 24 h-Überstand der Lymphomzellen das jeweilige Chemokin enthalten war, „-“ bedeutet, dass das Chemokin in den Überständen der Lymphomzellen nicht nachgewiesen werden konnte.

Chemokin	L428	L1236	KM-H2	HDLM-2	BL-2	BL-30	BL-41
IP-10	-	+	+	-	-	-	-
RANTES	+	+	+	-	-	-	-
MIP-1 α	-	+	-	-	-	-	-
MCP-1	-	+	-	-	-	-	-
Mig	-	-	-	-	-	-	-



(b) Multi-Probe Template Set hCK-9

(a) Multi-Probe Template Set hCK-5

Abbildung 4.5: *RNase protection assay* für Chemokine von HL und BL Zelllinien. Die analysierten Zelllinien sind unter der jeweiligen Spur, die untersuchten Chemokine neben den Abbildungen aufgeführt. Hefe-tRNA wurde in beiden RPA als Negativkontrolle eingesetzt. Die beiden konstitutiv exprimierten Genprodukte L32 und GAPDH dienten zum Mengenabgleich. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei (a) bzw. zwei (b) unabhängigen Versuchsdurchführungen.

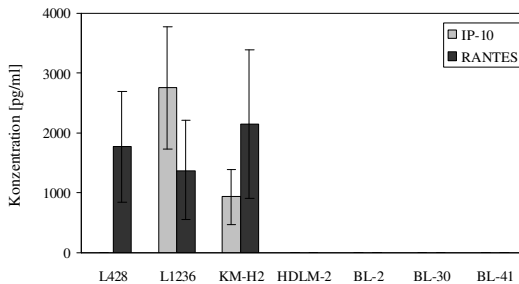


Abbildung 4.6: Grafische Darstellung der IP-10- und RANTES Konzentrationen in zellfreien 24 h-Überständen der HL und BL Zellen. Die Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Zelllinien sind unter der Grafik aufgeführt. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf Experimenten mit Doppelbestimmung für IP-10, von drei Experimenten mit Doppelbestimmung für RANTES.

ten mit circa 0,9 ng/ml deutlich weniger IP-10. Die anderen Zellüberstände waren negativ für IP-10. Die Zellen L428, L1236 und KM-H2 produzierten im Mittel ungefähr 1,8, 1,4 bzw. 2,1 ng/ml RANTES. Allerdings ergaben sich hier in drei unabhängig durchgeführten Experimenten höhere Abweichungen. Eine MIP-1 α und MCP-1 Produktion wurde nur in der Zelllinie L1236 beobachtet. Das Chemokin Mig konnte in den Überständen der untersuchten Zelllinien nicht nachgewiesen werden. In den Überständen der Zelllinien HDLM-2, BL-2, BL-30 und BL-41 konnte keines der getesteten Chemokine nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Chemokinuntersuchung auf Proteinebene stimmen mit den Ergebnissen der mRNA Chemokin Expression überein. Lediglich in L428-Zellen konnte trotz geringer mRNA Expression kein IP-10 im Überstand nachgewiesen werden.

4.2 Einfluss der CD40L/CD40 Wechselwirkung auf die Expression der Chemokine und der Chemokinrezeptoren

4.2.1 CHEMOKIN EXPRESSION IN LYMPHOMZELLEN NACH STIMULATION MIT CD40L

Aufgrund der physiologischen Nähe von CD40 exprimierenden H/RS Zellen und CD40L exprimierenden CD4+ T-Lymphozyten in HL Geweben wurde untersucht, ob eine in vitro Stimulation der Lymphomzellen mit CD40L einen

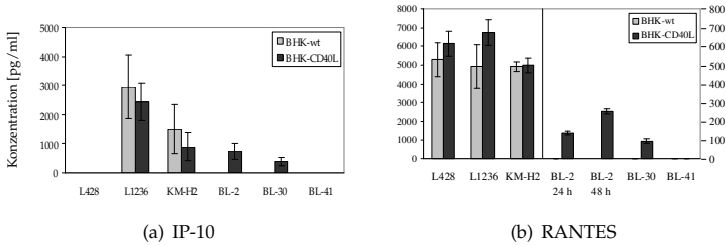


Abbildung 4.7: Grafische Darstellung der (a) IP-10- und (b) RANTES Konzentrationen in zellfreien Überständen von HL und BL Zelllinien nach 24-stündiger Stimulation mit BHK-CD40L bzw. BHK-wt Zellen. Für BL-2 wurde auch nach einer 48-stündigen Stimulation die RANTES Konzentration ermittelt. Die Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Zelllinien sind unter der Grafik aufgeführt. Die RANTES Konzentration der BL Zellüberstände ist mit einer 10fach größeren Skala dargestellt als die Konzentrationen der übrigen Zellüberstände. Die IP-10 Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei bis sieben Versuchsdurchführungen wiedergegeben. Die RANTES Ergebnisse für die BL-2-Zellen repräsentieren eines von vier Experimenten, für die übrigen Zelllinien wurde der Versuch ein bis zweimal durchgeführt. In allen Versuchen wurden Doppelbestimmungen vorgenommen.

Einfluss auf die Expression der Chemokine in diesen Zellen hat. Dies wurde anhand der Chemokine IP-10 und RANTES getestet, da diese in den Überständen von zwei oder mehr HL Zelllinien gefunden wurden. Die HL Zelllinien L428, L1236 und KM-H2 sowie die BL Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 wurden 24 h mit BHK-CD40L Zellen bzw. BHK-wt Zellen stimuliert und die danach präparierten zellfreien Überstände mittels ELISA für IP-10 und RANTES analysiert. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 4.7 grafisch dargestellt. Die IP-10 Expression in den HL Zellen und der Zelllinie BL-41 wurde durch die CD40 Stimulation nicht verändert. In den Überständen der L428- und BL-41-Zellen konnte weder nach BHK-wt noch nach BHK-CD40L Stimulation IP-10 nachgewiesen werden. Die Sensitivitätsgrenze des verwendeten IP-10 ELISAs lag bei etwa 0,08 ng/ml. Die IP-10 Konzentrationen in den Überständen der Zelllinien L1236 und KM-H2 änderten sich durch die CD40 Stimulation nicht erheblich. In den BL Zelllinien BL-2 und BL-30 wurde jedoch eine deutliche Induktion der IP-10 Produktion durch CD40L beobachtet. Während in den Überständen beider Zelllinien nach BHK-wt Stimulation kein IP-10 nachgewiesen werden konnte, enthielten die Über-

stände der Zelllinien nach BHK-CD40L Stimulation ungefähr 0,7 ng/ml bzw. 0,4 ng/ml IP-10. Ein ähnliches Ergebnis wurde im RANTES ELISA erhalten (siehe Abbildung 4.7(b)). Die Stimulation mit CD40L führte in den HL Zelllinien zu keiner bedeutsamen Veränderung der RANTES Expression. Die BL Zellen BL-2 und BL-30 wurden durch CD40L zu einer schwachen RANTES Expression angeregt, die in BL-2-Zellen durch eine 48 h Stimulation gesteigert werden konnte. In den Überständen der BL-41-Zellen wurde weder nach BHK-wt noch nach BHK-CD40L Stimulation RANTES nachgewiesen.

4.2.2 IP-10 UND RANTES EXPRESSION DER EBV-POSITIVEN BURKITT LYMPHOMZELLEN

In den BL Zelllinien BL-2 und BL-30 konnte über eine CD40 Stimulation die IP-10 Produktion und sehr schwach die RANTES Produktion induziert werden. Da sich die Signaltransduktionswege von CD40 und LMP1 kreuzen, war von Interesse, ob IP-10 und RANTES in den EBV-positiven BL Zelllinien nachweisbar sind. Dazu wurden 24 h-Überstände der LMP1 positiven Zellen BL-2 B95-8, BL-30 B95-8 und BL-41 B95-8 sowie die Überstände der entsprechenden EBNA-2 und somit LMP1 negativen Zelllinien BL-2 P3HR-1, BL-30 P3HR-1 und BL-41 P3HR-1 mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse der ELISAs sind im linken Teil der Abbildung 4.8 grafisch dargestellt. IP-10 wurde in den Überständen der beiden LMP1 exprimierenden Zelllinien BL-2 B95-8 und BL-30 B95-8, nicht aber in denen der LMP1 exprimierenden Zelllinie BL-41 B95-8 und der LMP1 negativen Zelllinien BL-2 P3HR-1, BL-30 P3HR-1 und BL-41 P3HR-1 gefunden. RANTES wurde durch alle drei LMP1-positiven BL Zellen produziert, konnte aber in den Überständen der LMP1 negativen BL Zellen nicht detektiert werden.

Anhand der BL-2 B95-8-Zellen wurde gezeigt, dass durch eine CD40 Stimulation die IP-10 und RANTES Expression in den LMP1 positiven BL-2-Zellen noch gesteigert werden konnte (siehe Abbildung 4.8(b)).

4.2.3 INHIBITION DER INDUZIERTEN IP-10 UND RANTES EXPRESSION

In dendritischen Zellen und in B-Lymphozyten führt die CD40 Stimulation zu einer Aktivierung der p38 MAP-Kinase [3,35]. Um herauszufinden, ob an der CD40 vermittelten IP-10 und RANTES Expression in BL-2-Zellen die p38 MAP-Kinase beteiligt ist, wurden diese Zellen für 2 h mit dem p38 MAP-Kinase Inhibitor SB 202190 inkubiert, bevor sie für 24 h mit BHK-Zellen

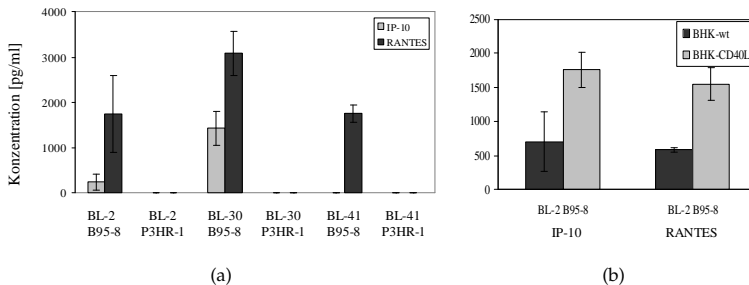


Abbildung 4.8: Grafische Darstellung der IP-10 und RANTES Expression in EBV-positiven BL Zellen. Zellfreie 24 h-Überstände wurden mittels ELISA auf IP-10 und RANTES Expression untersucht (linker Teil des Diagramms). Die Zellen sind unter der Grafik aufgeführt. Im rechten Teil der Abbildung sind die Ergebnisse von IP-10 und RANTES ELISA mit den Überständen von BL-2 B95-8 nach 24-stündiger Stimulation mit BHK-CD40L bzw. BHK-wt Zellen wiedergegeben. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von bis zu drei Experimenten in Doppelbestimmungen.

stimuliert wurden. In den zellfreien Überständen wurden anschließend die IP-10 und RANTES Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 4.9 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Die CD40L vermittelte Induktion der IP-10 Produktion konnte durch den p38 MAP-Kinase Inhibitor um circa 50 % gehemmt werden. Der Inhibitor hatte allerdings keinen Effekt auf die CD40L induzierte RANTES Expression.

4.2.4 INTERFERON REGULIERENDE FAKTOREN

Die HL Zelllinien L428, L1236, KM-H2 und HDLM-2 sowie die BL Zelllinie BL-2 wurden mit Hilfe des *Western Blots* auf die Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren IRF-1, IRF-3 und IRF-7 untersucht (siehe Abbildung 4.10). Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wird stark in der Zelllinie L428 und schwächer in den Zelllinien KM-H2 und HDLM-2 exprimiert. Während in den L1236-Zellen nur sehr wenig und in der BL-2 Zelllinie kein IRF-1 gefunden wurde, wurde IRF-3 in unterschiedlichen Mengen in allen untersuchten Zellen exprimiert. Die L428 und L1236 Zelllinien zeigten dabei eine starke IRF-3 Expression, wohingegen KM-H2, HDLM-2 und BL-2-Zellen nur schwach positiv für IRF-3 waren. HeLa Zellen dienten als IRF-3-Positivkontrolle. Das Expressionsmuster von IRF-7 der untersuchten Zellen stellt sich folgendermaßen dar:

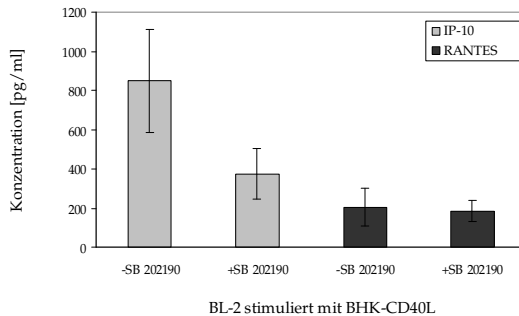


Abbildung 4.9: Grafische Darstellung der IP-10 und RANTES Konzentrationen in zellfreien Überständen der BL Zelllinie BL-2 nach Stimulation mit BHK-CD40L Zellen und vorangegangener Inhibition mit dem p38 MAP-Kinase Inhibitor SB 202190. Die Konzentration der Chemokine wurde mittels ELISA ermittelt. „+SB 202190“ bedeutet, dass die BL-2-Zellen vor der Stimulation durch die BHK-CD40L Zellen für 2 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ SB 202190 behandelt worden sind, „-SB 202190“ bedeutet, dass die BL-2-Zellen vor der 24-stündigen Stimulation durch die BHK-CD40L Zellen für 2 h zur Kontrolle in reinem Medium inkubiert worden sind. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei bis drei Experimenten mit jeweiliger Doppelbestimmung.

In den L428- und BL-2-Zellen wurden kein IRF-7 gefunden, eine deutliche IRF-7 Expression war in den Zellen L1236 und KM-H2, eine schwächere in HDLM-2 nachweisbar. Alle drei Zelllinien zeigten auch die 23 kDa kleine Spleißvariante IRF-7C. Als Negativkontrolle dienten Jurkatzellen, als Positivkontrolle Jurkatzellen nach IFN- γ Behandlung. Es wurde weiter untersucht, ob in der BL Zelllinie BL-2 die Expression des Transkriptionsfaktors IRF-7 durch Stimulation mit CD40L heraufreguliert werden kann. Der *Western Blot* ist in Abbildung 4.11 abgebildet. Es wurde keine Induktion von IRF-7 durch BHK-CD40L Zellen in den BL-2-Zellen hervorgerufen. Die IRF-7C Banden, die auf dem *Western Blot* zu sehen sind, stammen von den BHK-Zellen, mit deren Hamster-IRF-7 der Antikörper offenbar kreuzreagiert (siehe Abbildung 4.11 rechts).

