

Aus dem Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum  
für Gesundheit und Umwelt, Abteilung Genvektoren  
Aufsichtsratsvorsitzende: Ministerialdirektorin Bärbel Brumme-Bothe

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

---

**Die Rolle des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B  
Transkriptionsfaktors RelB in murinen B-Zellen und  
B-Zelllymphomen**

---



vorgelegt von Stefanie Sarah Zapf

aus Offenburg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München.

Betreuerin/Erstgutachter: Frau PD Dr. rer. nat. Ursula Zimmer-Strobl

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires

Dekan der Medizinischen Fakultät: Herr Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2017

*Für meine Familie.*

*„Wohin ich auch gehe, ich werde nie vergessen wer mir half dorthin zu  
kommen.“*

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>III</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>IV</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	DIE IMMUNABWEHR.....	1
1.2	B-LYMPHOZYTEN.....	1
1.2.1	Die Entstehung von B-Lymphozyten.....	1
1.2.2	Die sekundären lymphatischen Organe.....	4
1.2.3	Die Aktivierung von B-Zellen.....	5
1.2.4	Der CD40- und der BAFF-Rezeptor.....	6
1.3	DER NF- $\kappa$ B SIGNALWEG.....	8
1.3.1	Der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg.....	10
1.3.2	Die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges.....	10
1.4	DIE BEDEUTUNG DES CD40 UND NICHT-KANONISCHEN NF- $\kappa$ B SIGNALWEGES IN DER TUMORGENESE.....	13
1.5	MAUSMODELLE.....	14
1.5.1	Die RelB <sup>fl/fl</sup> Mäuse.....	14
1.5.2	Die LMP1/CD40 <sup>fl/stop</sup> Mäuse.....	15
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>18</b>
3.1	DER EINFLUSS DES NICHT-KANONISCHEN NF- $\kappa$ B SIGNALWEGES AUF DAS B-ZELLKOMPARTIMENT IN DEN SEKUNDÄREN LYMPHOIDEN ORGANEN.....	18
3.1.1	Die Expression der nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Komponenten in B-Zellen nach der Cre vermittelten Deletion.....	18
3.1.2	RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäuse weisen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen eine signifikante Reduktion des Milzgewichtes und der B-Zellzahlen auf.....	19
3.1.3	Die Deletion von RelB in B-Zellen führt zu einer erkennbaren Reduktion der IgM <sup>+</sup> IgD <sup>hoch</sup> B-Zellpopulation in der Milz.....	21
3.1.4	In der Milz von RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäusen sind vorwiegend reife B2 B-Zellen reduziert.....	22
3.1.5	Mäuse mit RelB-defizienten B-Zellen lassen keinen Unterschied in der B1 B-Zellpopulation erkennen.....	24
3.1.7	In der Milz von RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäusen kommt es zu einer Reduktion der T3 transitionalen B-Zellen.....	25
3.1.8	Mäuse mit RelB-defizienten B-Zellen zeigen keine großen Unterschiede bei der prozentualen Verteilung von zirkulierenden B-Zellpopulationen im Blut.....	26
3.2	DIE ROLLE DES NICHT-KANONISCHEN NF- $\kappa$ B SIGNALWEGES FÜR DAS ÜBERLEBEN, DIE AKTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON B-ZELLEN IN VITRO.....	29
3.2.1	Das durch den BAFF Signalweg vermittelte Überleben der reifen B-Zellen wird über RelB reguliert.....	29
3.2.2	Die CD40 Stimulation kann das Überleben von RelB-defizienten B-Zellen verbessern.....	29

3.2.3	RelB-defiziente B-Zellen können durch CD40 Stimulation in vitro aktiviert werden	30
3.2.4	RelB Inaktivierung in B-Zellen hat keinen Einfluss auf die Bildung von Plasmablasten und ist nicht notwendig für den Klassenwechsel zu IgG1 <sup>+</sup> B-Zellen in vitro	31
3.3	DIE BEDEUTUNG DER B-ZELL-SPEZIFISCHEN RELB DELETION UND DES KONSTITUTIV AKTIVEN CD40 SIGNALWEGES AUF DEN B-ZELLPHÄNOTYP IN DER MILZ	32
3.3.1	RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion der Splenomegalie und der B-Zellexpansion im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen	33
3.3.2	Die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen führt zu einer Veränderung des Phänotyps der Marginalzonen und folliculären B-Zellen der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse	33
3.3.3	Marginalzonen B-Zellen der RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse zeigen im Vergleich zu folliculären B-Zellen eine verstärkte Expression des Markers CD1d	35
3.3.4	Nach Inaktivierung von RelB in B-Zellen sitzen CD1d <sup>+</sup> Zellen in der Marginalzone	36
3.3.5	Die verstärkte Differenzierung zu Marginalzonen B-Zellen beginnt in den LMP1/CD40 Mäusen im Prä-Marginalzonen B-Zellstadium	37
3.3.6	LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen weisen unabhängig von RelB eine erhöhte Notch2-Expression auf	37
3.3.7	In der Milz der LMP1/CD40 Mäuse sind vermehrt B1 B-Zellen	39
3.3.8	RelB spielt eine Rolle für das verbesserte Überleben der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen in vitro	41
3.3.9	Die Expression von LMP1/CD40 in B-Zellen hemmt unabhängig von RelB die Differenzierung zu Plasmazellen in vitro und führt zu erniedrigten Antikörpertiter im Blut	44
3.3.10	Der hyperaktive nicht-kanonische Signalweg führt zu einer prozentualen Reduktion von B-Zellen im Blut	46
3.4	DIE BEDEUTUNG VON RELB UND KONSTITUTIV AKTIVEN CD40 SIGNALEN FÜR DIE ENTSTEHUNG VON B-ZELLTUMOREN IN DER MILZ	48
3.4.1	Der hyperaktive nicht-kanonische NF-κB Signalweg spielt eine Rolle für die weitere Zunahme des Milzgewichtes und der B- und T-Zellzahlen in der Milz der LMP1/CD40 Mäuse über die Zeit	49
3.4.2	In LMP1/CD40 Mäusen ohne RelB entwickelt sich die aberrante CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz verzögert	52
3.4.3	Weitere Charakteristika der aberranten CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz der gealterten LMP1/CD40 Mäuse weist weitere Charakteristika auf	55
3.4.4	Die aberrante CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation ist neben der Milz auch im Blut vertreten	58
3.4.5	Gealterte RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre (> 14 Monate) entwickeln im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen zu einer geringeren Inzidenz Tumore in der Milz	60
3.4.6	In gealterten RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen sind kaum naive, jedoch hoch aktivierte T-Zellen in der Milz	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>67</b>
4.1	DIE ROLLE DES NICHT-KANONISCHEN NF-κB SIGNALWEGES AUF DIE B-ZELLDIFFERENZIERUNG IN VIVO	67

4.1.1	Die nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Komponenten werden in den B-Zellen der Milz von RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäusen vermindert exprimiert.....	67
4.1.2	Die Deletion von RelB in B-Zellen führt zu einer Reduktion der reifen B2 Zellen.....	68
4.2	DIE FUNKTION VON RELB FÜR DAS ÜBERLEBEN, DIE AKTIVIERUNG UND DIE DIFFERENZIERUNG DER B-ZELLEN IN VITRO.....	69
4.2.1	RelB-defiziente B-Zellen reagieren verschlechtert auf BAFF Stimulation.....	69
4.2.1	B-Zellen der RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäuse sind aktivierbar und können zu Plasmablasten und IgG1 <sup>+</sup> Zellen differenzieren.....	70
4.3	DIE BEDEUTUNG VON RELB UND DES KONSTITUTIV AKTIVEN CD40 SIGNALWEGES AUF DEN B-ZELLPHÄNOTYP IN DER MILZ.....	71
4.3.1	Die Bedeutung von RelB in der LMP1/CD40 induzierten B-Zell Expansion.....	71
4.3.2	Die Bedeutung von RelB für den veränderten Phänotyp der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse.....	72
4.3.3	Die Bedeutung von RelB für die Lokalisation der B-Zellen der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse in der Milz.....	74
4.3.4	Der Einfluss von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen auf das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung in vitro.....	75
4.3.5	Der hyperaktive nicht-kanonische Signalweg in B-Zellen hat einen Einfluss auf die zirkulierenden B-Zellen im Blut.....	77
4.4	DER VERSTÄRKT AKTIVE NICHT-KANONISCHE NF- $\kappa$ B SIGNALWEG IN LMP1/CD40 EXPRIMIERENDEN B-ZELLEN HAT EINEN EINFLUSS AUF DIE ENTSTEHUNG VON B-ZELLYMPHOMEN IN DER MILZ.....	77
4.4.1	Die aberrante CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz entwickelt sich nach Deletion von RelB in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen langsamer.....	78
4.4.2	Die Deletion von RelB in LMP1/CD40 B-Zellen führt zu einer geringeren Tumorzinzidenz in vivo.....	79
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>86</b>
7.1	MAUSSTÄMME (BALB/C HINTERGRUND).....	86
7.2	GENOTYPISIERUNG DER MÄUSE.....	86
7.3	ANTIKÖRPER.....	87
7.3.2	Primäre Antikörper für die Western Blot Analysen.....	87
7.3.2	Sekundäre Antikörper für die Western Blot Analysen.....	87
7.3.3	Antikörper für die FACS-Analysen.....	88
7.3.4	Antikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	88
7.3.5	Antikörper für ELISA.....	88
7.4	IN VITRO STIMULATIONEN.....	88
7.5	MATERIALIEN FÜR DIE SOUTHERN BLOT ANALYSE.....	89
7.6	VEBRAUCHSMATERIAL.....	90
7.7	GERÄTE.....	90
7.8	SOFTWARE.....	90
<b>8</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>90</b>
8.1	DIE ANALYSE DER TRANSGENEN MÄUSE.....	90
8.1.1	Die Mauszüchten.....	90
8.1.2	Präparation primärer Lymphozyten aus der Maus.....	91

---

8.1.3	Bestimmung der Zellzahlen .....	91
8.1.4	Isolierung von B-Zellen aus der Milz .....	92
8.1.5	Präparation von Blutserum .....	92
8.1.6	Der ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	92
8.1.7	Die Durchflusszytometrie (FACS-Analysen).....	93
8.1.7.1	Durchflusszytometrie von Blutzellen .....	93
8.2	ZELLKULTUR.....	94
8.2.1	Überlebensexperimente und Stimulation der B-Zellen in vitro .....	94
8.2.2	Proliferationsassay der B-Zellen in vitro .....	94
8.3	IMMUNHISTOCHEMIE UND IMMUNFLUORESCENZ.....	95
8.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	96
8.4.1	Genotypisierung der Mäuse .....	96
8.4.1.1	DNS Isolierung aus Mäuseohren .....	96
8.4.1.2	Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	96
8.4.1.3	Die Agarose-Gelelektrophorese .....	97
8.4.2	Die Southern Blot Methode (Southern 1975) .....	97
8.4.2.1	Aufbereitung der IgH-Sonde .....	98
8.4.2.2	Isolierung und Verdau genomischer DNS .....	98
8.4.2.3	Herstellung der Southern Blot Membran .....	99
8.4.2.4	Hybridisierung der Southern Blot Membran .....	99
8.4.2.5	Markierung, Inkubation und Entfernen der IgH Sonde .....	100
8.4.3	Die Western Blot Methode .....	101
8.4.3.1	Proteingewinnung aus B-Zellen der Milz.....	101
8.4.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	101
8.4.3.3	Auftrennung der Proteine und das Blotting-Verfahren.....	101
8.4.3.4	Nachweis der Proteine.....	102
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>116</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>117</b>
<b>12</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>118</b>
<b>13</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>118</b>

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entwicklung und Reifung der B-Lymphozyten.....	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der weißen Pulpa in Mäusen.....	5
Abbildung 3: Die B-Zellaktivierung durch Antigene und T-Helferzellen.....	6
Abbildung 4: Schematische Übersicht über den Aufbau der NF- $\kappa$ B Komponenten.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges.....	12
Abbildung 6: Darstellung des rekombinanten RelB-Lokus der RelB <sup>fl/fl</sup> Mauslinie. Das.....	15
Abbildung 7: Darstellung des rekombinanten rosa26-Lokus der LMP1/CD40 <sup>fl/stop</sup> Mauslinie.. .....	15
Abbildung 8: Die nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Komponenten werden in den B-Zellen der Milz von RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre vermindert exprimiert.....	19
Abbildung 9: RelB Inaktivierung in B-Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion des Milzgewichts und der Gesamtzellzahlen.....	20
Abbildung 10: Die B-Zell-spezifische Deletion von RelB führt zu signifikant erniedrigten B- Zellzahlen.....	20
Abbildung 11: Die Inaktivierung von RelB in B-Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion der folliculären B-Zellen in der Milz.....	21
Abbildung 12: Die B-Zell-spezifische Deletion von RelB führt zu einer signifikanten prozentualen Reduktion der folliculären B-Zellen in der Milz.....	22
Abbildung 13: Die Deletion von RelB in B-Zellen führt zu signifikant erniedrigten Marginalzonen und folliculären B-Zellzahlen in der Milz..	23
Abbildung 14: In der Milz der RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Maus erscheint die Marginalzone breiter... .....	23
Abbildung 15: RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäuse weisen keine großen Unterschiede in der B1a und B1b B-Zellpopulation in der Milz auf.....	24
Abbildung 16: In RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäusen kommt es zu einer prozentualen Erhöhung von transitionalen B-Zellen in der Milz.....	25
Abbildung 17: Inaktivierung von RelB in B-Zellen führt zu einer Reduktion der T3 transitionalen B-Zellen.....	26
Abbildung 18: Die Inaktivierung von RelB in B-Zellen hat keinen Einfluss auf das Verhältnis von B- und T-Zellen im Blut.....	27
Abbildung 19: Im Blut der RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäuse sind die folliculären B-Zellen tendenziell reduziert.....	27
Abbildung 20: Im Blut von RelB <sup>fl/fl</sup> //CD19Cre Mäusen zirkulieren prozentual mehr transitionale B-Zellen.....	28
Abbildung 21: RelB ist essentiell für das BAFF vermittelte Überleben der B-Zellen.....	29
Abbildung 22: Das Überleben der RelB-defizienten B-Zellen kann durch $\alpha$ -CD40 Stimulation <i>in vitro</i> verbessert werden.....	30
Abbildung 23: RelB-defiziente B-Zellen können <i>in vitro</i> normal aktiviert werden.....	31
Abbildung 24: RelB ist in B-Zellen nicht essentiell für die Differenzierung zu Plasmablasten und für den Klassenwechsel zu IgG1 <sup>+</sup> B-Zellen.....	32
Abbildung 25: Die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 Mäusen führt zu einer signifikanten Reduktion des Milzgewichtes und der B-Zellzahlen in der Milz.....	33
Abbildung 26: Die Deletion von RelB in LMP1/CD40 Mäusen führt im Vergleich zu LMP1/CD40 Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Marginalzonen B- Zellexpansion zugunsten der folliculären B-Zellen in der Milz.....	34
Abbildung 27: Die CD21 <sup>hoch</sup> CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation in LMP1/CD40 Mäusen exprimiert im Vergleich zu folliculären B-Zellen verstärkt den Marker CD1d.....	35
Abbildung 28: Im Gegensatz zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen sitzen die CD1d <sup>+</sup> Zellen in RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen in der Marginalzone.....	36
Abbildung 29: Konstitutives CD40 treibt die Differenzierung zu Marginalzonen B-Zellen schon ab dem frühen Prä-Stadium.....	37
Abbildung 30: Notch2 wird in den B-Zellen der LMP1/CD40 Mäuse verstärkt exprimiert.....	38
Abbildung 31. Folliculäre B-Zellen der LMP1/CD40 Mäusen exprimieren vermehrt Notch2 auf der Oberfläche.....	38

---

Abbildung 32. <i>In vitro</i> führt die Stimulation mit $\alpha$ -CD40 zu einer verstärkten Notch2 Expression auf der Oberfläche von B-Zellen. ....	39
Abbildung 33. Das konstitutiv aktive CD40 Signal in B-Zellen führt unabhängig von RelB zu signifikant erhöhten B1b Zellzahlen. ....	40
Abbildung 34: RelB spielt eine Rolle für das verbesserte Überleben der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen <i>in vitro</i> . ....	41
Abbildung 35: Die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges hemmt teilweise die Proliferation der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen <i>in vitro</i> . ....	43
Abbildung 36: RelB spielt keine Rolle in den LMP1/CD40 Mäusen für den Klassenwechsel zum IgG1-Isotyp <i>in vitro</i> . ....	44
Abbildung 37: Das konstitutiv aktive CD40 Signal in LMP1/CD40 Mäusen inhibiert unabhängig von RelB die Plasmazelldifferenzierung <i>in vitro</i> . ....	45
Abbildung 38: Erniedrigte Titer verschiedener Immunglobulin-Isotypen im Serum von LMP1/CD40 Mäusen. ....	45
Abbildung 39: Nach Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen zirkulieren wieder vermehrt B-Zellen im Blut. ....	46
Abbildung 40: Im Blut der LMP1/CD40 Mäuse zirkulieren prozentual weniger transitionale T1 und vermehrt B1 B-Zellen. ....	48
Abbildung 41. Das konstitutiv aktive CD40 Signal in LMP1/CD40 Mäusen führt abhängig von RelB zu einer Zunahme des Milzgewichtes und der B- und T-Zellzahlen über die Zeit. ....	49
Abbildung 42. Die aberrante CD21 <sup>niedrig</sup> /CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation entwickelt sich in den Milzen der RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen verzögert. ....	54
Abbildung 43: Das Auftreten der CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz der gealterten RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen ist heterogener. ....	55
Abbildung 44: Die CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz ist B220 <sup>niedrig</sup> und CD19 <sup>hoch</sup> . ....	56
Abbildung 45: Die aberrante B-Zellpopulation der Milz der gealterten LMP1/CD40 Mäuse nimmt einen charakteristischen Phänotyp an. ....	57
Abbildung 46: Das IgM/IgD-B-Zellprofil in der Milz variiert in den gealterten LMP1/CD40 Mäusen. ....	58
Abbildung 47: Die zirkulierenden B- und T-Zellzahlen im Blut sind bei den drei Genotypen vergleichbar mit jungen Mäusen. ....	59
Abbildung 48: Die aberrante CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> B-Zellpopulation zirkuliert auch im Blut. ....	59
Abbildung 49: LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne RelB entwickeln in einem Alter zwischen 10-12 Monate keine B-Zelltumore in der Milz. ....	61
Abbildung 50: RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse entwickeln im Alter ab 15 Monaten zu einer geringeren Inzidenz Tumore in der Milz. ....	62
Abbildung 51: In LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen nehmen vor allem die CD4 <sup>+</sup> T-Zellen über die Zeit zu. ....	65
Abbildung 52. In alten LMP1/CD40 Mäusen sind unabhängig von RelB keine naiven T-Zellen mehr erkennbar und die CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen sind hoch aktiviert. ....	66
Abbildung 53: Prinzip der Southern Blot Methode nach E. M. Southern. ....	98
Abbildung 54: Bindung der IgH Sonde. ....	100

---

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der B- und T-Zellanteile in der Milz der 10-12 Monate alten LMP1/CD40//CD19Cre, RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäuse.....	50
Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der B- und T-Zellanteile in der Milz der > 14 Monate alten LMP1/CD40//CD19Cre, RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäuse.....	51
Tabelle 3 Die Tabelle zeigt die analysierten LMP1/CD40//CD19Cre, RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäuse ab einem Alter von 14 Monaten .	64
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für die Genotypisierung der transgenen Mäuse .....	87
Tabelle 5: Eingesetzte primäre Antikörper für die Western Blot Analysen.....	87
Tabelle 6: Eingesetzte sekundäre Antikörper für die Western Blot Analysen .....	87
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Histologie .....	88
Tabelle 8: Genutzte Reagenzien für die <i>in vitro</i> Stimulation der B-Zellen .....	88
Tabelle 9: Materialien für den EcoRI Verdau der genomischen DNS.....	89
Tabelle 10: PCR Ansatz für jeweils eine Reaktion.....	96
Tabelle 11: PCR-Programme .....	97
Tabelle 12: Ansatz für den Verdau genomischer DNS.....	99

## IV Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BAFFR	BAFF-Rezeptor
B-CLL	chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serum Albumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
°C	Grad Celsius
ca.	circa, ungefähr
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CD40	CD40-Rezeptor
CFSE	Carboxy Fluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
CLL	chronische lymphatische Leukämie
Cre	Protein Rekombinase vom Phagen P1
D	<i>Diversity</i>
DLBCL	<i>diffuse large B cell lymphoma</i>
DLL1	<i>Delta-like 1 Ligand</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modification of the eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FL	Flox: von loxP-Stellen flankierter Bereich
FoB	follikuläre B-Zellen
FRT	Erkennungssequenz der Rekombinase Flip
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRR	<i>Glycin rich region</i>
h	Stunde
HRP	Meerrettich Peroxidase
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICOSL	<i>Inducible T-cell costimulator ligand</i>
Ig	Immunglobulin
Ig $\alpha$ und $\beta$	Immunglobulin-assoziierte Signalmoleküle $\alpha$ und $\beta$
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
I $\kappa$ B	<i>nuclear factor of <math>\kappa</math> light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor</i>
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor <math>\kappa</math>-B kinase subunit</i>
J	<i>Joining</i>