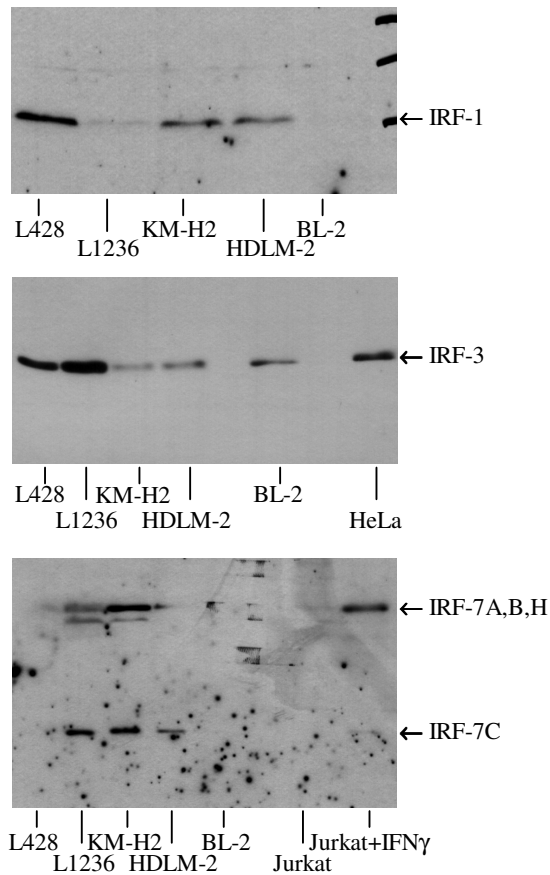


Abbildung 4.10: Expression der Transkriptionsfaktoren IRF-1 (oben), IRF-3 (Mitte) und IRF-7 (unten). Es wurden Ganzzellextrakte der HL und BL-2-Zellen hergestellt und diese im *Western Blot* untersucht. Die Zellen sind jeweils unter den Abbildungen aufgeführt, die Transkriptionsfaktoren neben den Abbildungen auf Höhe der entsprechenden Banden. Bei dem IRF-3 *Western Blot* dienten HeLa Extrakte als Positivkontrolle. Im IRF-7 *Western Blot* wurden Jurkat-Zellen, in denen die IRF-7 Expression durch eine 8-stündige Behandlung mit 500 U/ml IFN- γ induziert wurde, als Positivkontrolle und unbehandelte Jurkat-Zellen als Negativkontrolle eingesetzt. Die abgebildeten *Western Blots* sind repräsentativ für dreimalige (IRF-1), einmalige (IRF-3) und zweimalige (IRF-7) Versuchsdurchführungen.

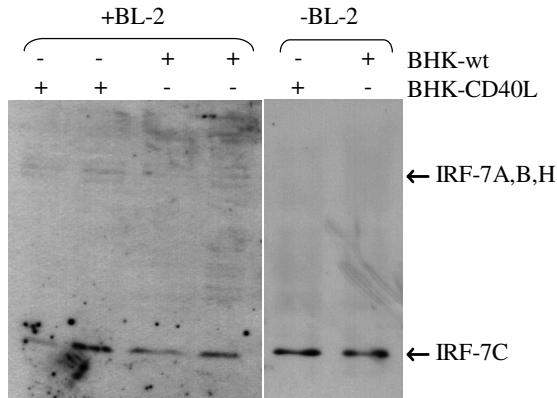


Abbildung 4.11: Einfluss der CD40 Stimulation auf die Expression von IRF-7 in BL-2 Zellen. Nach 24-stündiger Stimulation der BL-2-Zellen mit BHK-CD40L und BHK-wt Zellen wurden Zellkernextrakte nach Schreiber et al. präpariert und die IRF-7 Expression im *Western Blot* analysiert. Von BHK-Zellen alleine wurden ebenfalls Kernextrakte hergestellt und diese auf IRF-7 Expression getestet. „+“ bedeutet, dass die jeweiligen Zellen im Extrakt enthalten sind, „-“ bedeutet, dass die entsprechenden Zellen nicht im Extrakt enthalten sind. Die IRF-7 Banden sind seitlich neben der Abbildung markiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer Stichprobe mit doppeltem bzw. dreifachem Ansatz.

4.2.5 EINFLUSS VON CD40L AUF DIE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NF- κ B UND AP-1

Die Zellen L428, L1236 und BL-2 wurden nach 2-stündiger Stimulation mit BHK-CD40L bzw. BHK-wt Zellen auf die Bindeaktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B mittels *electrophoretic mobility shift assay* untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.12 und 4.13 wiedergegeben. In den Zelllinien L428 und L1236 sind die beiden Transkriptionsfaktoren konstitutiv aktiv (jeweils Spur 4 bzw. 7). Beim Vergleich der Signale nach Stimulation mit BHK-CD40L (Spur 2) mit den Signalen nach Stimulation mit BHK-wt Kontrolle (Spur 3) erkennt man, dass sich in den L428-Zellen die Bindeaktivität beider Transkriptionsfaktoren durch die CD40 Stimulation nicht verändert hat. Auffallend ist, dass in der Mediumkontrolle (Spur 4) ein stärkeres Signal für AP-1 vorhanden ist als nach der Stimulation mit BHK Zellen (Spuren 2 und 3). In den L1236-Zellen sind die Signale für AP-1 gleichmäßig stark (Abbildung 4.12, Spuren 5 bis 7). Somit hatte die CD40 Stimulation auch in

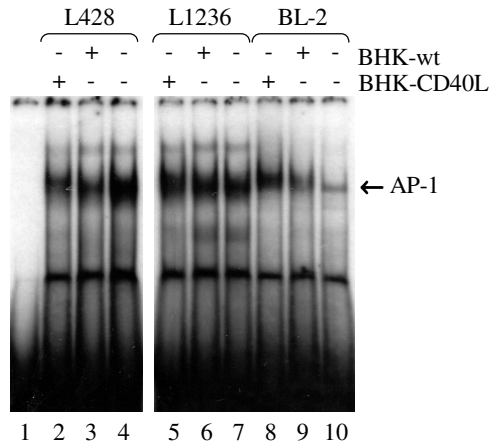


Abbildung 4.12: EMSA mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 und den Lymphomzelllinien L428, L1236 und BL-2. Nach 2-stündiger Stimulation mit BHK-CD40L Zellen, BHK-wt Zellen oder reinem Medium wurden Zellkernextrakte nach DiGnam et al. präpariert und diese im EMSA auf die Bindeaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 analysiert. Oberhalb der Abbildung ist aufgeführt, welche Zellen zur Stimulation verwendet wurden. „+“ bedeutet, dass die jeweiligen Zellen im Extrakt vorkommen, „-“ bedeutet, dass die entsprechenden Zellen nicht im Extrakt enthalten sind. Abgebildet ist ein repräsentativer EMSA von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen.

diesen Zellen keinen Einfluss auf die Bindeaktivität von AP-1. Anders verhält es sich für den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Hier konnte in den L1236-Zellen durch die CD40 Stimulation eine leichte Steigerung der Bindeaktivität induziert werden (Abbildung 4.13, Spuren 5 und 6). In der Zelllinie BL-2 ist die AP-1 Grundbindeaktivität nur schwach ausgeprägt (Abbildung 4.12, Spur 10). Durch die Stimulation mit BHK-CD40L lässt sich die AP-1 Bindeaktivität jedoch erhöhen (vergleiche Spuren 8 und 9). Auch die NF- κ B Bindeaktivität ist in der BL-2 Zelllinie nur schwach vorhanden (Abbildung 4.13, Spur 10), diese lässt sich jedoch durch eine CD40 Stimulation deutlich steigern (Spuren 8 und 9). In Spur 1 der beiden EMSAs wurde jeweils nur radioaktiv markiertes Oligonukleotid als Negativkontrolle aufgetragen.

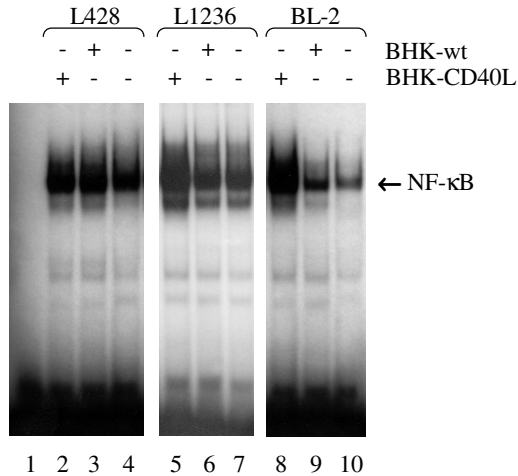


Abbildung 4.13: EMSA mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B und den Lymphomzelllinien L428, L1236 und BL-2. Nach 2-stündiger Stimulation mit BHK-CD40L, BHK-wt oder reinem Medium wurden Zellkernextrakte nach Dignam et al. präpariert und diese im EMSA auf die Bindeaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B analysiert. Oberhalb der Abbildung ist aufgeführt, welche Zellen zur Stimulation verwendet wurden. „+“ bedeutet, dass die jeweiligen Zellen im Extrakt vorkommen, „-“ bedeutet, dass die entsprechenden Zellen nicht im Extrakt enthalten sind. Zwei unabhängige Versuchsdurchführungen brachten identische Ergebnisse.

4.2.6 EINFLUSS VON CD40L AUF DIE CCR7 EXPRESSION IN BL-2 ZELLEN

Die BL Zelllinie BL-2 wurde nach 24-stündiger Stimulation mit BHK-CD40L bzw. BHK-wt Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung und der Durchflusszytometrie auf eine Induktion der CCR7 Expression analysiert. Zur Kontrolle wurde die ICAM-1 Expression untersucht, von der bekannt ist, dass sie in den Zellen durch CD40L induziert werden kann. Die Histogramme mit den Ergebnissen sind in Abbildung 4.14 aufgeführt. Aus den oberen geht hervor, dass in den BL-2-Zellen eine Steigerung der ICAM-1 Expression durch BHK-CD40L Zellen induziert werden konnte. Die mittlere Fluoreszenzintensität für ICAM-1 nach Stimulation mit BHK-wt betrug 337. Nach Stimulation mit BHK-CD40L betrug sie 2448. Somit konnte eine 7fache Steigerung der ICAM-1 Expression beobachtet werden. Aus dem unteren Teil der Abbil-

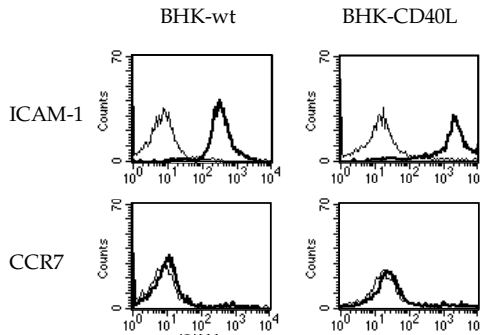


Abbildung 4.14: Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von BL-2-Zellen. Die BL-2-Zellen wurden 24 h mit BHK-CD40L bzw. BHK-wt Zellen stimuliert und im Anschluss mittels Immunfluoreszenzfärbung für ICAM-1 und CCR7 angefärbt und analysiert. Auf der Abzisse ist die Fluoreszenzintensität, auf der Ordinate die Häufigkeit der Zellen aufgeführt. Die Rezeptorfärbung wird durch die dicken Linien dargestellt, die Färbung mit der Isotypkontrolle durch die dünnen Linien. Eine Verschiebung der Verteilung zu höheren Fluoreszenzintensitäten lässt eine positive Rezeptorfärbung erkennen. Über der Grafik sind die zur Stimulation eingesetzten BHK Zellen angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von Zweien.

dung ist ersichtlich, dass die CD40 Stimulation jedoch keinen Einfluss auf die CCR7 Expression in den BL-2 Zellen hat.

4.3 Einfluss von Inhibitoren auf die CCR7 Expression in den HL Zellen L428

Stichprobenartig wurde untersucht, ob diverse Inhibitoren einen Einfluss auf die CCR7 Expression in den L428-Zellen haben. So wurden die Zellen 48 h mit 2, 10 und 20 $\mu\text{mol/l}$ des p38 MAP-Kinase Inhibitors SB 203580 sowie mit 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$ des ERK Inhibitors PD 98059 inkubiert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression der Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Die Fluoreszenzverteilungen der einzelnen Inhibitorkonzentrationen wurden übereinander gelegt. In keiner der eingesetzten Konzentrationen hatten die beiden Inhibitoren einen Einfluss auf die CCR7 Expression der L428-Zellen. In einem weiteren Test wurde die Zelllinie L428 24 h mit 2 $\mu\text{mol/l}$ SB 203580, 30 $\mu\text{mol/l}$ PD 98059, 15 mmol/l N-

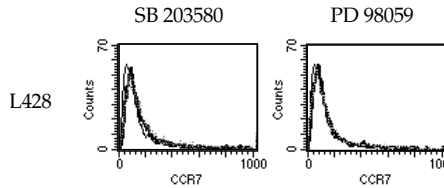


Abbildung 4.15: Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchung von L428-Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung für CCR7. Die L428-Zellen wurden vor der Färbung 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des p38 MAP-Kinase Inhibitors SB 203580 (2, 10 und 20 $\mu\text{mol/l}$) und des ERK Inhibitors PD 98059 (10 und 30 $\mu\text{mol/l}$) inhibiert. Auf der Abzisse ist die Fluoreszenzintensität, auf der Ordinate die Häufigkeit der Zellen aufgeführt. Die Fluoreszenzverteilungen der CCR7-Färbung zu den einzelnen Inhibitorkonzentrationen wurden in dem jeweiligen Histogramm übereinandergelegt. In beiden Histogrammen ist keine Verschiebung der Verteilungen in Abhängigkeit der eingesetzten Inhibitoren zu erkennen. Es handelt sich hierbei um einen nur einmal durchgeführten Versuch.

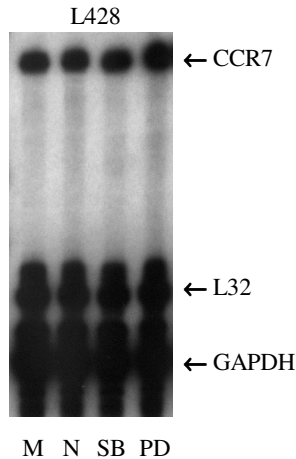


Abbildung 4.16: Ausschnitt aus dem RPA für Chemokinrezeptoren von L428-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 15 mmol/l N-Azetylcystein (N), 2 $\mu\text{mol/l}$ SB 203580 (SB), 30 $\mu\text{mol/l}$ PD 98059 (PD) und reinem Medium (M). Neben der Abbildung sind die CCR7 Banden sowie die Banden der konstitutiv exprimierten mRNAs für L32 und GAPDH markiert. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt.

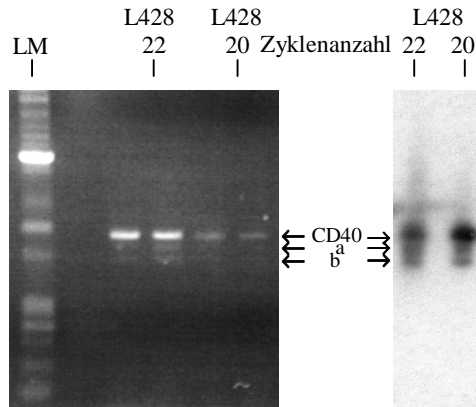


Abbildung 4.17: Aufnahme der RT-PCR Analyse (links) und des *Southern Blots* (rechts) zum Nachweis von Transkripten für CD40 in L428-Zellen. Gesamt RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit den CD40 spezifischen Oligonukleotiden hCD40splsneu und hCD40splas in 20 bzw. 22 PCR-Zyklen amplifiziert und auf einem 1,2%igem Agarosegel separiert. Nach einem *Southern Blot* wurde die DNA mit einer spezifischen CD40 Sonde hybridisiert und die Amplimere durch Chemolumineszenz nachgewiesen. Zwischen den Abbildungen sind die CD40 Hauptbande sowie die kleineren Nebenbanden a und b markiert. LM ist eine 1 kb Leiter. Die RT-PCR Analyse ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten. Der *Southern Blot* ist repräsentativ für zwei Versuche.

Azetylcystein oder reinem Medium inkubiert. Im Anschluss daran wurde aus den Zellen RNA isoliert und mit dieser RNA im *RNase protection assay* überprüft, ob sich die CCR7 mRNA Expression der inhibierten L428-Zellen im Vergleich zu der Mediumkontroll-mRNA verändert hat. In Abbildung 4.16 ist das Ergebnis wiedergegeben. Die mRNA für CCR7 wurde in den L428-Zellen unter allen Bedingungen etwa gleich stark exprimiert. Die Inhibitoren hatte somit keinen Effekt auf die CCR7 mRNA Expression in den L428-Zellen. Anhand der konstitutiv exprimierten Genprodukte L32 und GAPDH kann man erkennen, dass gleichmäßige RNA Mengen aufgetragen wurden.

4.4 CD40 Spleißvarianten

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass bei den HL Zelllinien durch eine Stimulation des CD40 Rezeptors keine Effekte hervorgerufen wer-

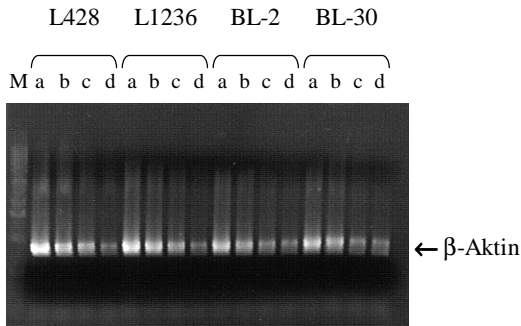


Abbildung 4.18: Aufnahme der β -Aktin-PCR Analyse zum Nachweis von konstitutiv exprimiertem β -Aktin in den Zelllinien L428, L1236, BL-2 und BL-30. Mit dem Endprodukt der cDNA Erststrangsynthese wurde eine Verdünnungsreihe erstellt: a) 1:5, b) 1:25, c) 1:125 und d) 1:625. Mit 1 μ l jeder Verdünnung wurde anschließend mit β -Aktin spezifischen Primern des *Human β -Actin RT-PCR Control Amplimer Sets* eine PCR durchgeführt. Gleiche Mengen der PCR-Ansätze wurden auf einem 1%igem Agarosegel separiert. Der Pfeil markiert die β -Aktin-Bande, M ist eine 1kb Leiter.

den konnten. Da von CD40 durch alternatives Spleißen entstandene Isoformen existieren, wurde schließlich untersucht, ob die HL Zelllinien ebenfalls Isoformen des CD40 aufweisen. Eine unterschiedliche Isoformexpression zwischen HL und BL Zelllinien könnte eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen der Lymphomzellen auf CD40 Stimulation liefern. Dazu wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase aus Gesamt-RNA cDNA hergestellt und diese anschließend mit CD40 spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. Mit dem PCR-Produkt wurde ein *Southern Blot* durchgeführt und dieser letztendlich mit einer CD40 spezifischen Sonde hybridisiert. Diese Versuche wurden zunächst anhand der Zelllinie L428 etabliert. Im linken Teil der Abbildung 4.17 ist das Ergebnis der CD40 PCR dargestellt. Auf dem Foto sieht man (nach einer PCR mit 22 Zyklen deutlich, nach einer PCR mit 20 Zyklen ganz schwach), dass unter der CD40 Hauptbande noch zwei weitere Banden (Banden a und b) vorhanden sind. Auch im *Southern Blot* (rechter Teil) konnten zusätzlich zur CD40 Hauptbande die zwei Banden a und b detektiert werden. Diese Signale deuten daraufhin, dass in den L428-Zellen neben der mRNA für den Volle-Länge-CD40 Rezeptor die mRNA zweier Isoformen dieses Rezeptors existieren.

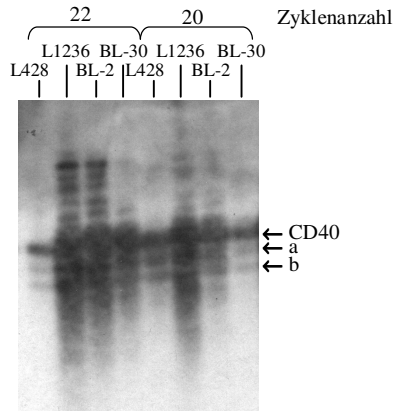


Abbildung 4.19: *Southern Blot* Analyse zum Nachweis von Transkripten für CD40 und seine Isoformen in den Lymphomzellen L428, L1236, BL-2 und BL-30. Gesamt RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit CD40 spezifischen Oligonukleotiden hCD40splsneu und hCD40spls in 20 bzw. 22 PCR-Zyklen amplifiziert und auf einem 1,2%igem Agarosegel separiert. Nach dem *Southern Blot* wurde die DNA mit einer spezifischen CD40 Sonde hybridisiert und die Amplimere durch Chemolumineszenz nachgewiesen. Neben der Abbildung sind die CD40 Bande sowie die kleineren Banden a und b markiert. Über der Abbildung sind die untersuchten Zellen und die Zyklenanzahl aufgeführt.

Dieser Versuch wurde anschließend auch mit der cDNA der Zellen L428, L1236, BL-2 und BL-30 durchgeführt. Doch vorher wurde mit Hilfe der β -Aktin-PCR überprüft, wie effizient die cDNA Erststrangsynthese war und ob gleiche cDNA Mengen synthetisiert worden sind. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 4.18 abgebildet. In allen Zelllinien werden die β -Aktin Banden mit zunehmender Verdünnung gleichmäßig schwächer. Es kann also davon ausgegangen werden, dass gleiche cDNA Mengen bei der Erststrangsynthese produziert wurden.

Danach wurden die Zellen L428, L1236, BL-2 und BL-30 mit Hilfe der CD40 PCR und anschließendem *Southern Blot* auf mögliche mRNA Isoformen des CD40 Rezeptors untersucht. Das Ergebnis ist in Form des *Southern Blots* in Abbildung 4.19 dargestellt. Bei allen untersuchten Zellen sind die CD40 Hauptbande sowie die beiden kleineren Banden a und b detektierbar. In den Zellen L1236 und BL-2 befand sich außerdem eine Gruppe von fünf bis

sechs weiteren Banden oberhalb der CD40 Bande. Diese Resultate deuten daraufhin, dass sowohl die HL als auch die BL Zellen Isoformen für CD40 mRNA aufweisen.

Diskussion

Die genauen Mechanismen der Entstehung und Aufrechterhaltung des charakteristischen Infiltrates im HL ist trotz langer Kenntnis der Krankheit noch nicht geklärt. Erst in den letzten Jahren konzentrierten sich die Forschungen zur Pathogenese des HL auf Chemokine und deren Rezeptoren. Bisher veröffentlichte Arbeiten zur Chemokin Expression im HL beschreiben überwiegend den Status zum Zeitpunkt der Diagnose in primären Geweben. Es ist schwer, hieraus Rückschlüsse auf die Entstehung und Aufrechterhaltung des Tumors zu machen und zu überprüfen, inwiefern die Chemokine daran beteiligt sind. In vitro Studien können dagegen Mechanismen aufzeigen, wie Chemokine bzw. deren Rezeptoren reguliert werden. In dieser Arbeit wurden daher vergleichende Untersuchungen zur Chemokinrezeptor und Chemokin Expression und Regulation in HL Zelllinien und BL Zelllinien durchgeführt. Anhand eines in den Zelllinien differentiell exprimierten Chemokinrezeptors wurde in primären HL Geweben getestet, ob die in vitro gewonnenen Daten auf primäres Gewebe übertragen werden können.

5.1 Konstitutive Expression von CCR7 und CXCR4 in HL Zelllinien

Zunächst wurde die Chemokinrezeptor Expression in vier HL Zelllinien und drei BL Zelllinien untersucht. Drei der vier HL Zelllinien (L428, L1236 und KM-H2) stammen von B-Lymphozyten ab, wohingegen die Zelllinie HDLM-2 von T-Zell Ursprung ist. Eine differentielle Expression zwischen den HL und den BL Zelllinien lag für den Chemokinrezeptor CCR7 vor. Die HL Zelllinien mit B-Zell Ursprung exprimierten sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene CCR7, wohingegen die verwendeten BL Zelllinien und die HDLM-2-Zellen keine CCR7 Expression aufwiesen. Anhand des Chemotaxisassays wurde gezeigt, dass CCR7 zumindest in den L428-Zellen funktionell aktiv war. Es konnte eine deutliche Migration durch die CCR7-Liganden ELC und SLC ausgelöst werden. Die HDLM-2-Zellen zeigten eine sehr schwache chemotaktische Reaktion bei hohem statistischem Fehler auf ELC, obwohl kein CCR7 nachweisbar war. Ebenso verhielt sich die BL Zelllinie

BL-2. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass beide Zelllinien einen bislang unbekanntem Rezeptor für ELC exprimieren, über den die chemotaktische Bewegung ausgelöst wird. Andererseits könnte das Ergebnis auf einen statistischen Fehler zurückzuführen sein, da bei manchen Versuchen viele Zellen, in anderen keine Zellen in der Mediumkontrolle migriert waren. Die daraus erhaltenen hohen Abweichungen übertragen sich auf die übrigen Ergebnisse.

Obwohl alle Lymphomzelllinien ähnlich viel CXCR4 mRNA exprimierten, war der Rezeptor nur in den Zelllinien L428, BL-30 und BL-41 funktionell aktiv. Das Ausbleiben der Chemotaxis in den Zellen L1236, KM-H2, HDLM-2 und BL-2 nach Stimulation der Rezeptoren könnte seine Ursache in einer Störung oder Blockade innerhalb der Signaltransduktion haben. Für andere Zelltypen, wie z. B. dendritische Zellen, ist bekannt, dass sie CCR7 und CXCR4 zwar exprimieren, die Rezeptorbindung aber keine Migration auslösen kann [37, 152]. Es wird eine Entkopplung der Rezeptoren dafür verantwortlich gemacht, die durch die Gabe von Prostaglandin aufgehoben werden kann. Die einzelnen G-Proteine der Lymphomzelllinien könnten demnach entkoppelt vorliegen, so dass die Signalweiterleitung direkt am Rezeptor unterbrochen ist.

Diese Ergebnisse bestätigen zum Großteil die Daten von Höpken et al. [69]. In dieser Arbeit war kürzlich ebenfalls gezeigt worden, dass die HL Zelllinien die Rezeptoren CCR7 und CXCR4 exprimieren. Allerdings wurde dort auch eine CCR7 Expression in den HDLM-2-Zellen gefunden. Diese reagierte im Chemotaxisassay mit deutlicher Chemotaxis auf die Chemokine ELC und SDF-1 α . Ebenso migrierten die Zelllinie L1236 in Reaktion auf beide Chemokine, die L428-Zellen aber nicht auf SDF-1 α Stimulation.

Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf die Handhabung der Lymphomzellen während der Langzeitkultivierung in verschiedenen Laboratorien zurückzuführen. Eine geringfügig andere Zusammensetzung des Mediums sowie andere Passagier- und Kultiviergewohnheiten können Veränderungen in den Zellkulturen bewirken. Außerdem lassen sich die unterschiedlichen Chemotaxisergebnisse durch andere Versuchsbedingungen erklären. Höpken et al. setzten niedrigere Ausgangszellzahlen und höhere Chemokinkonzentrationen im Chemotaxisassay ein.

CCR7 ist ein wichtiger homöostatischer Rezeptor, der nicht nur für die Migration von B-, T-Lymphozyten und dendritischen Zellen durch *high endothelial venules* (HEVs) in die sekundären lymphoiden Organe, sondern auch für die korrekte Positionierung der T-Lymphozyten und dendritischen Zel-

len in die T-Zell-Zonen zuständig ist [36, 119]. Seine beiden Liganden, ELC und SLC, werden konstitutiv innerhalb der T-Zell-Zonen in sekundären lymphoiden Geweben und SLC außerdem in den HEVs exprimiert [36, 87, 172]. CXCR4 ist der am weitesten verbreitete Chemokinrezeptor [132]. Sein Ligand, SDF-1 α , wird überwiegend durch Stroma-Zellen des Knochenmarks und der sekundären lymphoiden Organe sezerniert. Die Funktion von CXCR4 im Erwachsenen ist noch nicht definiert. Im Embryo ist das CXCR4/SDF-1 α Wechselspiel essentiell für die Migration der hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen ins Knochenmark [122]. Außerdem ist CXCR4 an der Lokalisierung und Entwicklung der Lymphozyten im Thymus beteiligt [60]. Es wird berichtet, dass CXCR4 und CCR7 beim Menschen in malignen Brustkrebszellen und Metastasen stark exprimiert wird [116]. Es wird vermutet, dass eine SDF-1 α Expression an Orten der Metastasierung metastasierende Krebszellen anlockt, die ihrerseits CXCR4 exprimieren, da eine Neutralisation von CXCR4 in vivo die Absiedelung von Brustkrebszellen in Lymphknoten und Lungengewebe verhindern kann.