---

JAK	Januskinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	Kilobase
k.D.	keine Daten
kDA	Kilodalton
L	Liter
LMP	latentes Membran-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
loxP	<i>locus of crossing over</i>
LZ	Leuzin-Zipper-ähnliches Motif
M	molar
MACS	<i>Magnetic associated cell sorting</i>
mg	Milligramm
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
μ-Kette	schwere Kette des Immunglobulins
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
MM	Multiples Myelom
MOMA	metallophile Makrophagen
mV	Millivolt
MZ	Marginalzone
MZB	Marginalzonen B-Zellen
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	NEMO Bindedomäne
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NF-κB	nuclear factor κB
NLS	nuclear localization signal
NP40	Nonoxinol 40
OD	optische Dichte
PB	Plasmablasten
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perdinin Chlorophyll Protein
PID	<i>processing-inhibitory domain</i>
Prä-BZR	Prä-B-Zell-Rezeptor
RHD	Rel homologe Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SLC	<i>surrogate light chain</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SZML	<i>splenic marginal zone lymphoma</i>
T B-Zellen	transitionale B-Zellen
T1, T2, T3	transitionale B-Zellen im Stadium 1, 2 oder 3

---

TACI	<i>transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween</i>
T <sub>CM</sub>	Zentrale Gedächtnis T-Zelle
TD	Todesdomäne ( <i>death domain</i> )
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris EDTA
T <sub>EM</sub>	Effektor Gedächtnis T-Zelle
TEMED	N,N,N,N-tetramethylene diamine
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>Unit</i>
u.a.	unter anderem
ün	über Nacht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
x	Mal
z.B.	Zum Beispiel

Begriffe aus dem Englischen sind durch die kursive Schreibweise gekennzeichnet

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Immunabwehr

Unser Körper ist während des Lebens einer Reihe von unterschiedlichen Pathogenen ausgesetzt und zum Schutz vor diesen, haben sich im Laufe der Evolution hochspezialisierte Zelltypen entwickelt, deren Gemeinschaft das Immunsystem bilden. Ausschließlich die Wirbeltiere entwickelten zusätzlich zur angeborenen Immunantwort, eine komplexere und anpassungsfähigere so genannte adaptive Immunantwort. Die Zellen beider Immunabwehrmechanismen entwickeln sich in Säugetieren aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Aus diesen multipotenten Stammzellen werden durch Differenzierung, unter anderem, myeloide und lymphatische Vorläuferzellen gebildet. Die myeloiden Vorläuferzellen differenzieren zu Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen, welche die Hauptakteure des angeborenen Immunsystems bilden. Das angeborene Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, dass es schnell, aber unspezifisch auf potenzielle Krankheitserreger reagiert. Die lymphatischen Vorläufer entwickeln sich zu Lymphozyten, welche sich in B- und T-Lymphozyten untergliedern und zu natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Diese sind für die adaptive Immunantwort verantwortlich, welche sich sehr spezifisch gegen Pathogene und entartete Zellen richtet und auch die Fähigkeit zur Bildung von Gedächtniszellen besitzt. Man unterscheidet bei der adaptiven Immunantwort zwischen humoral und zellulär. Die zelluläre Immunantwort wird von T-Zellen initiiert und ist für die Erkennung und Beseitigung intrazellulärer Erreger wie z.B. Viren verantwortlich. Die humorale Immunantwort wird über B-Zellen vermittelt, welche Antikörper sezernieren, die spezifisch an die Antigene binden und diese somit unschädlich machen (Janeway et al. 2014; Medzhitov & Janeway 2000).

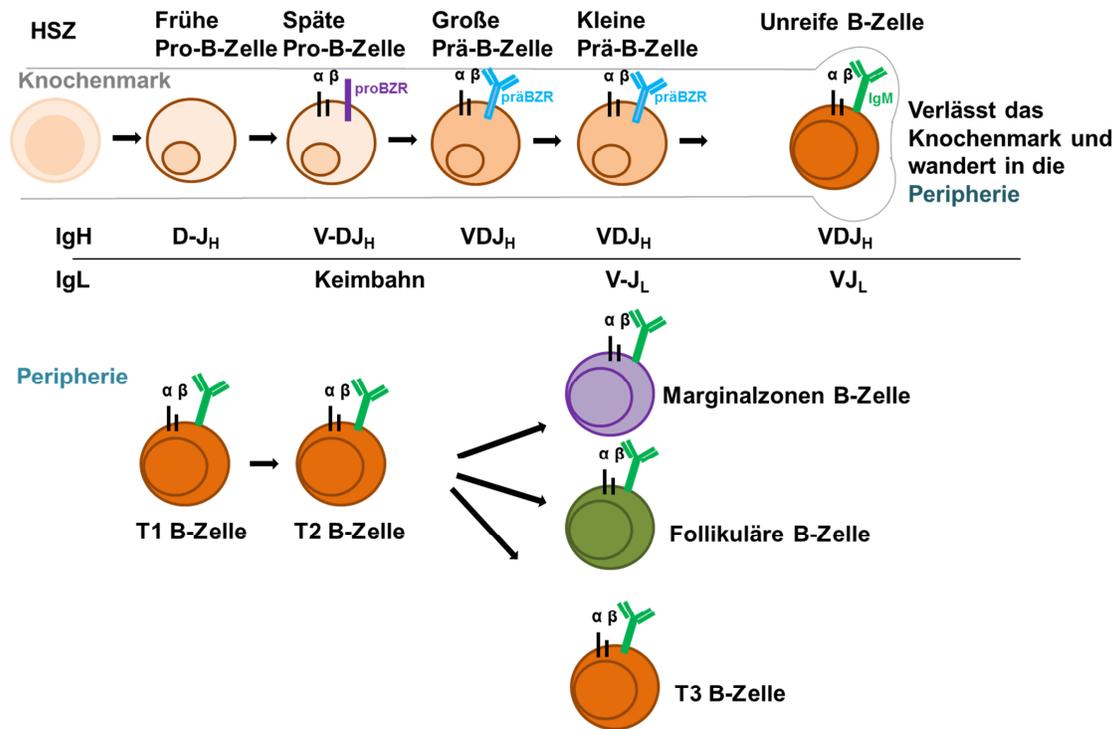
## 1.2 B-Lymphozyten

Die Entwicklung von funktionalen B-Lymphozyten beruht auf einer strengen Selektion, die auf die Bildung eines für jede Zelle einzigartig und nicht autoreaktiven Rezeptors auf der Oberfläche ausgerichtet ist.

### 1.2.1 Die Entstehung von B-Lymphozyten

Die Bildung von B-Zellen findet das ganze Leben statt und verläuft über mehrere verschiedenen Stadien und unterschiedliche Checkpoints (Nuaez et al. 1996). Die B-Zellentwicklung findet im Knochenmark und in sekundären lymphatischen Organen wie der

Milz statt. Im Knochenmark durchlaufen die Zellen verschiedene Entwicklungsstadien von der Pro-B-Zelle über die Prä-B-Zelle bis zur unreifen B-Zelle. Im letzten Stadium entwickeln sie ihre Antigenspezifität durch die Expression eines funktionalen B-Zellrezeptors (BZR) auf der Oberfläche (Cambier et al. 2007). Das adaptive Immunsystem bietet Schutz gegen viele diverse Pathogene und dazu benötigt es eine hohe BZR Vielfalt. Der BZR Komplex besteht aus einer schweren Kette (IgH), einer leichten Kette (IgL) und zwei assoziierten Signalmolekülen Ig $\alpha$  (CD79a) und Ig $\beta$  (CD79b) (Matsuuchi & Gold 2001). In den frühen Pro-B-Zellen kommt es durch Rekombination zu zufälligen Umlagerungen und Neuansordnungen der Immunglobulin-Gene D (*diversity*) und J (*joining*) im Locus der schweren Kette, wobei ein D-Segment an ein J-Segment gebunden wird. In den späten Pro-B-Zellen kommt es zur Fusionierung von V-Segmenten (*variable*) an die zuvor rekombinierten DJ-Segmente. Die Vielfalt des BZR resultiert aus den V-Segmenten selbst, aus der Rekombination der V-, D- und J-Segmenten und aus dem Fusionierungsprozess dieser Segmente, da mithilfe der terminalen Desoxyribonukleotidyl-Transferase zusätzliche Nukleotide in die DNS-Bruchstellen (die bei der VDJ-Rekombination entstehen) eingefügt werden (Meffre et al. 2000; Mårtensson et al. 2010; Hendriks & Middendorp 2004). An diesem Punkt der B-Zell-Rezeptorentwicklung findet eine Überprüfung der neu gebildeten schweren Kette, welche als  $\mu$ -Kette bezeichnet wird, statt. Dafür wird der prä-BZR-Komplex gebildet. Dabei wird die  $\mu$ -Kette zusammen mit einer Ersatz-leichten Kette (*SLC = surrogate light chain*) bestehend aus  $\lambda 5$  und  $V_{\text{pr}\alpha\text{B}}$  und den Signalkomponenten Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  auf der Oberfläche exprimiert (Geier & Schlissel 2006). Wird der prä-BZR als funktional eingestuft, geht die Zelle in der Differenzierung in das Prä-B-Zellstadium über. In diesem Stadium kommt es zur sogenannten „*allelic exclusion*“, ein Vorgang der weitere IgH Umlagerungen verhindert und somit nur eine funktionale Ig $\mu$  entsteht (Ten Boekel et al. 1998). Nun folgt die Neuansordnung der V- und J-Segmente der leichten Kette im Ig $\kappa$ - oder Ig $\lambda$ -Lokus. Zellen in dieser Phase werden als Prä-B-Zellen bezeichnet, die wenn sie in der Lage sind, einen funktionalen BZR mit schwerer und leichter Kette auf der Oberfläche zu präsentieren (IgM), in das nächste Stadium der unreifen B-Zellen übergehen (Kurosaki 2000; Rajewsky 1996). Um die Weiterentwicklung von selbstreaktiven B-Zellen zu verhindern, durchlaufen unreife B-Zellen ein Auswahlverfahren bevor sie in die Peripherie entlassen werden. Bindet die B-Zelle ein körpereigenes Antigen, kommt es zunächst zu einem zweiten Rekombinationsablauf, bevorzugt im Locus der IgL Kette, damit die Zelle erneut die Möglichkeit bekommt, einen nicht selbstreaktiven BZR zu produzieren. Dieser Prozess wird als Rezeptoreditierung bezeichnet. Ist dies nicht möglich, leitet die Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose ein (Edry & Melamed 2004; Meffre & Wardemann 2008). Erst nach erfolgreicher Überprüfung des BZR wandern unreife B-Zellen als transitionale B-Zellen in die Peripherie und über die Blutbahn bis zur Milz, wo sie sich dann zu reifen B-Zellen fertig entwickeln (Chung et al. 2003).