Das Vorhandensein der H/RS Zellen im Lymphknoten ist somit wahrscheinlich auf die Expression von CCR7 zurückzuführen. Weiterhin kann man vermuten, dass die Tumorzellen des BLs, dessen Verteilung hauptsächlich extranodal ist, den Lymphknoten verlassen konnten, da sie kein CCR7 exprimieren. In ähnlicher Weise ist das für Th2-Lymphozyten beschrieben. Die Aktivierung der Th2-Lymphozyten geht mit einer merklichen Reduktion der CCR7 Expression einher, die die Migration aus der T-Zell-Zone in die B-Zell Follikel erlaubt [106]. Auch bei Gedächtnis-T-Zellen führt die CCR7 Expression zu einer Einteilung von im Lymphknoten vorkommenden zentralen Gedächtniszellen (CCR7+) und im Gewebe zirkulierenden Effektorgedächtniszellen (CCR7-) [148]. Da es keine Unterschiede in Bezug auf Expression und Funktionalität von CXCR4 zwischen HL und BL Zelllinien gibt, ist eine Beteiligung dieses Rezeptors am *Homing* der Tumorzellen in den Lymphknoten, wie Höpken et al. es vermuten, eher unwahrscheinlich. Vielmehr könnte CXCR4 bei den beiden Lymphomen eine Rolle bei der Metastasierung zugeteilt werden, wie es für den Brustkrebs und seine Metastasen postuliert wird.

5.2 Andere Chemokinrezeptoren

Ein weiterer Rezeptor, der auf mRNA und Proteinebene von der Zelllinie L428 exprimiert wurde, ist CCR4. Er schien allerdings nicht funktionell

aktiv zu sein. Auf mRNA Ebene wird er auch in geringem Maße in L1236-Zellen exprimiert. Die hier gefundene CCR4 Expression deckt sich mit den RT-PCR Daten von Van den Berg et al. [21]. Eine sehr schwache mRNA Expression liegt auch für die Rezeptoren CXCR3 in L428-Zellen und CXCR5 in HDLM-2- und BL-2-Zellen vor. Die Stimulation mit IP-10 führte zu keiner chemotaktischen Bewegung in den L428-Zellen, was darauf hinweist, dass CXCR3, der IP-10 Rezeptor, in diesen Zellen nicht ausreichend exprimiert wird. Die Expression dieser Rezeptoren scheint eher von untergeordneter Bedeutung, da sie nur auf einzelne Zelllinien zutrifft und die Proteine, sofern sie untersucht wurden, nicht funktionell aktiv waren.

5.3 Konstitutive Expression von Chemokinen in HL Zelllinien

Auch die Chemokin Expression unterschied sich gravierend in den sieben untersuchten HL und BL Zelllinien. Während die von B-Lymphozyten abstammenden HL Zelllinien L428, L1236 und KM-H2 konstitutiv IP-10 und RANTES mRNA exprimierten, konnte in den BL Zelllinien keine Chemokin Expression nachgewiesen werden, ebenso wie in der HL Zelllinie HDLM-2. Die L428- und L1236-Zellen exprimierten dagegen zusätzlich weitere Chemokine: I-309 und TARC bzw. MIP-1 α , MCP-1 und geringe Mengen TARC. Auf Proteinebene wurde die Produktion von IP-10, RANTES, MIP-1 α und MCP-1 bestätigt. I-309 und TARC wurden auf Proteinebene nicht untersucht. In den L428-Zellen konnte trotz mRNA Expression kein IP-10 Protein im Überstand nachgewiesen werden. Möglicherweise konnte eine geringe IP-10 Produktion mit dem verwendeten ELISA, dessen Sensitivitätsgrenze bei etwa 0,080 ng/ml lag, nicht erfasst werden.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Maggio et al. [108] wurden die Zelllinien L428 und L1236 mit Hilfe der RT-PCR unter anderem auf die Chemokine RANTES, IP-10, IL-8, I-309, Mig, MDC, SLC, LARC, ELC und TARC untersucht. Die Ergebnisse stimmen größtenteils mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Abweichend von den hier dargestellten Ergebnissen fanden Maggio et al. auch in L1236-Zellen eine I-309 und MDC Expression, sowie eine LARC und MDC Expression in L428-Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die von Maggio et al. angewandte RT-PCR eine sensitivere Methode als das in dieser Arbeit verwendete *RNase protection assay* ist, da bei der PCR schon wenige Kopien des zu untersuchenden Transkriptes in der Zelle ausreichen können, um ein positives Signal hervorzurufen.

IP-10 ist ein induzierbares ELR- Chemokin. Wie oben erwähnt übt es seine Funktion durch den Rezeptor CXCR3 aus. Dieser wird von aktivierten Th1-Zellen, zirkulierenden meist CD45R0+ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen (NK) und Endothelzellen exprimiert. Biologische Funktionen, die auf IP-10 zurückzuführen sind, beinhalten die Chemoattraktion von Monozyten, aktivierten T-Zellen und NK Zellen, die Stimulation der T-Zell-Adhäsion an endotheliale Zellen, die NK-vermittelte Zytolyse, die Inhibition der Angiogenese [19] und eine Beteiligung an der Tumornekrose [123, 156]. Ohshima et al. [130] beobachteten, dass die Lymphozyten in primären HL Geweben, die Mig- und IP-10 positive H/RS Zellen umgeben, häufiger CXCR3 positiv sind, als die Lymphozyten, die Mig- und IP-10 negative H/RS Zellen umgeben. Sie postulieren, dass IP-10 und Mig lokal die Th1-Zell Migration beeinflussen können. Die in dieser Arbeit gefundene IP-10 Sekretion in HL Zelllinien ermöglicht nun die Überprüfung dieser Theorie. Anhand der IP-10 positiven HL Zelllinien könnte man nun in vitro untersuchen, ob die HL Zellen an der Th1-Zell Migration beteiligt sind. Im Langzeitbeobachtungsexperiment oder mit Hilfe des Chemotaxisassays könnte demnach analysiert werden, ob CXCR3 positive T-Lymphozyten auf den Überstand von L1236-Zellen mit Chemotaxis reagieren. Sollte dieser Versuch positiv ausfallen, könnte durch Gabe von IP-10 Antagonisten getestet werden, ob diese Migration gehemmt werden kann und somit spezifisch für IP-10 ist.

RANTES ist ebenfalls ein induzierbares Chemokin. Es bindet mit hoher Affinität an die Rezeptoren CCR3 und CCR5 und mit niedriger Affinität an CCR1. Über CCR1 und CCR5 lockt RANTES CD45R0+ Gedächtniszellen an [120, 163]. Über CCR3 vermittelte Chemotaxis werden Eosinophile und Th2-Zellen angezogen. CCR5 wird außerdem auf Th1-Lymphozyten, dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut und CD34+ hämatopoietischen Vorläuferzellen exprimiert.

Da Th1-Zellen große Mengen von CCR5 und CXCR3 exprimieren [147] und Effektorgedächtniszellen eine Kombination aus CCR1, CCR4, CCR5, CCR6 und CXCR3 exprimieren [146], können hauptsächlich diese Zellen durch die Chemokinkombination IP-10 und RANTES angelockt werden. In primären H/RS Zellen konnte bislang jedoch keine RANTES Expression nachgewiesen werden [24]. Einerseits kann das daran liegen, dass die Expressionshöhe von RANTES für einen in situ Nachweis zu gering war. Andererseits könnte die RANTES Expression in situ durch ein dort vorhandenes Umfeld reprimiert sein. So könnte vielleicht IL-17, das im HL vorkommt, dabei eine Rol-

le spielen. In menschlichen subepithelialen Myofibroblasten des Dickdarms ist IL-17 in der Lage, die durch TNF- α induzierte RANTES Expression selektiv herunterzuregulieren [6]. Ein anderer Ansatzpunkt könnte CTLA-4 sein, das auf den die H/RS Zellen umgebenden CD4+ T-Lymphozyten vorkommt. CTLA-4 kann in vitro die durch CD3/CD28 induzierte RANTES Expression in menschlichen isolierten T-Lymphozyten inhibieren [158]. CD3 und CD28 sind auf den die H/RS Zellen umgebenden T-Lymphozyten vorhanden und CD80 und CD86, die Rezeptoren für CD28, auf den H/RS Zellen selbst. Durch beide Systeme könnte theoretisch die RANTES Expression in H/RS Zellen in vivo unterdrückt werden.

Insgesamt zeigte sich, dass die HL Zelllinie HDLM-2 bei den Versuchen nicht mit den anderen HL Zelllinien übereinstimmende Ergebnisse lieferte. Sie exprimiert kein CCR7 und sie exprimiert keine Chemokine. Das ist evtl. darauf zurückzuführen, dass die HDLM-2 Zelllinie einen anderen zellulären Ursprung (T-Lymphozyten) aufweist als die übrigen HL Zelllinien (B-Lymphozyten). In die weiteren in vitro Untersuchungen wurden nur noch die HL Zelllinien einbezogen, die von B-Lymphozyten abstammten.

5.4 SLC und CCR7 Expression in primären H/RS Zellen

Die Immunhistochemie von primären HL Geweben ergab, dass CCR7 in zwei von sechs CHL-Fällen von den primären H/RS Zellen exprimiert wird. Dabei handelte es sich in einem Fall um ein HL vom nodulär-sklerosierenden Subtyp. Die CCR7 positiven H/RS Zellen machten hierbei eine Subpopulation der CD30 positiven H/RS Zellen aus. Im anderen Fall lag ein Rezidiv vor, bei dem die CCR7 Population weitestgehend der CD30 positiven Zellpopulation entsprach. Die geringe Anzahl an auswertbaren Färbungen erlaubt keine statistische Beurteilung der CCR7 Expression, sie lässt jedoch Tendenzen erkennen. Höpken et al. konnten mittels immunhistochemischer Färbung in 18 von 18 NSHL eine CCR7 Positivität der primären H/RS Zellen nachweisen, wobei die Anzahl der CCR7 positiven H/RS Zellen zwischen weniger als 10 % und bis zu 100 % der Tumorzellen schwankt. Unter Einbezug der von Höpken et al. gefundenen Ergebnisse, wird die Vermutung verstärkt, dass CCR7 bei der Orientierung und Aufrechterhaltung der H/RS Zellen in den Lymphknoten eine Rolle spielt.

In dieser Arbeit wurde auch der CCR7 Ligand SLC immunhistochemisch in sechs von sieben untersuchten CHL in den primären H/RS Zellen nachgewiesen. SLC wird normalerweise durch interdigitierende dendritische

Zellen und HEVs exprimiert und fungiert als chemotaktisches Agens für T-Lymphozyten und dendritische Zellen [119, 172]. Im HL könnte es also bei der Migration/Anlockung der T-Lymphozyten im reaktiven Infiltrat eine Rolle spielen. Im Gegensatz hierzu konnte Höpken et al. [69] mit Hilfe der In Situ Hybridisierung keine SLC Expression in primären Tumorzellen nachweisen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf den Einsatz von verschiedenen Detektionsmethoden mit unterschiedlicher Sensivität zurückzuführen.

Bei der in dieser Arbeit angewandten Methode wurden mehrere Schritte eingefügt, um ein falsch-positives Signal zu verhindern. Vor der Zugabe der spezifischen Antikörper wurden endogene Peroxidasen zerstört, die bei der abschließenden Peroxidase-Reaktion stören würden. Außerdem wurden endogenes Biotin und Avidin blockiert, die mit der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase und dem AB-Komplex interagieren könnten. Desweiteren wurden Fc-Bindestellen des Gewebes mit Humanserum abgesättigt. Zusätzlich wurden bei jeder Versuchsdurchführung Isotypantikörper als Negativkontrolle verarbeitet, so dass eine falsch-positive Färbung weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Durch die Verwendung von biotinylierten Sekundärantikörpern (Biotin besitzt vier Bindestellen) und durch die Signalverstärkung mit dem TSA Biotin Kit wurde eine hohe Sensitivität des Versuchs erreicht.

Für ELC waren die primären H/RS überwiegend negativ. Im NLPHL wurde weder CCR7, SLC noch ELC in den *Popcorn* Zellen nachgewiesen. Das NLPHL unterscheidet sich bereits durch andere Chemokine und Chemokinrezeptoren vom CHL. So exprimieren die *Popcorn* Zellen kein CCR7, TARC und kaum MDC, wohingegen diese Moleküle von H/RS Zellen exprimiert werden [21, 61, 69, 134]. Die SLC Expression könnte somit einen weiteren Hinweis liefern, dass das NLPHL eine anderer Form des HL ist.

5.5 Aktivierung von NF- κ B und AP-1 in BL-2-Zellen

In weiteren Untersuchungen sollten Hinweise auf die Regulation des Rezeptors CCR7 in HL Zelllinien gewonnen werden. In verschiedenen Zelltypen vermittelt CD40 die Aktivierung von AP-1 und NF- κ B und verursacht die Expression und Hochregulierung von verschiedenen Oberflächenmolekülen wie ICAM-1, CD23, CD95 und CCR7 [7, 49, 63, 159].

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob CD40 auch in Lymphomzellen in der Lage ist die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B sowie die

Expression des Rezeptors CCR7 zu beeinflussen. Die Untersuchung zur Auswirkung der CD40 Stimulation auf die Transkriptionsfaktoren erfolgte mit dem *electrophoretic mobility shift assay* und ergab, dass die Bindeaktivität des konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktors AP-1 in den HL Zelllinien L428 und L1236 durch eine CD40 Stimulation nicht erhöht werden konnte. In dem EMSA ist die AP-1 Bindeaktivität in der Mediumkontrolle von L428 stärker als nach BHK Zell-Stimulation. Dabei handelt es sich eher nicht um eine unspezifische Repression der Bindeaktivität durch die BHK-Zellen. Das stärkere Signal ist vielmehr darauf zurückzuführen, dass es sich bei der Herstellung der Extrakte nicht immer vermeiden ließ, die zur Stimulation eingesetzten BHK-Zellen mit zu extrahieren. Die BHK-Zellproteine werden anschließend bei der Proteinbestimmung miterfasst. Beim EMSA werden zwar absolut gesehen gleiche Mengen an Protein aufgetragen, aber bei Extrakten, die unter Umständen mit BHK-Zellproteinen „verunreinigt“ sind, kann der Anteil an Lymphom-Zellprotein im Vergleich mit den Extrakten ohne vorangegangene BHK Zell Stimulation geringer sein. Da die BHK-Zellproteine selber im EMSA kein Signal erzeugen, könnten somit schwächere Banden entstehen. Bei der Herstellung der Kernextrakte für den NF- κ B EMSA konnte die Verunreinigung mit BHK-Zellprotein vermieden werden.

In den BL-2-Zellen konnten die Bindeaktivitäten von AP-1 und NF- κ B durch die CD40 Stimulation deutlich gesteigert werden. Die Induktion von NF- κ B in den BL-2-Zellen wurde bereits in der Literatur beschrieben und diente in diesem Versuch als Positivkontrolle [63]. Auch die nicht vorhandene Induktion von NF- κ B in L428-Zellen durch CD40 ist veröffentlicht (Wood et al., [174]). Jedoch benutzten Wood et al. in ihren Versuchen den Überstand von CHO Zellen (Ovarzellen von Chinesischen Hamster), in die CD40L transfiziert worden ist, zur Stimulation. Der im Überstand enthaltene lösliche CD40L ist aber nicht so effektiv wie der in seiner natürlichen Form vorkommende, trimerisierte, membrangebundene CD40L, der in dieser Arbeit eingesetzt wurde [66]. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass ein möglicher Effekt der CD40 Stimulation durch einen weniger effektiven Agonisten übersehen worden ist.

Das Ausbleiben der weiteren Steigerung der NF- κ B Aktivität in den L428 könnte auf verschiedenen Ursachen beruhen. In den L428-Zellen liegt der Grund für die konstitutive NF- κ B Aktivität in einem Defekt im I κ B α Gen [27, 43, 98, 174]. Dieser Defekt bewirkt, dass das I κ B α nicht in der Lage ist NF- κ B zu binden. Somit stünde kein an I κ B α gebundenes und dadurch inhibiertes

NF- κ B zur Verfügung, das nach Aktivierung des NF- κ B-Signalweges aus der Bindung freigesetzt werden könnte. Die Überexpression von NF- κ B in L1236-Zellen ist jedoch nicht auf defektes I κ B α zurückzuführen [98]. So konnte in diesen Zellen durch die CD40 Stimulation die NF- κ B Aktivität noch gering gesteigert werden.

Eine andere Möglichkeit ist, dass der Rezeptor CD40 in den L428-Zellen nicht mehr funktionsfähig ist, so dass eine Aktivierung des Rezeptors keinen Effekt in der Zelle auslösen kann. Dadurch könnte auch erklärt werden, dass in den Zellen nach der CD40 Stimulation kein AP-1 induziert werden konnte.

Für CCR7 wurde beschrieben, dass seine Expression auf HL Zelllinien NF- κ B und AP-1 abhängig ist [69, 112]. Da in den BL-2-Zellen durch eine CD40 Stimulation die Aktivität dieser beiden Transkriptionsfaktoren hochreguliert werden konnte, wurde als Nächstes untersucht, ob in den BL-2-Zellen eine CCR7 Expression durch CD40 Stimulation induziert werden konnte. Als Kontrolle diente die ICAM-1 Hochregulierung, von der bereits beschrieben ist, dass sie in BL Zellen CD40-induzierbar ist. Die BHK-CD40L Zellen waren in der Lage die ICAM-1 Expression in den BL-2 Zellen drastisch zu steigern, die CCR7 Expression konnte jedoch in den Zellen nicht induziert werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass CD40 zwar in der Lage ist, in BL Zellen AP-1 und NF- κ B zu aktivieren, diese Aktivierung aber nicht ausreichte, um eine CCR7 Expression hervorzurufen. Es müssen also noch andere Faktoren an der CCR7 Expression beteiligt sein.

Auf der Suche nach anderen Faktoren wurden L428-Zellen stichprobenartig mit Inhibitoren für Kinasen, die in anderen Zellen an der CCR7 Regulation beteiligt sind, inkubiert und der Einfluss auf die CCR7 Expression untersucht. So verläuft in dendritischen Zellen die Induktion der CCR7 Expression über den p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAP-Kinase) Signaltransduktionsweg [9], in Thymozyten ist das *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) Signal mitbeteiligt [1]. Es zeigte sich, dass weder der Inhibitor SB 203580 noch PD 98059, die die p38 MAP-Kinase bzw. ERK inhibieren können, die CCR7 Expression beeinflusste [5, 41, 101]. Die CCR7 Expression in HL Zelllinien scheint somit unabhängig von der p38 MAP-Kinase und ERK zu sein.

Mit N-Azetylcystein (NAC), einem Inhibitor des NF- κ B-Signalweges, konnte in dieser Arbeit keine Inhibition der CCR7 Expression erreicht werden. Das ist darauf zurückzuführen, dass NAC in der Signalkaskade die Kinasen inhibiert, die in den HL Zellen keinen Einfluss mehr auf die NF- κ B Freisetzung haben. In den L428-Zellen beruht die Überexpression von NF- κ B

auf defektem $I\kappa B\alpha$, das nicht fähig ist, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ zu binden [27, 43, 98, 174]. NAC inhibiert die $I\kappa B$ Kinasen (IKKs) und Kinasen, die im Signaltransduktionsweg vor den IKKs stehen [131]. Normalerweise phosphorylieren die IKKs das $I\kappa B\alpha$ und lösen damit die Freisetzung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aus. Da das $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aber in den HL Zellen nicht durch $I\kappa B\alpha$ gebunden wird, kann eine Aktivierung der IKKs keine $\text{NF-}\kappa\text{B}$ Freisetzung nach sich ziehen.

5.6 Induktion der IP-10 und RANTES Produktion durch CD40 und LMP1

Die Stimulation der HL Zelllinien L428, L1236 und KM-H2 sowie der BL Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 mit BHK-CD40L ergab, dass die IP-10 und RANTES Chemokin Expression in den BL Zelllinien BL-2 und BL-30, nicht aber in den BL-41-Zellen und den HL Zelllinien über CD40 induziert werden konnte. In den Promotoren von IP-10 und RANTES sind zwei bzw. vier Bindestellen für $\text{NF-}\kappa\text{B}$ vorhanden [33, 51, 109]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass im RANTES Promotor *AP-1 response elements* existieren. Diese Daten lassen vermuten, dass in den BL Zellen die CD40 Stimulation über eine Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ und AP-1 zu einer Induktion der IP-10 und RANTES Expression führen kann, während in den HL Zelllinien die Gene für IP-10 und RANTES durch die konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und $\text{NF-}\kappa\text{B}$ bereits voll aktiv sind.

Die Chemokin-Untersuchung an den EBV positiven BL Zelllinien ergab, dass in den LMP1 exprimierenden Zellen RANTES und IP-10 (Ausnahme: BL-41 B95-8) produziert wird. In den EBV positiven aber EBNA2 und damit LMP1 negativen BL Zelllinien [28] konnte keine RANTES und IP-10 Produktion nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das LMP1 unter anderem zu einer Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ und AP-1 führt und diese Aktivierung somit eine Produktion der beiden Chemokine bewirken könnte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den BL-2- und BL-30-Zellen die Stimulation von CD40 zu einer Induktion der IP-10 und RANTES Sekretion führt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass LMP1 zu einer Induktion beider Chemokine in diesen Zellen führte. Da LMP1 den CD40-Signaltransduktionsweg kreuzen kann, war von Interesse, ob eine Kombination beider Induktoren eine zusätzliche Induktion der Chemokinproduktion bewirken konnte. Dies konnte am Beispiel der BL-2 B95-8-Zellen durch Stimulation mit BHK-CD40L Zellen gezeigt werden. Die Produktion der beiden

Chemokine ließ sich in den BL-2 B95-8-Zellen durch eine CD40 Stimulation in etwa verdoppeln. Somit ist es möglich, dass sich die Signaltransduktionswege von CD40 und LMP1, die an der Induktion von IP-10 und RANTES beteiligt sind, ergänzen und nicht komplett überlappen. Die erhöhte IP-10 Expression in EBV positiven HL könnte somit auf LMP1 zurückzuführen sein [166].

5.7 Inhibition der induzierten IP-10 Produktion

Anhand der BL-2-Zellen wurde untersucht, ob die CD40 induzierte Produktion von IP-10 und RANTES unter Beteiligung der p38 MAP-Kinase abläuft. Dazu wurde der p38 MAP-Kinase Inhibitor SB 202190 eingesetzt. Es zeigte sich, dass sich die CD40 induzierte IP-10 Produktion um etwa 50 % hemmen ließ, wohingegen die CD40 induzierte RANTES Produktion durch den Inhibitor unbeeinflusst blieb. Die Induktion der beiden Chemokine läuft somit über verschiedene Signaltransduktionswege ab. An der IP-10 Induktion scheint die p38 MAP-Kinase beteiligt zu sein, an der RANTES Induktion nicht. Auch in dendritischen Zellen wurde gezeigt, dass die CD40 induzierte RANTES Expression nur minimal durch Hemmung der p38 MAP-Kinase reduziert werden konnte [3]. Diese Beobachtung kann somit auch auf BL Zellen übertragen werden. In der Burkitt Lymphomzelllinie Daudi ist CD40 in der Lage, NF- κ B sowohl über einen p38 MAP-Kinase abhängigen als auch über einen p38 MAP-Kinase unabhängigen Signaltransduktionsweg zu aktivieren [35]. So könnte möglicherweise auch bei den hier verwendeten Zelllinien die CD40 vermittelte NF- κ B Aktivierung über diese unterschiedlichen Signalwege ablaufen.

5.8 IRF Expression in Lymphomzelllinien

Da sowohl im RANTES Promotor als auch im IP-10 Promotor *interferon stimulated response elements* vorkommen, wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster der Interferon regulierenden Faktoren mit Hilfe des *Western Blots* in den HL Zelllinien und in der BL-2-Linie untersucht. Es zeigte sich, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der Expression eines der Interferon regulierenden Faktoren IRF-1, IRF-3 und IRF-7 und der Expression von IP-10, RANTES oder eines der anderen untersuchten Chemokine gibt. IRF-1 wird von den L428-, KM-H2- und HDLM-2-Zellen variabel exprimiert, IRF-3 von allen Zellen in unterschiedlicher Stärke und IRF-7 von den L1236-, KM-H2-

und HDLM-2-Zellen. Die HDLM-2-Zellen und die BL-2-Zellen exprimierten jedoch keines der untersuchten Chemokine. Somit korreliert die Expression der Chemokine nicht mit der Expression der einzelnen IRFs. Die Untersuchung mit dem *Western Blot* lässt jedoch nur Rückschlüsse auf die Expression der Transkriptionsfaktoren, nicht aber auf ihre Bindeaktivität zu. Letztere ließe sich z. B. mit Hilfe des *electrophoretic mobility shift assays* analysieren, da eine mögliche Beteiligung der einzelnen IRFs an der Chemokin Expression von der DNA-Bindeaktivität der Faktoren abhängig ist.

Stichprobenartig wurde untersucht, ob in den BL-2-Zellen die IRF-7 Expression durch eine CD40 Stimulation beeinflusst wird, da in BL Zellen die IRF-7 Expression durch LMP1, dessen Signaltransduktionsweg den von CD40 kreuzen kann, induziert werden kann [176]. Es konnte jedoch keine Induktion von IRF-7 über BHK-CD40L Zellen erreicht werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sich in den BL Zellen die Signaltransduktionswege von CD40 und LMP1 nicht komplett überlappen. Da in den BL-2-Zellen mit Hilfe der CD40 Stimulation eine AP-1, NF- κ B, RANTES und IP-10 Induktion erreicht wurde, IRF-7 aber nicht induziert werden konnte, scheint IRF-7 keine Rolle für die CD40 vermittelte IP-10 und RANTES Induktion zu spielen.

5.9 Hinweise auf CD40 Spleißvarianten

Es hat sich gezeigt, dass in den HL Zelllinien durch eine Stimulation mit CD40L keine Veränderung in der Chemokin und Chemokinrezeptor Expression und in der Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B (Ausnahme L1236) erzeugt werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass in den HL Zelllinien die beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B konstitutiv aktiv sind und die von diesen beiden Transkriptionsfaktoren kontrollierten Gene schon voll aktiv sind, so dass eine CD40 Stimulation keine weiteren Effekte mehr bewirken kann. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass aufgrund des defekten I κ B α s die zellulären Reserven von NF- κ B erschöpft sind, so dass nach Aktivierung des CD40 Signaltransduktionsweges kein NF- κ B mehr freigesetzt werden kann. Von murinen CD40 existieren fünf Isoformen (I–V), die durch alternatives Spleißen entstehen [167]. Drei der Isoformen können die Signale des funktionsfähigen, kompletten CD40 Rezeptors (Isoform I) unterbinden. Von humanem CD40 sind bis dato vier Isoformen existent, aber noch nicht auf Funktionalität untersucht. Ein Ausbleiben einer Reaktion nach CD40 Stimulation in den HL Zelllinien könnte

demnach auch auf die Existenz von nicht-signalfähigen Isoformen des CD40 Rezeptors zurückzuführen sein. Mit Hilfe der CD40-PCR für die L428-Zellen war deutlich zu erkennen, dass unter der CD40 Hauptbande noch zwei weitere kleinere Banden existieren. Die Ergebnisse des *Southern Blots* bestätigen die CD40-Identität dieser beiden Nebenbanden. In der Zelllinie L428 kommen somit drei Isoformen von CD40 vor. Der *Southern Blot* mit den Zellen L428, L1236, BL-2 und BL-30 zeigte, dass diese beiden kleineren Nebenbanden a und b nicht nur in der HL Zelllinie L428 vorkommen, sondern auch in den L1236-Zellen und in den BL Zelllinien. Das bedeutet, dass in beiden Lymphomtypen CD40 Spleißvarianten existieren, diese wahrscheinlich nicht für das unterschiedliche Ansprechen der Lymphomzelllinien auf die CD40 Stimulation verantwortlich gemacht werden können. Das oberhalb der CD40 Hauptbanden in den L1236- und BL-2-Zellen auftauchende Bandenmuster ist eventuell auf eine genomische DNA Kontamination zurückzuführen. Für weitere Aussagen müsste der Versuch noch mehrfach reproduziert werden. Um eine genomische Kontamination ausschließen zu können, müsste die isolierte RNA der Zellen ohne vorherige Umwandlung in cDNA in der PCR amplifiziert werden. Wird dann kein Signal erhalten, liegt keine genomische DNA vor.

Zur weiteren Identifizierung der Isoformen und Aufklärung, ob es sich dabei um nicht-funktionsfähige Varianten handelt, müssten in der Zukunft noch weitere Experimente durchgeführt werden. Diese sollten die Sequenzanalyse der Isoformen beinhalten, die Expression der verschiedenen Isoformen in CD40 negativen Zellen mit anschließender CD40-Funktionsanalyse oder die Überexpression der Isoformen in CD40 positiven Zellen. Nach einer Stimulation mit CD40L könnte dann überprüft werden, ob die Isoformen in den HL Zelllinien etwa dominant negativen Charakter haben.

Zusammenfassung

Die ungewöhnliche histopathologische Erscheinung des Hodgkin Lymphoms mit wenigen neoplastischen Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen in einem charakteristischen reaktiven Infiltrat wird seit ein paar Jahren auf die Wechselwirkung von Chemokinen und deren Rezeptoren zurückgeführt. Um einen Einblick in die Chemokine und Chemokinrezeptoren zu bekommen, die in das Hodgkin Lymphom verwickelt sind, wurde das Expressionsmuster von Chemokinen und deren Rezeptoren in Hodgkin Lymphom Zelllinien genauer untersucht und mit dem Expressionsmuster von Burkitt Lymphom Zelllinien verglichen. Das Burkitt Lymphom ist ein Tumor, der im Gegensatz zum Hodgkin Lymphom kein lymphozytäres, reaktives Infiltrat aufweist.