**Abbildung 1: Die Entwicklung und Reifung der B-Lymphozyten.** Darstellung der B-Zellentwicklung mit den für die unterschiedlichen Stadien charakteristischen B-Zellmarkern. Der Rekombinationsstatus der IgH (schwere Kette) und IgL (leichte Kette) ist darunter aufgezeichnet. HSZ = hämatopoetische Stammzelle; proBZR = pro-B-Zell-Rezeptor; präBZR = prä-B-Zell-Rezeptor; T1, T2, T3: transitionale B-Zellen im Stadium 1, 2 und 3.

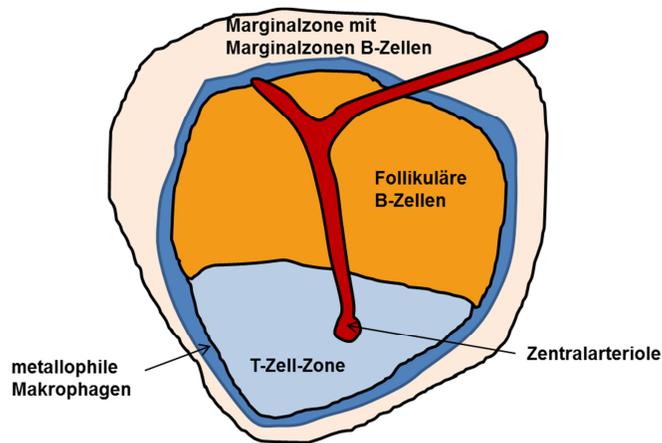
In der Maus können die transitionalen B-Zellen in drei Stadien unterteilt werden: T1 ( $AA4.1^+IgM^{hoch}CD23^-$ ), T2 ( $AA4.1^+IgM^{hoch}CD23^+$ ) und T3 ( $AA4.1^+IgM^{niedrig}CD23^+$ ) wobei T1 B-Zellen zu T2 werden und diese sich dann zu T3 entwickeln. Transitionale B-Zellen sind relativ kurzlebig und gelten als Übergansform zwischen den unreifen und reifen B-Zellen (Allman et al. 2001). Reife B-Zellen bekommen Überlebenssignale durch ihren B-Zellrezeptor (BZR) und BAFF-Rezeptor (*B cell activating factor receptor*; BAFFR) (Schneider & Tschopp 2003; Kraus et al. 2004). So weisen BAFFR<sup>-/-</sup> Mäuse eine Reduktion in der Anzahl von T2 und der follikulären B-Zellen auf und haben keine Marginalzonen B-Zellen auf. Es ist jedoch kein Effekt auf die B1 B-Zellpopulation fest zu stellen (Sasaki et al. 2004). Somit spielt BAFF für das Überleben von T2 B-Zellen und reifen B2-Zellpopulationen in der Peripherie eine essentielle Rolle (Batten et al. 2000; Mackay & Browning 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass B1 B-Zellen in ihrer Entwicklung in der adulten Maus nicht auf BAFF oder nicht-kanonische NF-κB Signale angewiesen sind (Mackay & Schneider 2009; Montecino-Rodriguez & Dorshkind 2012). In der Maus gibt es drei Hauptpopulationen von reifen B-Zellen: follikuläre (FoB) und Marginalzonen B-Zellen (MZB), welche auch als B2 B-Zellen zusammengefasst werden und B1 B-Zellen (Schweighoffer et al. 2013; Allman & Pillai 2008). Teague et al konnten 2007 zeigen, dass nur T2 B-Zellen zu follikulären und

Marginalzonen B-Zellen weiterdifferenzieren, jedoch nicht T3 B-Zellen (Teague et al. 2007). Die Mehrheit der reifen B-Zellen machen die rezirkulierenden folliculären B-Zellen aus, welche hauptsächlich in den Follikeln der sekundären lymphoiden Organen zu finden sind. Durch ihre Lokalisation sind sie zur T-Zellzone benachbart und sind mit den folliculären T-Helferzellen an der T-Zellabhängigen Immunantwort beteiligt. Außerdem sind sie durch ihre bestimmte Oberflächenmarkierung  $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{hoch}}\text{CD21}^+\text{CD23}^+$  charakterisiert (Pillai & Cariappa 2009). In der Milz sind ca. 5 % der reifen B-Zellen Marginalzonen B-Zellen (Zouali & Richard 2011). Es wurde gezeigt, dass viele verschiedene Signale, wie BZR-Signale oder Notch2-Signale, die Entscheidung für die Differenzierung zu MZB's beeinflussen (Saito et al. 2003; Pillai et al. 2005). Diese sind, anders als FoB's, sessil und halten sich in der Marginalzone der Milz (äußeren weißen Pulpa der Milz) zwischen Marginalsinus und roter Pulpa, auf. Sie exprimieren, im Vergleich zu FoB's,  $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{IgD}^-\text{CD21}^{\text{hoch}}\text{CD23}^{\text{niedrig}}\text{CD1d}^{\text{hoch}}$  auf der Oberfläche. Die Marginalzone ist auf die schnelle Immunantwort gegen Pathogene im Blut spezialisiert. Marginalzonen B-Zellen sind in der Lage nach Antigenkontakt in die Follikel zu wandern und dort schnell zu Plasmazellen zu differenzieren (Cerutti et al. 2013; Martin & Kearney 2000; Zouali & Richard 2011). Die dritte Population der reifen B-Zellen sind die B1 B-Zellen, welche bevorzugt im Peritoneum (70 %), jedoch auch in sekundären lymphoiden Gewebe wie der Milz und im Blut (0,5-2 %), zu finden sind. Sie tragen folgende Marker auf der Oberfläche:  $\text{CD43}^+\text{B220}^{\text{niedrig}}\text{CD19}^{\text{hoch}}\text{CD21}^{\text{niedrig}}\text{CD5}^{+/-}$ . B1a B-Zellen können anhand der positiven CD5 Expression von B1b B-Zellen ( $\text{CD5}^-$ ) unterschieden werden. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und teilen viele funktionale Charakteristika mit den Marginalzonen B-Zellen. So sind beide die Hauptakteure in der frühen humoralen Immunantwort und die ersten IgM und IgG3 Antikörperproduzenten als Antwort auf T-Zellunabhängige Antigene (Martin & Kearney 2001; Haas et al. 2005; Baumgarth 2011).

### 1.2.2 Die sekundären lymphatischen Organe

In den sekundären lymphatischen Organen siedeln sich die reifen B-Lymphozyten an, nachdem sie das primäre lymphatische Gewebe (Knochenmark) verlassen haben (Lortan et al. 1987). Zu den sekundären lymphatischen Organen gehören: Lymphknoten, Milz und Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) (Ruddle & Akirav 2009). Der Lymphknoten besteht aus Kortex (Follikel: B-Zellen Areal), Parakortex (T-Zellen Areal) und Medulla (Katakai et al. 2004). Die Milz ist das größte lymphatische Organ des Körpers. Die Struktur der Milz wird in zwei Kompartimente unterteilt, die rote Pulpa und die weiße Pulpa (lymphatisches Gewebe der Milz). Die spezialisierte Struktur des Venensystems der roten Pulpa, gibt diesem Bereich die Möglichkeit Blut zu filtern und alte Erythrozyten zu entfernen. In der weißen Pulpa findet die adaptive Immunantwort statt. Sie beinhaltet die spezifischen B- und T-Zellkompartimente und die arteriellen Gefäße. In der T-Zellzone interagieren die T-

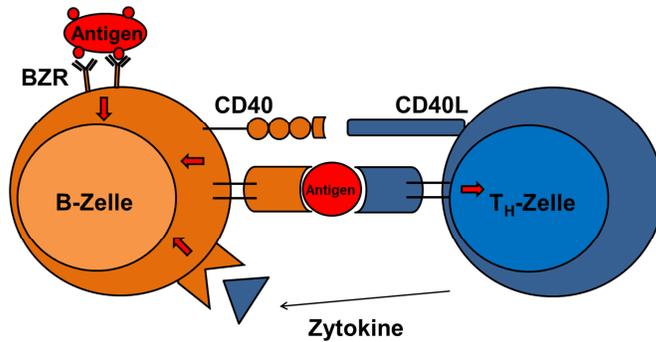
Zellen mit dendritischen Zellen und den vorbeiziehenden B-Zellen. In den B-Zellfollikeln (B-Zellzone) findet die Keimzentrumsreaktion statt, bei der es zur klonalen Expansion aktivierter B-Zellen kommt, was zum Klassenwechsel und zur somatischen Hypermuation führt. Die Marginalzone (MZ) bildet die Grenze zwischen roter und weißer Pulpa und ist eine wichtige Durchgangszone für Zellen, die die Blutbahn verlassen und in die weiße Pulpa einwandern. Über den Marginalsinus, der selbst von metallophilen Makrophagen umgeben ist, gelangt Blut in das vaskuläre System der Marginalzone und die Zellen der MZ können somit sehr schnell auf Pathogene, die sich im Blut befinden, reagieren. Durch die spezifischen Makrophagen und Marginalzonen B-Zellen in der MZ, ist diese sowohl in die angeborene, als auch in die adaptive Immunantwort involviert (Cerutti et al. 2013; Kim et al. 2005; Mebius & Kraal 2005). Der schematische Aufbau der weißen Pulpa ist unter Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau der weißen Pulpa in Mäusen.** Die Lymphozyten gelangen über die Zentralarteriole in die weiße Pulpa, welche von der Marginalzone (MZ) umhüllt ist. Am inneren Rand der MZ befinden sich die metallophilen Makrophagen. Die follikulären B-Zellen sind in der B-Zell-Zone lokalisiert, welche separiert von der T-Zell-Zone mit den T-Zellen ist (Adaptiert von Mebius & Kraal, 2005).

### 1.2.3 Die Aktivierung von B-Zellen

Die Aktivierung von B-Zellen findet in den sekundären lymphatischen Organen statt. B-Zellen können über ihren B-Zell-Rezeptor Antigene, wie Viruspartikel oder bestimmte Oberflächenmoleküle auf Bakterien, erkennen und binden. Das gebundene Antigen wird internalisiert und prozessiert und erscheint wieder an MHC Klasse II Molekülen (*major histocompatibility complex II*) gebunden auf der B-Zelloberfläche. Diese werden von T-Helferzellen erkannt, welche dann aktivierende Signale zur B-Zelle zurück senden und die B-Zellen daraufhin proliferieren (den Haan et al. 2014; Parker 1993).