Chemokine und Chemokinrezeptoren wurden in diesen Lymphomen differentiell exprimiert. Die Hodgkin Lymphom Zelllinien exprimierten im Gegensatz zu Burkitt Lymphom Zelllinien konstitutiv das CXC-Chemokin *IFN- γ -inducible protein 10* (IP-10) und das CC-Chemokin *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES). Durch eine CD40 Stimulation konnte in den Burkitt Lymphom Zelllinien die Expression von IP-10 und RANTES induziert werden, in den Hodgkin Lymphom Zelllinien blieb die vorhandene Expression dieser Chemokine jedoch unbeeinflusst. In den Burkitt Lymphom Zelllinien ging diese Induktion mit einer deutlichen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B einher, während in den Hodgkin Lymphom Zelllinien durch eine CD40 Stimulation keine bzw. keine nennenswerte Erhöhung der Aktivitäten der beiden bereits konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktoren erreicht werden konnte. Das mangelhafte Ansprechen der Hodgkin Lymphom Zelllinien auf CD40 Stimulation war wahrscheinlich nicht durch unterschiedliche Formen des Rezeptors CD40 bedingt, da in beiden Lymphomtypen Spleißvarianten von CD40 in ähnlicher Größe nachgewiesen werden konnten. IP-10 und RANTES wurden darüber hinaus in solchen Burkitt Lymphom Zelllinien verstärkt produziert, die das Onkoprotein LMP1 des EBV exprimierten. In EBV positiven Hodgkin Lymphomen ist die IP-10 Expression erhöht. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass dies auch auf die Wirkung von LMP1 zurückzuführen ist. IP-10 ist unter

anderem ein potentes chemotaktisches Agens für T-Lymphozyten. Es könnte somit für die Entstehung und Aufrechterhaltung des charakteristischen T-Zell Infiltrates mitverantwortlich sein.

Ein von Hodgkin Lymphom Zelllinien differentiell exprimierter Chemokinrezeptor ist der Lymphozyten-*Homing*-Rezeptor CCR7. Er konnte in drei von vier Zelllinien sowie bei zwei von sechs klassischen Hodgkin Lymphom Biopsien in den primären Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen nachgewiesen werden. In sechs von sieben klassischen Hodgkin Lymphom Geweben konnte zudem die Expression seines Liganden, des CC-Chemokins *secondary-lymphoid-tissue-derived chemokine* (SLC), in den Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen beobachtet werden. Allen Lymphomzelllinien gemeinsam ist eine konstitutive CXCR4 Expression. Chemotaxisanalysen zeigten, dass die Rezeptoren CCR7 und CXCR4 in einem Teil der Zelllinien tatsächlich funktionsfähig sind. Im Gegensatz zum Hodgkin Lymphom besteht das Burkitt Lymphom überwiegend aus neoplastischen Zellen und kommt hauptsächlich extranodal vor. Die Burkitt Lymphom Zelllinien zeigten weder eine konstitutive noch eine induzierbare Expression von CCR7. So könnte die CXCR4 Expression in Burkitt Lymphom Zellen an der Emigration aus dem Lymphknoten und an der Metastasierung beteiligt sein, während beim Hodgkin Lymphom die *Homing*-Funktion des Rezeptors CCR7 überwiegt.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Chemokine und deren Rezeptoren an der Pathogenese des charakteristischen Infiltrates des Hodgkin Lymphoms beteiligt sind.

Literaturverzeichnis

- [1] Adachi, S.; Kuwata, T.; Miyaike, M. und Iwata, M.: Induction of CCR7 expression in thymocytes requires both ERK signal and Ca²⁺ signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 1188–1193 (2001).
- [2] Adcock, I. M.: Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF- κ B. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **52**, 178–186 (1997).
- [3] Aicher, A.; Shu, G. L.; Magaletti, D.; Mulvania, T.; Pezzutto, A.; Craxton, A. und Clark, E. A.: Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J. Immunol.* **163**, 5786–5795 (1999).
- [4] Akira, S.; Hirano, T.; Taga, T. und Kishimoto, T.: Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* **4**, 2860–2867 (1990).
- [5] Alessi, D. R.; Cuenda, A.; Cohen, P.; Dudley, D. T. und Saltiel, A. R.: PD 098059 is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489–27494 (1995).
- [6] Andoh, A.; Fujino, S.; Bamba, S.; Araki, Y.; Okuno, T.; Bamba, T. und Fujiyama, Y.: IL-17 selectively down-regulates TNF- α -induced RANTES gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J. Immunol.* **169**, 1683–1687 (2002).
- [7] Annunziata, C. M.; Safiran, Y. J.; Irving, S. G.; Kasid, U. N. und Cossman, J.: Hodgkin disease: pharmacologic intervention of the CD40-NF κ B pathway by a protease inhibitor. *Blood* **96**, 2841–2848 (2000).
- [8] Arai, K. I.; Lee, F.; Miyajima, A.; Miyatake, S.; Arai, N. und Yokota, T.: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 783–836 (1990).

- [9] Ardeshna, K. M.; Pizzey, A. R.; Walker, S. J.; Devereux, S. und Khwaja, A.: The upregulation of CC chemokine receptor 7 and the increased migration of maturing dendritic cells to macrophage inflammatory protein 3 β and secondary lymphoid chemokine is mediated by the p38 stress-activated protein kinase pathway. *Br. J. Haematol.* **119**, 826–829 (2002).
- [10] Au, W. C.; Moore, P. A.; LaFleur, D. W.; Tombal, B. und Pitha, P. M.: Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *J. Biol. Chem.* **273**, 29210–29217 (1998).
- [11] Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. und Struhl, K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, 2002.
- [12] Baggiolini, M.: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565–568 (1998).
- [13] Banchereau, J.; Bazan, F.; Blanchard, D.; Briere, F.; Galizzi, J. P.; van Kooten, C.; Liu, Y. J.; Rousset, F. und Saeland, S.: The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 881–922 (1994).
- [14] Bargou, R. C.; Emmerich, F.; Krappmann, D.; Bommert, K.; Mapara, M. Y.; Arnold, W.; Royer, H. D.; Grinstein, E.; Greiner, A.; Scheidereit, C. und Dörken, B.: Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 2961–2969 (1997).
- [15] Bargou, R. C.; Leng, C.; Krappmann, D.; Emmerich, F.; Mapara, M. Y.; Bommert, K.; Royer, H. D.; Scheidereit, C. und Dörken, B.: High-level nuclear NF- κ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **87**, 4340–4347 (1996).
- [16] Barker, J. N.; Jones, M. L.; Mitra, R. S.; Crockett-Torabe, E.; Fantone, J. C.; Kunkel, S. L.; Warren, J. S.; Dixit, V. M. und Nickoloff, B. J.: Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *Am. J. Pathol.* **139**, 869–876 (1991).
- [17] Beaubien, B. C.; Collins, P. D.; Jose, P. J.; Totty, N. F.; Hsuan, J.; Waterfield, M. D. und Williams, T. J.: A novel neutrophil chemoattractant generated

- during an inflammatory reaction in the rabbit peritoneal cavity in vivo. Purification, partial amino acid sequence and structural relationship to interleukin 8. *Biochem. J.* **271**, 797–801 (1990).
- [18] Beck, A.; Pazolt, D.; Grabenbauer, G. G.; Nicholls, J. M.; Herbst, H.; Young, L. S. und Niedobitek, G.: Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. *J. Pathol.* **194**, 145–151 (2001).
- [19] Belperio, J. A.; Keane, M. P.; Arenberg, D. A.; Addison, C. L.; Ehlert, J. E.; Burdick, M. D. und Strieter, R. M.: CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 1–8 (2000).
- [20] Bendtzen, K.: Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol. Lett.* **19**, 183–191 (1988).
- [21] van den Berg, A.; Visser, L. und Poppema, S.: High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am. J. Pathol.* **154**, 1685–1691 (1999).
- [22] Bonifacino, J. S.; Dasso, M.; Harford, J. B.; Lippincott-Schwartz, J. und Yamada, K. M.: *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley and Sons, New York, 2002.
- [23] Braeuninger, A.; Küppers, R.; Strickler, J. G.; Wacker, H. H.; Rajewsky, K. und Hansmann, M. L.: Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9337–9342 (1997).
- [24] Buri, C.; Körner, M.; Scharli, P.; Cefai, D.; Uguccioni, M.; Mueller, C.; Laissue, J. A. und Mazzucchelli, L.: CC chemokines and the receptors CCR3 and CCR5 are differentially expressed in the nonneoplastic leukocytic infiltrates of Hodgkin disease. *Blood* **97**, 1543–1548 (2001).
- [25] Burrichter, H.; Heit, W.; Schaadt, M.; Kirchner, H. und Diehl, V.: Production of colony-stimulating factors by Hodgkin cell lines. *Int. J. Cancer* **31**, 269–274 (1983).

- [26] Burrows, L. J.; Piper, P. J.; Lindley, I. D. und Westwick, J.: Intra-peritoneal injection of human recombinant neutrophil-activating factor/interleukin 8 (hrNAF/IL-8) produces a T cell and eosinophil infiltrate in the guinea pig lung. Effect of PAF antagonist WEB2086. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **629**, 422–424 (1991).
- [27] Cabannes, E.; Khan, G.; Aillet, F.; Jarrett, R. F. und Hay, R. T.: Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene* **18**, 3063–3070 (1999).
- [28] Calender, A.; Billaud, M.; Aubry, J. P.; Banchereau, J.; Vuillaume, M. und Lenoir, G. M.: Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8060–8064 (1987).
- [29] Carbone, A.; Canzonieri, V.; Gloghini, A.; Rinaldo, A.; Gaidano, G. und Ferlito, A.: Burkitt's lymphoma: historical background and recent insights into classification and pathogenesis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **109**, 693–702 (2000).
- [30] Carbone, A.; Gloghini, A.; Gattei, V.; Aldinucci, D.; Degan, M.; Paoli, P. D.; Zagonel, V. und Pinto, A.: Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood* **85**, 780–789 (1995).
- [31] Carbone, A.; Gloghini, A.; Gruss, H. J. und Pinto, A.: CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* **147**, 912–922 (1995).
- [32] Chan, W. C.: Cellular origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma: immunophenotypic and molecular studies. *Semin. Hematol.* **36**, 242–252 (1999).
- [33] Cheng, G.; Nazar, A. S.; Shin, H. S.; Vanguri, P. und Shin, M. L.: IP-10 gene transcription by virus in astrocytes requires cooperation of ISRE with adjacent κ B site but not IRF-1 or viral transcription. *J. Interferon Cytokine Res.* **18**, 987–997 (1998).

- [34] Chomczynski, P. und Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
- [35] Craxton, A.; Shu, G.; Graves, J. D.; Saklatvala, J.; Krebs, E. G. und Clark, E. A.: p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J. Immunol.* **161**, 3225–3236 (1998).
- [36] Cyster, J. G.: Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286**, 2098–2102 (1999).
- [37] D'Amico, G.; Frascaroli, G.; Bianchi, G.; Transidico, P.; Doni, A.; Vecchi, A.; Sozzani, S.; Allavena, P. und Mantovani, A.: Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat. Immunol.* **1**, 387–391 (2000).
- [38] Diehl, V.; Pfreundschuh, M.; Fonatsch, C.; Stein, H.; Falk, M.; Burchert, H. und Schaadt, M.: Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications. *Cancer Surv.* **4**, 399–419 (1985).
- [39] Dignam, J. D.; Lebovitz, R. M. und Roeder, R. G.: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475–1489 (1983).
- [40] Dinarello, C. A.: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* **44**, 153–205 (1989).
- [41] Dudley, D. T.; Pang, L.; Decker, S. J.; Bridges, A. J. und Saltiel, A. R.: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7686–7689 (1995).
- [42] Dukers, D. F.; Jaspars, L. H.; Vos, W.; Oudejans, J. J.; Hayes, D.; Cillessen, S.; Middeldorp, J. M. und Meijer, C. J.: Quantitative immunohistochemical analysis of cytokine profiles in Epstein-Barr virus-positive and -negative cases of Hodgkin's disease. *J. Pathol.* **190**, 143–149 (2000).
- [43] Emmerich, F.; Meiser, M.; Hummel, M.; Demel, G.; Foss, H. D.; Jundt, F.; Mathas, S.; Krappmann, D.; Scheidereit, C.; Stein, H. und Dörken, B.: Overexpression of $I\kappa B\alpha$ without inhibition of NF- κB activity and mutations in the $I\kappa B\alpha$ gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* **94**, 3129–3134 (1999).

- [44] Feller, A. C. und Merz, H.: Cytokines and malignant lymphomas. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **76**, 70–78 (1992).
- [45] Fesus, L.: Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Lett.* **328**, 1–5 (1993).
- [46] Ford, R. J.; Mehta, S.; Davis, F. und Maizel, A. L.: Growth factors in Hodgkin's disease. *Cancer Treat. Rep.* **66**, 633–638 (1982).
- [47] Foss, H. D.; Hummel, M.; Gottstein, S.; Ziemann, K.; Falini, B.; Herbst, H. und Stein, H.: Frequent expression of IL-7 gene transcripts in tumor cells of classical Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* **146**, 33–39 (1995).
- [48] Foss, H. D.; Marafioti, T. und Stein, H.: Hodgkin lymphoma. Classification and pathogenesis. *Pathologe* **21**, 113–123 (2000).
- [49] Francis, D. A.; Karras, J. G.; Ke, X. Y.; Sen, R. und Rothstein, T. L.: Induction of the transcription factors NF- κ B, AP-1 and NF-AT during B cell stimulation through the CD40 receptor. *Int. Immunol.* **7**, 151–161 (1995).
- [50] Gassen, H. G. und Schrimpf, G., Herausgeber: *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1999, 2. Auflage.
- [51] Genin, P.; Algarte, M.; Roof, P.; Lin, R. und Hiscott, J.: Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF- κ B and IFN-regulatory factor transcription factors. *J. Immunol.* **164**, 5352–5361 (2000).
- [52] Gärtner, B. C. und Müller-Lantzsch, N.: Epstein-Barr-Virus-Infektionen: Mononukleose und EBV-assoziierte maligne Erkrankungen. In Köhler, W.; Eggers, H. J.; Fleischer, B.; Marre, R.; Pfister, H. und Pulverer, G., Herausgeber, *Medizinische Mikrobiologie*, Kapitel 6.4.5, S. 584–589. Urban & Fischer, München, 2001, 8. Auflage.
- [53] Gruss, H. J.; Hirschstein, D.; Wright, B.; Ulrich, D.; Caligiuri, M. A.; Barcos, M.; Strockbine, L.; Armitage, R. J. und Dower, S. K.: Expression and function of CD40 on Hodgkin and Reed-Sternberg cells and the possible relevance for Hodgkin's disease. *Blood* **84**, 2305–2314 (1994).
- [54] Hansson, M.: Growth and differentiation factors for B and T cells. *Leuk. Res.* **14**, 705–710 (1990).