**Abbildung 3: Die B-Zellaktivierung durch Antigene und T-Helferzellen.**

Wird ein Antigen (rot) an den B-Zell-Rezeptor (BZR) der B-Zellen gebunden, wird es internalisiert, zu Peptiden prozessiert und an MHC Klasse II Molekülen auf der Oberfläche präsentiert. Diese können dann von T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) erkannt werden. Signale vom gebundenen Antigen (roter Kreis) und von den T<sub>H</sub>-Zellen, über den CD40Ligand (CD40L) und durch Zytokine, stimulieren die B-Zelle zur Proliferation und zur Bildung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen.

(Adaptiert aus Janeway, 2012.)

Die Voraussetzung für die Hilfe von T-Helferzellen ist, dass für das Antigen spezifische CD4 T-Zellen aktiviert werden müssen, die dann T-Helferzellen produzieren. Dies passiert, wenn naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dendritischen Zellen, welche das Peptid präsentieren, interagieren (Perrigoue et al. 2009). CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren zu verschiedenen Typen von T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1, 2, 17 und regulatorische T-Zellen) (Zhu et al. 2010) und zu follikulären T-Helferzellen (Crotty 2014). Außerdem können nach Aktivierung langlebige CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen (Effektor-T-Gedächtniszellen T<sub>EM</sub> oder zentrale Gedächtnis-T-Zellen T<sub>CM</sub>) entstehen (Schenkel & Masopust 2014). Die Aktivierung der B-Zelle durch T-Helferzellen erfolgt u.a. durch ausgeschüttete Zytokine und durch die Interaktion des CD40-Liganden (CD40L) auf der T-Zelle mit dem CD40-Rezeptor (CD40) auf der B-Zelle (Janeway et al. 2014). Ein Teil der aktivierten B-Zellen sorgt für die schnelle, unspezifische Immunantwort, indem die B-Zellen zu extrafollikulären Plasmazellen differenzieren, die niederaffine IgM und IgG1 Antikörper sezernieren (MacLennan et al. 2003). Der andere Teil durchläuft die zweite Phase der Immunantwort. Dazu wandern die B-Zellen zusammen mit ihren assoziierten T-Helferzellen in den primären Lymphfollikel ein, wo sie weiter proliferieren und Keimzentren ausbilden. Hier findet die somatische Hypermutation statt. Während dieser Reaktion wird die Bindungsspezifität des B-Zell-Rezeptors gesteigert. Die assoziierten T-Helferzellen lösen erneut das durch den CD40-Rezeptor vermittelte Signal aus und es kommt zum Klassenwechsel der B-Zellen von IgM zu IgA, IgG oder IgE. Aus den Keimzentrums-B-Zellen bilden sich Plasmazellen, die hochaffine Antikörper sezernieren oder langlebige Gedächtnis-B-Zellen (Allen et al. 2007; Tarlinton & Smith 2000).

#### 1.2.4 Der CD40- und der BAFF-Rezeptor

Die CD40- und BAFF-Rezeptoren gehören zu der Familie der TNF-Rezeptoren (*Tumor Necrosis Factor Receptors*) und spielen eine kritische Rolle im Überleben und der

Differenzierung von B-Zellen (Qian et al. 2004; Sun 2010). CD40 ist ein 50 kDa großes Transmembran-Glykoprotein (Lam & Sugden 2002; Zhan et al. 2016). CD40 wird hauptsächlich auf B-Zellen exprimiert, jedoch wurde er auch auf dendritischen Zellen, Epithelzellen, Makrophagen und Monozyten gefunden (Kehry 1996; Karmann et al. 1995). Nach der Bindung des CD40-Liganden (CD154), welcher meist auf aktivierten T-Zellen zu finden ist, aktiviert CD40 die B-Zelle durch Bindung von Adaptorproteinen, sogenannten TRAF's (*TNF receptor-associated factors*). Es ist bekannt, dass CD40 für die Signalweiterleitung die Rekrutierung von TRAFs benötigt, da der zytoplasmatische Anteil von CD40 keine katalytische Aktivität besitzt (Mukundan et al. 2005; Harnett 2004). Die verschiedenen TRAF Proteine aktivieren unterschiedliche Signalwege (Brown et al. 2001). Das CD40 Signal führt zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges (Berberich et al. 1994), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), p38 und einiger Tyrosin-Kinasen (Craxton et al. 1998; Li et al. 1996; Sutherland et al. 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass CD40 den JAK (Januskinase)/STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) Signalweg induzieren kann (Geraldles et al. 2006; Karras et al. 1997). CD40 hat für die B-Zelle eine wichtige Bedeutung im Bezug auf ihr Überleben, ihre Proliferation, Differenzierung, den Klassenwechsel und die Ausbildung von Keimzentren (Banchereau et al. 1989; Hasbold et al. 1998; Kawabe et al. 1994; Mineva et al. 2007; Rousset et al. 1991). Auch der BAFF-Rezeptor (BAFFR) spielt in der B-Zelle für ihre Reifung und ihr Überleben eine bedeutende Rolle. Im BAFF-System gibt es drei unterschiedliche Rezeptoren: BCMA (*B cell maturation antigen*), TACI (*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*) und den BAFF-Rezeptor und zwei Liganden: BAFF (*B cell activating factor*) und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*). Der BAFFR wird hauptsächlich auf B-Zellen exprimiert (Mackay & Schneider 2009; Yang et al. 2014). BAFF, auch BLyS (*B lymphocyte stimulator*) oder TALL-1 genannt, ist ein 285-Aminosäuren langes Glykoprotein (Lahiri et al. 2012) und bindet neben BAFFR auch an TACI und BCMA, jedoch ist die Bindeaffinität zum BAFFR am Höchsten (Bossen & Schneider 2006). Ein zu BAFF verwandter Faktor ist APRIL. Es scheint jedoch, dass APRIL, im Vergleich zu BAFF in andere biologische Prozesse involviert ist. APRIL ist nicht in der Lage den BAFFR zu binden (Thompson et al. 2001). Im Gegensatz dazu, scheint BCMA eine höhere Bindeaffinität zu APRIL als zu BAFF auf zu weisen und TACI ist bekannt, beide Liganden vergleichbar zu binden (Mackay & Schneider 2009; Mackay et al. 2003).

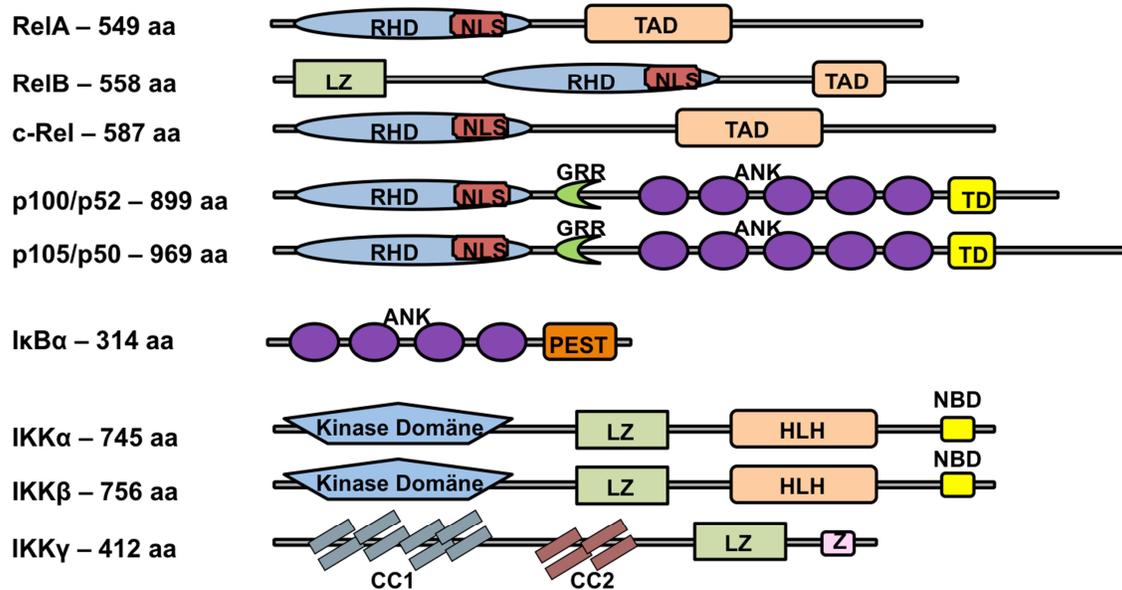
Sowohl CD40 als auch der BAFFR, ist in der Lage den NF- $\kappa$ B Signalweg zu aktivieren. CD40 ist neben der Aktivierung des nicht-kanonischen, auch in die des kanonischen Signalweges involviert (Zarnegar et al. 2004; Hostager & Bishop 2013) wohingegen der BAFFR Signalweg bevorzugt den nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg aktiviert (Kayagaki et

al. 2002; Claudio et al. 2002). Der genaue Mechanismus der Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges ist unter 1.3.2 beschrieben.

### 1.3 Der NF- $\kappa$ B Signalweg

Die NF- $\kappa$ B Familie von Transkriptionsfaktoren besteht aus 5 Mitgliedern: p50, p52, RelA (p65), c-Rel und RelB, welche jeweils durch die Gene *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *REL* und *RELB* kodiert werden (Tripathi & Aggarwal 2006). Sie sind in der Lage Homo- oder Heterodimere zu bilden. Diese NF- $\kappa$ B Dimere binden im Kern als Transkriptionsfaktoren an 9-12 Basenpaar lange DNS-Abschnitte, den sogenannten  $\kappa$ B-Bindestellen, welche eine hohe Variabilität aufweisen und initiieren dadurch die Transkription von Zielgenen (Vallabhapurapu & Karin 2009; Hayden & Ghosh 2008; Graham & Gibson 2005). Sie alle besitzen eine hoch konservierte, N-terminale, ca. 300 Aminosäuren lange homologe Rel Domäne (RHD), welche für die Bindung an die DNS und für die Homo- oder Heterodimerisierung verantwortlich ist und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) beinhaltet (Oeckinghaus & Ghosh 2009; Hayden & Ghosh 2008; Sun 2010). Nur RelA, c-Rel und RelB haben zusätzlich C-terminal eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die wichtig für die Transkription der Zielgene ist. RelB hat im Gegensatz zu den zwei anderen transkriptionell-aktiven Mitglieder RelA und c-Rel den spezifischen Unterschied, dass sich am N-terminalen Ende ein Leuzin-Zipper-ähnliches Motif befindet (LZ), welches in die transkriptionelle Aktivierung involviert ist (Bren et al. 2001; Dobrzanski et al. 1993; Oeckinghaus & Ghosh 2009). P50 und p52 entstehen durch Prozessierung der entsprechenden Vorläuferproteine p105 (p50) beziehungsweise p100 (p52). Die RHD bleibt auch nach deren Prozessierung zu p52 oder p50 bestehen. Die GRR (*glycin rich region*) bei p100 und p105 ist essentiell für deren Prozessierung zu p52 und p50 (Qing et al. 2005; Lin & Ghosh 1996). Die Todesdomäne (TD) von p100 und p105 ist bekannt dafür, dass sie apoptotische Signale transduzieren kann, indem sie intrazelluläre Todesfaktoren auf die Rezeptoren der Zelloberfläche rekrutiert. Einige Daten weisen auch darauf hin, dass die TD eine Rolle bei der Prozessierung der Proteine spielt (Xiao et al. 2001). In ruhenden Zellen werden die NF- $\kappa$ B Dimere durch die Interaktion mit Inhibitorproteinen im Zytoplasma gehalten. Diese Inhibitorproteine, wie I $\kappa$ B (*inhibitors of NF- $\kappa$ B*; I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$ ) oder auch die Vorläuferproteine p100 und p105, besitzen ein Motif mit 5–7 Ankyrin-Wiederholungen, welches die Bindung an die RH-Domäne der NF- $\kappa$ B Proteine vermittelt und somit das NLS maskiert (Rice et al. 1992; Ghosh et al. 1998; Ghosh & Karin 2002). Die Vorläuferproteine p100 und p105 besitzen einen wichtigen Unterschied im Vergleich zu den I $\kappa$ B Inhibitoren: sie besitzen selbst eine RHD und können über diese zusätzlich mit anderen NF- $\kappa$ B Komponenten Dimere bilden. Generell sind die Inhibitorproteine bevorzugt mit einer bestimmten Untergruppe von NF- $\kappa$ B Dimeren assoziiert.

Von I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  wird angenommen, dass sie bevorzugt Komplexe, welche c-Rel oder RelA enthalten, inhibieren (Malek et al. 2003). P100 bindet hauptsächlich an RelB und hält es im Zytoplasma zurück (Solan et al. 2002). Der Abbau der Inhibitorproteine wird über Phosphorylierung durch I $\kappa$ B Kinasen (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ) vermittelt. Diese katalytisch aktiven Kinasen besitzen N-terminal eine Kinase Domäne, ein Leuzin-Zipper (LZ) und C-terminal eine Helix-Loop-Helix Domäne (HLH) und die NEMO Bindedomäne (NBD). Der LZ ist verantwortlich für die Dimerisierung der Kinasen und die HLH ist essentiell für die optimale Kinaseaktivität (Zandi et al. 1997). Die NBD am C-terminalen Ende ist in das Zusammenspiel mit der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$  (NEMO) involviert (May et al. 2002). Eine schematische Übersicht über den Aufbau der NF- $\kappa$ B Komponenten zeigt Abbildung 4.



**Abbildung 4: Schematische Übersicht über den Aufbau der NF- $\kappa$ B Komponenten.** Dargestellt sind die Mitglieder der NF- $\kappa$ B und IKK-Protein Familie. Die RHD (Rel homologe Domäne) ist charakteristisch für die NF- $\kappa$ B-Proteine. Darin befindet sich auch die NLS-Sequenz (*nuclear localisation signal*). Die Vorläufer p100 und p105 können durch ihre ANK Wiederholungen (Ankyrin) die NF- $\kappa$ B-Proteine im Zytoplasma zurückhalten. TD = Todesdomäne; HLH = Helix-Loop-Helix; LZ = Leuzin-Zipper; NBD = NEMO Bindedomäne; TAD = Transaktivierungsdomäne; GRR = Glycin-reiche Region; PEST = Proline-, Glutaminsäure-, Serin-, und Threonin-reiche Region; CC = coiled-coil; Z = Zinkfinger (Modifiziert nach Hayden und Gosh, 2008).

Im Jahre 2001 wurde aufgeklärt, dass der NF- $\kappa$ B Signalweg (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells*) aus zwei verschiedenen Signalwegen besteht: dem kanonischen (klassischen/NF- $\kappa$ B1) und dem nicht-kanonischen (alternativen/NF- $\kappa$ B2) (Gardam & Brink 2014). Die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg erfordert die Prozessierung von p105 zu seiner aktiven Form p50, welches dann Dimere mit RelA (p65) oder c-Rel bildet. Wird die Zelle durch verschiedene Agonisten wie TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ) oder CD40L (CD40-Ligand) aktiviert, wird TRAF 6 rekrutiert, welches sich selbst ubiquitiniert. Es ist auch beschrieben, dass TRAF2 essentiell für

die CD40 vermittelte Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges ist (Nguyen et al. 1999; Grech et al. 2004). Ubiquitiniertes TRAF6 rekrutiert TAB2 und TAB3 (TAK1 bindende Proteine 2 und 3) und aktiviert dadurch die TAK1 Kinase, welche dann IKK $\beta$  im IKK-Komplex (bestehend aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und NEMO) phosphoryliert (Chen 2005; Inoue et al. 2007). Dies führt zur Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Inhibitorproteine, woraufhin diese proteasomal degradiert werden was zu einer relativ schnellen nukleären Akkumulierung (innerhalb weniger Minuten) von p50-RelA und p50-c-Rel Dimeren führt. Diese binden dort an die DNS und regulieren Gene für Immunreaktionen, Apoptose und andere zelluläre Prozesse. Es ist bekannt, dass z.B. p50 als Homodimer agieren kann, dies führt aber eher zu einer negativen Regulation der Transkription, da keine weiteren Dimere mehr an die DNS binden können und p50 selbst keine TAD besitzt (Deng et al. 2000; Guan et al. 2005; Hayden & Ghosh 2008; Gardam & Brink 2014; Zarnegar et al. 2008). Die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs wird im nächsten Abschnitt erklärt.

### 1.3.1 Der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg

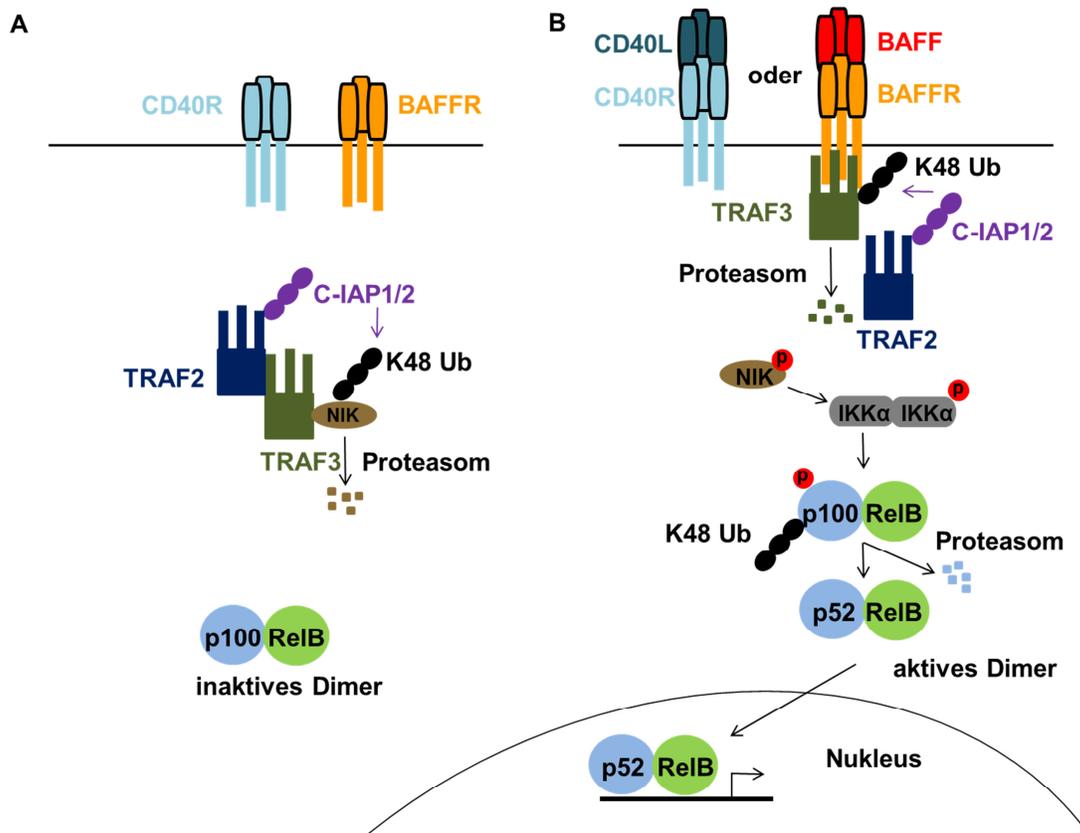
Verschiedene genetische Knockout-Mausstudien haben bestätigt, dass der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg für die Organogenese und Architektur der sekundären lymphatischen Organe, für die B-Zellreifung und das Überleben und für die Reifung von dendritischen Zellen eine essentielle Rolle spielt (Weih et al. 1995; Sun 2012; Cildir et al. 2016). RelB-defiziente Mäuse zeigen einige pathologische Veränderungen wie entzündliche Zellinfiltrationen in mehreren Organen, myeloische Hyperplasie, Splenomegalie, eine reduzierte Anzahl von dendritischen Zellen und eine beeinträchtigte Immunantwort. Außerdem wurde beobachtet, dass RelB-defiziente Mäuse eine abnormale Mikroarchitektur der Milz aufweisen und eine reduzierte Anzahl von folliculären B-Zellen und keine Marginalzonen B-Zellen besitzen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von RelB entscheidend für das immunopoetische System ist und von keinem anderen Rel-Mitglied kompensiert werden kann (Weih et al. 1997; Weih et al. 2001). Mäuse mit einer p52 Defizienz weisen eine reduzierte Anzahl von B-Zellen und eine veränderte Architektur der Milz auf, können keine Keimzentren ausbilden und haben Beeinträchtigungen in der T-Zellabhängigen Immunantwort, was ebenfalls auf eine wichtige Funktion des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges bei der B-Zellentwicklung und Aktivierung hinweist. Die Funktion von RelB spezifisch in B-Zellen ist jedoch immer noch zum größten Teil unerforscht.