- [55] Harris, N. L.: Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading. *Semin. Hematol.* **36**, 220–232 (1999).
- [56] Harris, N. L.; Jaffe, E. S.; Diebold, J.; Flandrin, G.; Müller-Hermelink, H. K.; Vardiman, J.; Lister, T. A. und Bloomfield, C. D.: The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting—Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol. J.* **1**, 53–66 (2000).
- [57] Harris, N. L.; Jaffe, E. S.; Stein, H.; Banks, P. M.; Chan, J. K.; Cleary, M. L.; Delsol, G.; Wolf-Peeters, C.; Falini, B. und Gatter, K. C.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361–1392 (1994).
- [58] Hebert, C. A.; Vitangcol, R. V. und Baker, J. B.: Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J. Biol. Chem.* **266**, 18989–18994 (1991).
- [59] Hecht, J. L. und Aster, J. C.: Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3707–3721 (2000).
- [60] Hedrick, J. A. und Zlotnik, A.: Chemokines and chemokine receptors in T-cell development. *Chem. Immunol.* **72**, 57–68 (1999).
- [61] Hedvat, C. V.; Jaffe, E. S.; Qin, J.; Filippa, D. A.; Cordon-Cardo, C.; Tosato, G.; Nimer, S. D. und Teruya-Feldstein, J.: Macrophage-derived chemokine expression in classical Hodgkin's lymphoma: application of tissue microarrays. *Mod. Pathol.* **14**, 1270–1276 (2001).
- [62] Henderson, S.; Rowe, M.; Gregory, C.; Croom-Carter, D.; Wang, F.; Longnecker, R.; Kieff, E. und Rickinson, A.: Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* **65**, 1107–1115 (1991).
- [63] Henriquez, N. V.; Floettmann, E.; Salmon, M.; Rowe, M. und Rickinson, A. B.: Differential responses to CD40 ligation among Burkitt lymphoma lines that are uniformly responsive to Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J. Immunol.* **162**, 3298–3307 (1999).

- [64] Herbst, H.; Foss, H. D.; Samol, J.; Araujo, I.; Klotzbach, H.; Krause, H.; Agathangelou, A.; Niedobitek, G. und Stein, H.: Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood* **87**, 2918–2929 (1996).
- [65] Herbst, H.; Steinbrecher, E.; Niedobitek, G.; Young, L. S.; Brooks, L.; Müller-Lantzsch, N. und Stein, H.: Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. *Blood* **80**, 484–491 (1992).
- [66] Hess, S.; Rensing-Ehl, A.; Schwabe, R.; Bufler, P. und Engelmann, H.: CD40 function in nonhematopoietic cells. Nuclear factor κ B mobilization and induction of IL-6 production. *J. Immunol.* **155**, 4588–4595 (1995).
- [67] Hinz, M.; Löser, P.; Mathas, S.; Krappmann, D.; Dörken, B. und Scheidereit, C.: Constitutive NF- κ B maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **97**, 2798–2807 (2001).
- [68] Hoogewerf, A. J.; Kuschert, G. S.; Proudfoot, A. E.; Borlat, F.; Clark-Lewis, I.; Power, C. A. und Wells, T. N.: Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* **36**, 13570–13578 (1997).
- [69] Höpken, U. E.; Foss, H. D.; Meyer, D.; Hinz, M.; Leder, K.; Stein, H. und Lipp, M.: Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs. *Blood* **99**, 1109–1116 (2002).
- [70] Hsu, P. L. und Hsu, S. M.: Production of tumor necrosis factor- α and lymphotoxin by cells of Hodgkin's neoplastic cell lines HDLM-1 and KM-H2. *Am. J. Pathol.* **135**, 735–745 (1989).
- [71] Hsu, P. L.; Lin, Y. C. und Hsu, S. M.: Expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in two Hodgkin's Reed-Sternberg (H-RS) cell lines, HDLM-1 and KM-H2, and in H-RS cells in tissues. *Int. J. Hematol.* **54**, 315–326 (1991).

- [72] Hsu, S. M.; J. W. Waldron, J.; Hsu, P. L. und A. J. Hough, J.: Cytokines in malignant lymphomas: review and prospective evaluation. *Hum. Pathol.* **24**, 1040–1057 (1993).
- [73] Hsu, S. M.; Krupen, K. und Lachman, L. B.: Heterogeneity of interleukin 1 production in cultured Reed-Sternberg cell lines HDLM-1, HDLM-1d, and KM-H2. *Am. J. Pathol.* **135**, 33–38 (1989).
- [74] Hsu, S. M.; Tseng, C. K. und Hsu, P. L.: Expression of p55 (Tac) interleukin-2 receptor (IL-2R), but not p75 IL-2R, in cultured H-RS cells and H-RS cells in tissues. *Am. J. Pathol.* **136**, 735–744 (1990).
- [75] Hsu, S. M.; Xie, S. S.; Hsu, P. L. und J. A. Waldron, J.: Interleukin-6, but not interleukin-4, is expressed by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease with or without histologic features of Castleman's disease. *Am. J. Pathol.* **141**, 129–138 (1992).
- [76] Hsu, S. M. und Zhao, X.: Expression of interleukin-1 in Reed-Sternberg cells and neoplastic cells from true histiocytic malignancies. *Am. J. Pathol.* **125**, 221–225 (1986).
- [77] Huen, D. S.; Henderson, S. A.; Croom-Carter, D. und Rowe, M.: The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF- κ B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* **10**, 549–560 (1995).
- [78] Li, K. C. und Hromas, R.: Chemokine Regulation of Normal and Pathologic Immune Responses. *Stem Cells* **19**, 388–396 (2001).
- [79] Imai, T.; Hieshima, K.; Haskell, C.; Baba, M.; Nagira, M.; Nishimura, M.; Kakizaki, M.; Takagi, S.; Nomiyama, H.; Schall, T. J. und Yoshie, O.: Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* **91**, 521–530 (1997).
- [80] Izban, K. F.; Ergin, M.; Huang, Q.; Qin, J. Z.; Martinez, R. L.; Schnitzer, B.; Ni, H.; Nickoloff, B. J. und Alkan, S.: Characterization of NF- κ B expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF- κ B results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod. Pathol.* **14**, 297–310 (2001).

- [81] Izban, K. F.; Ergin, M.; Martinez, R. L. und Alkan, S.: Expression of the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) 1 and 2 is a characteristic feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod. Pathol.* **13**, 1324–1331 (2000).
- [82] Jaffe, E. S.; Harris, N. L.; Diebold, J. und Müller-Hermelink, H. K.: World Health Organization Classification of lymphomas: a work in progress. *Ann. Oncol.* **9 Suppl 5**, S25–S30 (1998).
- [83] Jarrett, A. F.; Armstrong, A. A. und Alexander, E.: Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* **7 Suppl 4**, 5–10 (1996).
- [84] Jarrett, R. F. und MacKenzie, J.: Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin. Hematol.* **36**, 260–269 (1999).
- [85] Jücker, M.; Abts, H.; Li, W.; Schindler, R.; Merz, H.; Gunther, A.; von Kalle, C.; Schaadt, M.; Diamantstein, T. und Feller, A. C.: Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. *Blood* **77**, 2413–2418 (1991).
- [86] Jundt, F.; Anagnostopoulos, I.; Bommert, K.; Emmerich, F.; Müller, G.; Foss, H. D.; Royer, H. D.; Stein, H. und Dörken, B.: Hodgkin/Reed-Sternberg Cells Induce Fibroblasts to Secrete Eotaxin, a Potent Chemoattractant for T Cells and Eosinophils. *Blood* **94**, 2065–2071 (1999).
- [87] Jung, S. und Littman, D. R.: Chemokine receptors in lymphoid organ homeostasis. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 319–325 (1999).
- [88] Kadin, M. E.; Agnarsson, B. A.; Ellingsworth, L. R. und Newcom, S. R.: Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor- β in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* **136**, 1209–1214 (1990).
- [89] Kamesaki, H.; Fukuhara, S.; Tatsumi, E.; Uchino, H.; Yamabe, H.; Miwa, H.; Shirakawa, S.; Hatanaka, M. und Honjo, T.: Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood* **68**, 285–292 (1986).
- [90] Kanzler, H.; Küppers, R.; Hansmann, M. L. und Rajewsky, K.: Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth

- of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J. Exp. Med.* **184**, 1495–1505 (1996).
- [91] Kaplan, A. P.: Chemokines, chemokine receptors and allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **124**, 423–431 (2001).
- [92] Kapp, U.; Yeh, W. C.; Patterson, B.; Elia, A. J.; Kägi, D.; Ho, A.; Hessel, A.; Tipsword, M.; Williams, A.; Mirtsos, C.; Itie, A.; Moyle, M. und Mak, T. W.: Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1939–1946 (1999).
- [93] Kim, C. H. und Broxmeyer, H. E.: Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 6–15 (1999).
- [94] Knecht, H.; Berger, C.; Rothenberger, S.; Odermatt, B. F. und Brousset, P.: The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation. *Oncology* **60**, 289–302 (2001).
- [95] van Kooten, C.: Immune regulation by CD40-CD40-L interactions – 2; Y2K update. *Front Biosci.* **5**, D880–693 (2000).
- [96] Küppers, R.; Klein, U.; Hansmann, M. L. und Rajewsky, K.: Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1520–1529 (1999).
- [97] Küppers, R.; Rajewsky, K.; Zhao, M.; Simons, G.; Laumann, R.; Fischer, R. und Hansmann, M. L.: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10962–10966 (1994).
- [98] Krappmann, D.; Emmerich, F.; Kordes, U.; Scharschmidt, E.; Dörken, B. und Scheidereit, C.: Molecular mechanisms of constitutive NF- κ B/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* **18**, 943–953 (1999).
- [99] Kuschert, G. S.; Coulin, F.; Power, C. A.; Proudfoot, A. E.; Hubbard, R. E.; Hoogewerf, A. J. und Wells, T. N.: Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* **38**, 12959–12968 (1999).

- [100] Laherty, C. D.; Hu, H. M.; Opipari, A. W.; Wang, F. und Dixit, V. M.: The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor κ B. *J. Biol. Chem.* **267**, 24157–24160 (1992).
- [101] Lali, F. V.; Hunt, A. E.; Turner, S. J. und Foxwell, B. M.: The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 7395–7402 (2000).
- [102] Lenoir, G. M.; Vuillaume, M. und Bonnardel, C.: The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci. Publ. S.* 309–318 (1985).
- [103] Leopoldt, D.; Hanck, T.; Exner, T.; Maier, U.; Wetzker, R. und Nurnberg, B.: $G\beta\gamma$ stimulates phosphoinositide 3-kinase- γ by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.* **273**, 7024–7029 (1998).
- [104] Lu, R.; Moore, P. A. und Pitha, P. M.: Stimulation of IRF-7 Gene Expression by Tumor Necrosis Factor- α . Requirement for NF κ B Transcription Factor and Gene Accessibility. *J. Biol. Chem.* **277**, 16592–16598 (2002).
- [105] Luciani, M. G.; Stoppacciaro, A.; Peri, G.; Mantovani, A. und Ruco, L. P.: The monocyte chemotactic protein a (MCP-1) and interleukin 8 (IL-8) in Hodgkin's disease and in solid tumours. *Mol. Pathol.* **51**, 273–276 (1998).
- [106] Mackay, C. R.: Follicular homing T helper (Th) cells and the Th1/Th2 paradigm. *J. Exp. Med.* **192**, F31–F34 (2000).
- [107] Maggio, E.; van den Berg, A.; Diepstra, A.; Kluiver, J.; Visser, L. und Poppema, S.: Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann. Oncol.* **13 Suppl 1**, 52–56 (2002).
- [108] Maggio, E. M.; van den Berg, A.; Visser, L.; Diepstra, A.; Kluiver, J.; Emmens, R. und Poppema, S.: Common and differential chemokine expression patterns in RS cells of NLP, EBV positive and negative classical Hodgkin lymphomas. *Int. J. Cancer* **99**, 665–672 (2002).

- [109] Majumder, S.; Zhou, L. Z.; Chaturvedi, P.; Babcock, G.; Aras, S. und Ransohoff, R. M.: p48/STAT-1 α -containing complexes play a predominant role in induction of IFN- γ -inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN- γ alone or in synergy with TNF- α . *J. Immunol.* **161**, 4736–4744 (1998).
- [110] Marafioti, T.; Hummel, M.; Anagnostopoulos, I.; Foss, H. D.; Falini, B.; Delsol, G.; Isaacson, P. G.; Pileri, S. und Stein, H.: Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N. Engl. J. Med.* **337**, 453–458 (1997).
- [111] Marafioti, T.; Hummel, M.; Foss, H. D.; Laumen, H.; Korbjuhn, P.; Anagnostopoulos, I.; Lammert, H.; Demel, G.; Theil, J.; Wirth, T. und Stein, H.: Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* **95**, 1443–1450 (2000).
- [112] Mathas, S.; Hinz, M.; Anagnostopoulos, I.; Krappmann, D.; Lietz, A.; Jundt, F.; Bommert, K.; Mechta-Grigoriou, F.; Stein, H.; Dörken, B. und Scheiderei, C.: Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- κ B. *EMBO J.* **21**, 4104–4113 (2002).
- [113] Merz, H.; Fliedner, A.; Orscheschek, K.; Binder, T.; Sebald, W.; Müller-Hermelink, H. K. und Feller, A. C.: Cytokine expression in T-cell lymphomas and Hodgkin's disease. Its possible implication in autocrine or paracrine production as a potential basis for neoplastic growth. *Am. J. Pathol.* **139**, 1173–1180 (1991).
- [114] Merz, H.; Houssiau, F. A.; Orscheschek, K.; Renaud, J. C.; Fliedner, A.; Herin, M.; Noel, H.; Kadin, M.; Müller-Hermelink, H. K. und Snick, J. V.: Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood* **78**, 1311–1317 (1991).
- [115] Mühlhardt, C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2000, 2. Auflage.