### 1.3.2 Die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges

Die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges erfolgt durch eine ausgewählte Gruppe von TNF-Rezeptoren wie z.B. CD40-Rezeptor, LT $\beta$ R (*lymphotoxin- $\beta$  receptor*) und

dem BAFF-Rezeptor (Yamamoto & Gaynor 2004). Die Aktivierung dieser Rezeptoren resultiert in einer langsamen Prozessierung des C-terminalen Endes von p100 zu p52 und einer kinetisch langsameren (im Vergleich zum kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg) nukleären Translokation von p52-RelB Dimeren (mehrere Stunden). Im Gegensatz zum kanonischen Signalweg, gibt es beim nicht-kanonischen keine I $\kappa$ B-Inhibitorproteine, RelB verbleibt durch die Bindung an p100 im Zytoplasma (Fusco et al. 2016; Bren et al. 2001). Der Transkriptionsfaktor RelB ist ein 70 kDa großes Protein, in der Maus bestehend aus 558 aa (Aminosäuren) und wird in der B-Zellentwicklung ab dem Stadium der kleinen Prä-B-Zelle verstärkt exprimiert. Das Expressionsmaximum wird in reifen B-Zellen bei T2, T3 transitionalen B-Zellen und bei folliculären B-Zellen erreicht (<http://www.immgen.org/databrowser/index.html>). Die Expression von RelB ist hauptsächlich auf die lymphoiden Organe wie den Thymus, die Milz und die Lymphknoten beschränkt (Weih et al. 1995; Carrasco et al. 1993). Es ist bekannt, dass RelB für die Stabilisierung von p100 essentiell ist und in unstimulierten Zellen ist RelB bevorzugt an p100 gebunden und nur zu einem kleinen Teil mit p50 und p52 assoziiert (Maier et al. 2003). In aktivierten Zellen ist hauptsächlich ein Heterodimer aus p52 und RelB im Kern zu finden (Fusco et al. 2008; Solan et al. 2002). Heterodimere aus RelB mit RelA sind nicht in der Lage weder *in vitro* noch *in vivo* an DNS zu binden (Fusco et al. 2016; Jacque et al. 2005). Auch ein Homodimer aus RelB kann nicht an DNS binden, was zu der Annahme führt, dass RelB kein stabiles Homodimer *in vivo* bilden kann (Basak et al. 2008; Marienfeld et al. 2003; Fusco et al. 2008; Weih et al. 1995). In ruhenden Zellen wird der nicht-kanonische Signalweg durch die Bindung von TRAF3 an NIK (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*) inhibiert (Liao et al. 2004). Genauer erfolgt dies, durch die Assoziation des Ubiquitin-Ligase Komplexes aus TRAF3, TRAF2 und cIAP1/2 (*cellular inhibitor of apoptosis*) mit NIK, was zur Ubiquitinierung und somit zur proteasomalen Degradation von NIK führt (Zarnegar et al. 2008). Die K48 Ubiquitinierung von NIK erfolgt durch die cIAP's, welche an TRAF2 gebunden sind. Durch die Interaktion von TRAF2 mit TRAF3, welches direkt an NIK binden kann, werden die cIAP's an NIK rekrutiert (Varfolomeev et al. 2007; Razani et al. 2011). Nach der Rezeptor Aktivierung durch z.B. CD40L oder BAFF (Hostager & Bishop 2013; Gardam & Brink 2014), wird TRAF3 zur zytoplasmatischen Domäne des BAFFR oder CD40 rekrutiert und wird dadurch abgebaut. Dies führt dazu, dass NIK nicht mehr degradiert wird, somit stabilisiert wird und in der Zelle akkumuliert. Diese Akkumulation von NIK erklärt, warum der nicht-kanonische Weg im Vergleich zum kanonischen eine langsamere Kinetik aufweist (Vallabhapurapu et al. 2008; Mitchell et al. 2016). Über die Phosphorylierung von p100 gibt es in der Literatur verschiedene Meinungen. So ist in einigen Publikationen beschrieben, dass nach Aktivierung von NIK IKK $\alpha$  Homodimere direkt phosphoryliert werden, welche dann p100 phosphorylieren (Ling et al. 1998; Senftleben et al. 2001; Tao & Ghosh 2012; Amir et al. 2004). Eine weitere Möglichkeit ist, dass NIK über PID (*processing-inhibitory domain*) p100 direkt phosphorylieren

kann (Xiao et al. 2001). Die Phosphorylierung von p100 resultiert in der Rekrutierung des SCF<sup>BT<sub>RC</sub>P</sup> Ubiquitin-Ligase-Komplexes, wodurch das C-terminale Ende von p100 spezifisch ubiquitiniert und proteolytisch verdaut wird (Liang et al. 2006). Das N-terminale Ende p52 wandert zusammen mit RelB als Heterodimer in den Nukleus und initiiert durch die Bindung an NF-κB Motive die Transkription der Zielgene. Der nicht-kanonische NF-κB Signalweg verläuft NEMO und IKKβ unabhängig. Der *Crosstalk* zwischen beiden NF-κB Signalwegen ist sehr komplex und wahrscheinlich auch von vielen verschiedenen Umständen abhängig.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aktivierung des nicht-kanonischen NF-κB Signalweges.** **A.** Unter basalen Bedingungen wird NIK (*NF-κB inducing kinase*) konstitutiv proteasomal degradiert und dieser Vorgang ist TRAF3 und TRAF2 abhängig. TRAF2 rekrutiert den cIAP1/2 Komplex (*cellular inhibitor of apoptosis 1 und 2*) zum TRAF3-NIK-Komplex und cIAP1/2 ubiquitiniert und degradiert dadurch NIK. **B.** Der nicht-kanonische NF-κB Signalweg wird durch die Bindung von Liganden wie CD40L oder BAFF an die entsprechenden Rezeptoren aktiviert. Daraufhin werden TRAF2 und TRAF3 zu dem zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors rekrutiert. cIAP1/2 bauen dadurch TRAF3 ab was zur Stabilisierung von NIK führt. NIK phosphoryliert dann IKKα Homodimere, welche dann p100 phosphorylieren, was wichtig ist für die nachfolgende Ubiquitinierung und teilweise proteasomale Degradation von p100 zu p52. Heterodimere aus p52-RelB können dann in den Nukleus translozieren und spezifische Zielgene aktivieren. Ub = ubiquitiniert; p = phosphoryliert (Modifiziert nach Cildir, Low und Tergaonkar, 2016).

## 1.4 Die Bedeutung des CD40 und nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges in der Tumorgenese

CD40 ist auf verschiedenen B-Zelllymphomen hoch exprimiert und führt zu verstärkter Proliferation und Überleben der Zellen (Hömig-Hölzel et al. 2008). Eine verstärkte Expression von CD40 wurde unter anderem bei Hodgkin's Lymphomen, Non-Hodgkin's Lymphomen und bei B-CLL (Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ) nachgewiesen und es wird diskutiert, dass CD40 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt (von Bergwelt-Baildon et al. 2004; Baxendale et al. 2005; Carbone et al. 1995). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit konstitutiver CD40 Aktivierung in B-Zellen zu einer hohen Inzidenz ab einem Alter von 12 Monaten B-Zelllymphome in der Milz entwickeln. Das konstitutive CD40 Signal führt unter anderem in B-Zellen zu einer Hyperaktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges (Hömig-Hölzel et al. 2008). Für den nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg wurde beschrieben, dass auch er in vielen malignen hämatologischen Erkrankungen eine Rolle spielt (Krappmann & Vincendeau 2016; Cildir et al. 2016). Die konstitutive Aktivierung steht im Verdacht, das Überleben der entarteten Zellen zu fördern und somit die Pathogenese zu beeinflussen. Es wurde für AML (akute myeloide Leukämie) gezeigt, dass die konstitutive Aktivierung von p52-RelB Dimeren den Tumorsuppressor DAPK1 inhibiert und somit die Tumorentstehung fördert (Gasparini et al. 2014). Für die Progression von CLL (chronisch lymphatische Leukämie) scheint RelB über den CD40-CD40L Signalweg zusammen mit RelA zu kooperieren (von Bergwelt-Baildon et al. 2004; Mineva et al. 2007). Moore et al konnten 2012 mit Hilfe von TRAF3-Knockout Mäusen, in denen der nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg verstärkt aktiv ist, zeigen, dass diese SMZL (*splenic marginal zone lymphoma*) oder B1a Lymphome in der Milz entwickeln (Moore et al. 2012). In Hodgkin's Lymphomen hat der nicht-kanonische Signalweg einen wichtigen Einfluss für den Phänotyp, da RelB und NIK eine bedeutende Rolle für das Überleben der Zellen spielt (Ranuncolo et al. 2012). In 40% der neu diagnostizierten Patienten mit Multiplem Myelom ist RelB konstitutiv aktiv. Die konstitutive Aktivität von RelB führt zur Expression von anti-apoptotischen Genen wie cIAP2, Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-2 und somit zum verbesserten Überleben der Tumorzellen (Cormier et al. 2013; Nagel et al. 2014; Roy et al. 2016). Das verbesserte Überleben der Tumorzellen scheint ein wichtiger Aspekt für die Tumorgenese zu sein. Interessanterweise, wurde eine Deregulation des BAFFR Signalweges bei verschiedenen Leukämien und Lymphomzellen gefunden, was zur Annahme führt, dass der BAFF/BAFFR Weg für die Entstehung und Pathogenese dieser Erkrankungen durch das Verbessern des Überlebens der Zellen involviert ist (Yang et al. 2014). Bei 15 % der untersuchten DLBCLs (*diffuse large B cell lymphoma*) führen Mutationen in den Komponenten des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B

Signalweges zu dessen konstanter Aktivierung. Bei ungefähr 10 % findet man hauptsächlich vermehrt p52 im Nukleus. Bei ca. 20 % sind vermehrt p50 und p52 im Kern zu detektieren, was zur Annahme führt, dass in diesen Fällen sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische Signalweg aktiv sind (Zhang et al. 2015; Compagno et al. 2009). Die Rolle des NF- $\kappa$ B Signalweges in vielen zellulären Prozessen wie Apoptose, Tumorangiogenese, Tumorzellinvasion, Metastasierung und Proliferation bei vielen Tumorarten zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren zu einem vielversprechenden, therapeutischen Ziel werden können, um viele humane Krebsarten, einschließlich der Lymphome bei denen der NF- $\kappa$ B Signalweg dereguliert ist, in Zukunft erfolgreich behandeln zu können. Ein wichtiger Wirkstoff ist heute schon Bortezomib (Velcade<sup>®</sup>), ein Proteasom-Inhibitor, eines der ersten Präparate mit nachweislicher Inhibierung der NF- $\kappa$ B Funktion bei Patienten mit progressivem Multiplem Myelom. Die Wirkungsweise ist jedoch noch nicht in allen Einzelheiten geklärt und Resistenzen werden oft beobachtet (Madonna et al. 2012; Richardson et al. 2014). Zu einem weiteren therapeutischen Target wurde NIK, für eine mögliche Behandlung des Mantelzelllymphoms (MZL) bei Patienten, bei denen Ibrutinib nur zu einem kleinen therapeutischen Nutzen führte. Es wird angenommen, dass Tumore mit Mutationen im nicht-kanonischen Signalweg und konstitutiv aktivem NIK-Signalweg, Ibrutinib resistent sind (Jacobson et al. 2016; Rahal et al. 2014). Da bei Patienten mit Multiplem Myelom beobachtet wurde, dass sowohl in Komponenten des kanonischen, als auch des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges Mutationen auftreten, ist es für zukünftige Therapien notwendig, beide Signalwege gleichzeitig blockieren zu können. Ein vielversprechender Kandidat hierfür ist PBS-1086, welcher alle Rel Bindestellen blockiert und somit Bindung an die DNS im Nukleus verhindert (Fabre et al. 2012).