- [116] Müller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M. E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S. N.; Barrera, J. L.; Mohar, A.; Verastegui, E. und Zlotnik, A.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50–56 (2001).
- [117] Modrow, S. und Falke, D.: Das Epstein-Barr-Virus. In *Molekulare Virologie*, S. 454–460. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998, 1. Auflage.
- [118] Munro, J. M.; Freedman, A. S.; Aster, J. C.; Gribben, J. G.; Lee, N. C.; Rhyndhart, K. K.; Banchereau, J. und Nadler, L. M.: In vivo expression of the B7 costimulatory molecule by subsets of antigen-presenting cells and the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood* **83**, 793–798 (1994).
- [119] Murphy, P. M.; Baggiolini, M.; Charo, I. F.; Hebert, C. A.; Horuk, R.; Matsushima, K.; Miller, L. H.; Oppenheim, J. J. und Power, C. A.: International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 145–176 (2000).
- [120] Murphy, W. J.; Taub, D. D.; Anver, M.; Conlon, K.; Oppenheim, J. J.; Kelvin, D. J. und Longo, D. L.: Human RANTES induces the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues of mice with severe combined immune deficiency. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1823–1827 (1994).
- [121] Murray, H. W.: Interferon- γ , the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann. Intern. Med.* **108**, 595–608 (1988).
- [122] Nagasawa, T.; Hirota, S.; Tachibana, K.; Takakura, N.; Nishikawa, S.; Kitamura, Y.; Yoshida, N.; Kikutani, H. und Kishimoto, T.: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**, 635–638 (1996).
- [123] Neville, L. F.; Mathiak, G. und Bagasra, O.: The immunobiology of interferon- γ inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 207–219 (1997).
- [124] Newcom, S. R.; Kadin, M. E. und Ansari, A. A.: Production of transforming growth factor- β activity by Ki-1 positive lymphoma cells and

- analysis of its role in the regulation of Ki-1 positive lymphoma growth. *Am. J. Pathol.* **131**, 569–577 (1988).
- [125] Nguyen, H.; Hiscott, J. und Pitha, P. M.: The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 293–312 (1997).
- [126] Nguyen, P. L.; Harris, N. L.; Ritz, J. und Robertson, M. J.: Expression of CD95 antigen and Bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* **148**, 847–853 (1996).
- [127] Niedobitek, G.; Meru, N. und Delecluse, H. J.: Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int. J. Exp. Pathol.* **82**, 149–170 (2001).
- [128] O'Grady, J. T.; Stewart, S.; Lowrey, J.; Howie, S. E. und Krajewski, A. S.: CD40 expression in Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* **144**, 21–26 (1994).
- [129] Ohshima, K.; Sugihara, M.; Suzumiya, J.; Haraoka, S.; Kanda, M.; Shimazaki, K.; Katoh, K.; Kumagawa, M. und Kikuchi, M.: Basic fibroblast growth factor and fibrosis in Hodgkin's disease. *Pathol. Res. Pract.* **195**, 149–155 (1999).
- [130] Ohshima, K.; Tutiya, T.; Yamaguchi, T.; Suzuki, K.; Suzumiya, J.; Kawasaki, C.; Haraoka, S. und Kikuchi, M.: Infiltration of Th1 and Th2 lymphocytes around Hodgkin and Reed-Sternberg (H&RS) cells in Hodgkin disease: Relation with expression of CXC and CC chemokines on H&RS cells. *Int. J. Cancer* **98**, 567–572 (2002).
- [131] Oka, S.; Kamata, H.; Kamata, K.; Yagisawa, H. und Hirata, H.: N-acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinases. *FEBS Lett.* **472**, 196–202 (2000).
- [132] Olson, T. S. und Ley, K.: Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **283**, R7–28 (2002).
- [133] Paietta, E.; Racevskis, J.; Stanley, E. R.; Andreeff, M.; Papenhausen, P. und Wiernik, P. H.: Expression of the macrophage growth factor, CSF-1 and its receptor c-fms by a Hodgkin's disease-derived cell line and its variants. *Cancer Res.* **50**, 2049–2055 (1990).

- [134] Peh, S. C.; Kim, L. H. und Poppema, S.: TARC, a CC chemokine, is frequently expressed in classic Hodgkin's lymphoma but not in NLP Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and most cases of anaplastic large cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **25**, 925–929 (2001).
- [135] Pierce, G. F.; Vande, B. J.; Rudolph, R.; Tarpley, J. und Mustoe, T. A.: Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- β 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *Am. J. Pathol.* **138**, 629–646 (1991).
- [136] Piguet, P. F.; Collart, M. A.; Grau, G. E.; Kapanci, Y. und Vassalli, P.: Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J. Exp. Med.* **170**, 655–663 (1989).
- [137] Pileri, S. A.; Ascani, S.; Leoncini, L.; Sabattini, E.; Zinzani, P. L.; Piccaluga, P. P.; A. Pileri, J.; Giunti, M.; Falini, B.; Bolis, G. B. und Stein, H.: Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J. Clin. Pathol.* **55**, 162–176 (2002).
- [138] Poppema, S.; Potters, M.; Emmens, R.; Visser, L. und van den Berg, A.: Immune reactions in classical Hodgkin's lymphoma. *Semin. Hematol.* **36**, 253–259 (1999).
- [139] Poppema, S. und Visser, L.: Epstein-Barr virus positivity in Hodgkin's disease does not correlate with an HLA A2-negative phenotype. *Cancer* **73**, 3059–3063 (1994).
- [140] Postlethwaite, A. E. und Seyer, J. M.: Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor- α (TNF- α) and a synthetic TNF- α 31-68 peptide. *J. Exp. Med.* **172**, 1749–1756 (1990).
- [141] Ralph, P.; Warren, M. K.; Nakoinz, I.; Lee, M. T.; Brindley, L.; Sampson-Johannes, A.; Kawasaki, E. S.; Ladner, M. B.; Strickler, J. E. und Boosman, A.: Biological properties and molecular biology of the human macrophage growth factor, CSF-1. *Immunobiology* **172**, 194–204 (1986).
- [142] Roberts, A. B.; Sporn, M. B.; Assoian, R. K.; Smith, J. M.; Roche, N. S.; Wakefield, L. M.; Heine, U. I.; Liotta, L. A.; Falanga, V. und Kehrl, J. H.: Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4167–4171 (1986).

- [143] Romeo, D. S. und Mizel, S. B.: Partial purification of an immunosuppressive protein from a human tumor cell line and analysis of its relationship to transforming growth factor- β . *Cell Immunol.* **122**, 483–492 (1989).
- [144] Rossi, D. und Zlotnik, A.: The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 217–242 (2000).
- [145] Ruco, L. P.; Pomponi, D.; Pigott, R.; Stoppacciaro, A.; Monardo, F.; Uccini, S.; Boraschi, D.; Tagliabue, A.; Santoni, A. und Dejana, E.: Cytokine production (IL-1 α , IL-1 β , and TNF- α) and endothelial cell activation (ELAM-1 and HLA-DR) in reactive lymphadenitis, Hodgkin's disease, and in non-Hodgkin's lymphomas. An immunocytochemical study. *Am. J. Pathol.* **137**, 1163–1171 (1990).
- [146] Sallusto, F.; Kremmer, E.; Palermo, B.; Hoy, A.; Ponath, P.; Qin, S.; Förster, R.; Lipp, M. und Lanzavecchia, A.: Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2037–2045 (1999).
- [147] Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. und Mackay, C. R.: Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today* **19**, 568–574 (1998).
- [148] Sallusto, F.; Lenig, D.; Förster, R.; Lipp, M. und Lanzavecchia, A.: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
- [149] Sallusto, F.; Schärli, P.; Loetscher, P.; Scharniel, C.; Lenig, D.; Mackay, C. R.; Qin, S. und Lanzavecchia, A.: Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2760–2769 (1998).
- [150] Sambrook, J. und Russell, D. W.: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001, 3. Auflage.
- [151] Samoszuk, M. und Nansen, L.: Detection of interleukin-5 messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with eosinophilia. *Blood* **75**, 13–16 (1990).

- [152] Scandella, E.; Men, Y.; Gillessen, S.; Förster, R. und Groettrup, M.: Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **100**, 1354–1361 (2002).
- [153] Schaadt, M.; Diehl, V.; Stein, H.; Fonatsch, C. und Kirchner, H. H.: Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* **26**, 723–731 (1980).
- [154] Schreiber, E.; Matthias, P.; Müller, M. M. und Schaffner, W.: Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419 (1989).
- [155] Seitz, V.; Hummel, M.; Marafioti, T.; Anagnostopoulos, I.; Assaf, C. und Stein, H.: Detection of clonal T-cell receptor γ -chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* **95**, 3020–3024 (2000).
- [156] Sgadari, C.; Angiolillo, A. L.; Cherney, B. W.; Pike, S. E.; Farber, J. M.; Koniaris, L. G.; Vanguri, P.; Burd, P. R.; Sheikh, N.; Gupta, G.; Teruya-Feldstein, J. und Tosato, G.: Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13791–13796 (1996).
- [157] Skinnider, B. F. und Mak, T. W.: The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**, 4283–4297 (2002).
- [158] Sotsios, Y.; Blair, P. J.; Westwick, J. und Ward, S. G.: Disparate effects of phorbol esters, CD3 and the costimulatory receptors CD2 and CD28 on RANTES secretion by human T lymphocytes. *Immunology* **101**, 30–37 (2000).
- [159] Sozzani, S.; Allavena, P.; D'Amico, G.; Luini, W.; Bianchi, G.; Kataura, M.; Imai, T.; Yoshie, O.; Bonecchi, R. und Mantovani, A.: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* **161**, 1083–1086 (1998).
- [160] Stein, H. und Hummel, M.: Cellular origin and clonality of classic Hodgkin's lymphoma: immunophenotypic and molecular studies. *Semin. Hematol.* **36**, 233–241 (1999).

- [161] Strieter, R. M.; Polverini, P. J.; Arenberg, D. A. und Kunkel, S. L.: The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock* **4**, 155–160 (1995).
- [162] Strieter, R. M.; Polverini, P. J.; Kunkel, S. L.; Arenberg, D. A.; Burdick, M. D.; Kasper, J.; Dzuiba, J.; Damme, J. V.; Walz, A. und Marriott, D.: The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 27348–27357 (1995).
- [163] Struyf, S.; Meester De, I.; Scharpe, S.; Lenaerts, J. P.; Menten, P.; Wang, J. M.; Proost, P. und Damme, J. V.: Natural truncation of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC chemokine inhibitor. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1262–1271 (1998).
- [164] Tanaka, Y.; Adams, D. H. und Shaw, S.: Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today* **14**, 111–115 (1993).
- [165] Teruya-Feldstein, J.; Jaffe, E. S.; Burd, P. R.; Kingma, D. W.; Setsuda, J. E. und Tosato, G.: Differential Chemokine Expression in Tissues Involved by Hodgkin's Disease: Direct Correlation of Eotaxin Expression and Tissue Eosinophilia. *Blood* **93**, 2463–2470 (1999).
- [166] Teruya-Feldstein, J.; Tosato, G. und Jaffe, E. S.: The role of chemokines in Hodgkin's disease. *Leuk. Lymphoma* **38**, 363–371 (2000).
- [167] Tone, M.; Tone, Y.; Fairchild, P. J.; Wykes, M. und Waldmann, H.: Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1751–1756 (2001).
- [168] Tsukamoto, N.; Kobayashi, N.; Azuma, S.; Yamamoto, T. und Inoue, J.: Two differently regulated nuclear factor κ B activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1234–1239 (1999).
- [169] Uchida, J.; Yasui, T.; Takaoka-Shichijo, Y.; Muraoka, M.; Kulwichit, W.; Raab-Traub, N. und Kikutani, H.: Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* **286**, 300–303 (1999).

- [170] Voermans, C.; van Hennik, P. B. und Schoot, C. E. D.: Homing of human hematopoietic stem and progenitor cells: new insights, new challenges? *J. Hematother. Stem Cell Res.* **10**, 725–738 (2001).
- [171] Whicher, J. T. und Evans, S. W.: Cytokines in disease. *Clin. Chem.* **36**, 1269–1281 (1990).
- [172] Willimann, K.; Legler, D. F.; Loetscher, M.; Roos, R. S.; Delgado, M. B.; Clark-Lewis, I.; Baggiolini, M. und Moser, B.: The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2025–2034 (1998).
- [173] Wolf, J.; Kapp, U.; Bohlen, H.; Kornacker, M.; Schoch, C.; Stahl, B.; Mucke, S.; von Kalle, C.; Fonatsch, C.; Schaefer, H. E.; Hansmann, M. L. und Diehl, V.: Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* **87**, 3418–3428 (1996).
- [174] Wood, K. M.; Roff, M. und Hay, R. T.: Defective κ Balpha in Hodgkin cell lines with constitutively active NF- κ B. *Oncogene* **16**, 2131–2139 (1998).
- [175] Zhang, L. und Pagano, J. S.: IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5748–5757 (1997).
- [176] Zhang, L. und Pagano, J. S.: Interferon regulatory factor 7 is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J. Virol.* **74**, 1061–1068 (2000).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Pfister danke ich für die Aufnahme in das Institut, die Betreuung meiner Arbeit und die kritische Diskussion dieser Dissertation.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann dafür bedanken, dass er ohne Zögern die Zweitbetreuung übernommen hat und immer sein Interesse am Fortschritt der Arbeit bekundet hat.

Mein Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. S. Smola, für die Bereitstellung des Projektes und ihre kompetente Betreuung.

Bei Herrn Dr. D. Re und Herrn Prof. Dr. V. Diehl möchte ich mich für die Bereitstellung der Biopsien und Zelllinien bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Priv. Doz. Dr. C. Wickenhauser bedanken, die mir mit Rat und Tat bei den Problemen der Immunhistochemie beiseite stand und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Danken möchte ich den Mitarbeitern des Smola-Labors für die angenehme Zusammenarbeit. Vor allem Ute Sandaradura de Silva und Corinna Pick, die mir zur Hand gingen, wenn meine Zeit nicht ausreichte.

Ich möchte mich ganz besonders bei Korinna Hinterkeuser bedanken, die mit meinen Fragen gelöchert wurde und stets bemüht war, eine Antwort zu finden. Ihre motivierende Art und tatkräftige Unterstützung haben mir während der Doktorarbeit sehr weitergeholfen.

Mein Dank gilt all denen, die diese Arbeit ganz oder in Teilen Korrektur gelesen haben.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für ihre Kooperationsbereitschaft und eine angenehme Atmosphäre.

Danken möchte ich meiner Familie, die immer für mich da ist und mich gerade in der letzten Phase der Doktorarbeit tatkräftige unterstützt hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden Corinna, Julia, Jo, Korinna

und Mareike bedanken, die mir geholfen haben, mein Stroh-Single-Leben einigermaßen angenehm zu überstehen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Freund Jochen bedanken. Er hat trotz seiner Abwesenheit erheblich dazu beigetragen, den Fortschritt dieser Arbeit voranzutreiben. Durch seinen eigenen beruflichen Ehrgeiz und sein Hinterfragen meiner Probleme hat er oft Energie zum Arbeiten in mir geweckt.

Hiermit erkläre ich gemäß §8 Abs.4 der Promotionsordnung, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen, Hilfen und Hilfsmittel benutzt habe.

Köln, Dezember 2002