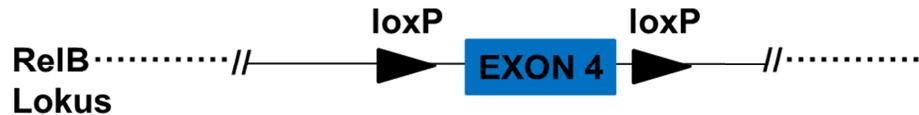
## 1.5 Mausmodelle

Der Einfluss von RelB auf B-Zellen und die Bedeutung von RelB im transgenen LMP1/CD40 Mausmodell, wurde anhand von zwei verschiedenen Mausstämmen untersucht. Die RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse bekamen wir von Falk Weih (FLI Jena) und die LMP1/CD40<sup>fl/stop</sup> Mäuse wurden von C. Hömig-Hölzel in unserem Labor generiert.

### 1.5.1 Die RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse

Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors RelB Zelltyp-spezifisch untersuchen zu können, wurde von Falk Weih und seinen Kollegen eine konditionale RelB-Knockout Maus generiert, in welcher das Exon 4 des *RelB* Gens 3' und 5' mit loxP-Stellen flankiert wurde. In Anwesenheit der Cre-Rekombinase kommt es zur Exzision von Exon 4, was zu einer

Leserasterverschiebung führt und schlussendlich zum Verlust eines funktionsfähigen RelB-Proteins. Da wir die Bedeutung von RelB spezifisch in B-Zellen analysieren wollten, wurden RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit CD19Cre Mäusen verpaart, in welchen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD19-Promotors steht, was bedeutet, dass die Cre-Rekombinase nur in B-Zellen exprimiert wird.



**Abbildung 6: Darstellung des rekombinanten RelB-Lokus der RelB<sup>fl/fl</sup> Mauslinie.** Das Exon 4 des *RelB* Gens ist mit loxP-Stellen flankiert. Durch die Kreuzung mit Cre Mäusen wird das Exon 4 deletiert und es kommt durch eine Leserasterverschiebung zum Verlust eines funktionsfähigen RelB Proteins.

### 1.5.2 Die LMP1/CD40<sup>fl/stop</sup> Mäuse

LMP1 ist ein Membranprotein des Epstein-Barr-Virus und verfügt über sechs Transmembrandomänen, die in der Plasmamembran aggregieren. Dies führt zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung von LMP1 (Gires et al. 1997; Hatzivassiliou et al. 1998). Die LMP1/CD40<sup>fl/stop</sup> Mäuse wurden in unserem Labor generiert. Dabei wurde ein Fusionsgen aus der Transmembrandomäne von LMP1 und des intrazellulären Teils des CD40-Rezeptors hergestellt, welches ligandenunabhängig ein konstitutiv aktives CD40 Signal generiert. Durch homologe Rekombination wurde das *LMP1/CD40* Gen in den *rosa26*-Lokus eingebracht, so dass das Fusionsprotein unter der Kontrolle des *rosa26*-Promotors exprimiert werden kann. Um eine Cre-abhängige konditionale Expression von LMP1/CD40 zu ermöglichen, wurde das Fusionsgen hinter eine durch loxP flankierte stop-Kassette gesetzt (Hömig-Hölzel et al. 2008). Durch Verpaarung mit der CD19Cre Maus, wird die B-Zell-spezifische Deletion der Stopp-Kassette und somit die LMP1/CD40-Expression spezifisch in B-Zellen erreicht.



**Abbildung 7: Darstellung des rekombinanten rosa26-Lokus der LMP1/CD40<sup>fl/stop</sup> Mauslinie.** Das Fusionsgen LMP1/CD40 steht unter der Kontrolle des *rosa26*-Promotors. Die loxP-flankierte stop-Kassette wird durch Verpaarung mit Cre-Mäusen herausgeschnitten, was ermöglicht, dass LMP1/CD40 exprimiert werden kann.

Durch Verpaarung dieser LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse mit RelB<sup>fl/fl</sup> Mäusen, wurde ein Mausstamm generiert, bei dem in B-Zellen einerseits das CD40 Signal konstitutiv aktiv ist und andererseits RelB inaktiviert ist. Diese Mäuse werden in dieser Arbeit als RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse bezeichnet.

## 2 Zielsetzung

Seit seiner Entdeckung vor mehr als zehn Jahren verdeutlichen viele Studien, dass der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg wichtige biologische Funktionen, wie die Bildung der lymphoiden Organe, Überleben und Reifung der B-Zellen oder die Aktivierung dendritischer Zellen, reguliert. Einige non-Hodgkin-Lymphome und Multiple Myelome sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Akkumulation von p52 und RelB im Kern aufweisen. Interessanterweise weisen auch einige Arten von Leukämien, wie die CLL (chronische lymphatische Leukämie) eine verstärkte Lokalisation von RelB im Kern auf. Welche Rolle jedoch RelB spezifisch bei der B-Zellentwicklung und –Aktivierung sowie bei der Entstehung von B-Zelllymphomen spielt, ist noch nicht ganz aufgeklärt. Um die Rolle des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges speziell in B-Zellen zu untersuchen, wurde in unserem Labor durch die Kreuzung von RelB<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit CD19Cre Mäusen, der Transkriptionsfaktor RelB B-Zell-spezifisch inaktiviert. Meine Vorgängerin Kristina Stojanovic konnte bereits in ihrer Doktorarbeit im Jahr 2013 zeigen, dass die Inaktivierung von RelB in B-Zellen keinen Einfluss auf die B-Zellentstehung im Knochenmark hat, jedoch zu einer signifikanten Reduktion der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen führt. Weiterhin konnte sie auch feststellen, dass im Lymphknoten der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen die B-Zellzahlen erkennbar und in der Milz tendenziell erniedrigt sind. Meine Aufgabe in der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen: (i) ob die Reduktion des Milzgewichtes und der B-Zellzahlen in der Milz signifikant ist und falls ja (ii) welche B-Zellpopulationen genau in den RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Kontrollmäusen *in vivo* reduziert sind. Des Weiteren sollte näher untersucht werden (iii) welchen Einfluss eine B-Zell-spezifische Deletion von RelB auf die B-Zelldifferenzierung, die B-Zellaktivierung sowie das Überleben von B-Zellen *in vitro* hat. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass ein konstitutiv aktiver CD40 Signalweg in B-Zellen zu einer Hyperaktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalwegs führt und diese transgenen Mäuse ab einem Alter von > 12 Monaten mit einer hohen Inzidenz B-Zelllymphome in der Milz entwickelten (Hömig-Hölzel et al. 2008). Um herauszufinden, wieviel Einfluss der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg für die Entstehung von B-Zelllymphomen in gealterten LMP1/CD40 Mäusen (> 14 Monate) hat, sollten RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen gekreuzt werden. Anhand von Untersuchungen der RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (< 4 Monate, 6-8 Monate, 10-12 Monate und > 14 Monate), sollten folgende Fragen beantwortet werden: i) welche Rolle spielt RelB bei der Differenzierung von LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen in jungen Mäusen? ii) welchen Einfluss hat der verstärkte aktive nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg auf den Phänotyp von LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen? iii) welche

Bedeutung hat RelB für die Entstehung von B-Zelltumoren in gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen?

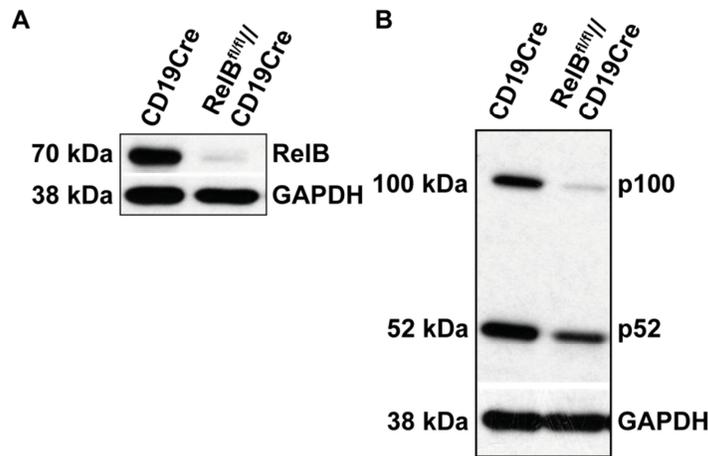
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges auf das B-Zellkompartiment in den sekundären lymphoiden Organen

RelB, ein Transkriptionsfaktor des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges, wird ab dem B-Zellentwicklungsstadium der kleinen Prä-B-Zelle verstärkt exprimiert (immgen.org). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Reduktion des Milzgewichtes und der B-Zellzahlen in der Milz signifikant sind und falls ja, welche B-Zellpopulationen genau in den RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Kontrollmäusen reduziert sind. Außerdem sollte näher untersucht werden, welchen Einfluss eine B-Zell-spezifische Deletion von RelB auf die B-Zelldifferenzierung, die B-Zellaktivierung sowie das Überleben von B-Zellen hat. Um einen B-Zell spezifischen Knockout von RelB zu generieren, wurden konditionale RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit CD19Cre Mäusen verpaart. In den CD19Cre Mäusen steht die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des B-Zell-spezifischen CD19-Promotors. Durch die Kreuzung der beiden Mauslinien entstehen RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse, in denen das mit loxP-Stellen flankierte Exon 4 des RelB Gens durch die Cre-Rekombinase in B-Zellen deletiert wird und es somit B-Zell-spezifisch zum Verlust des RelB Proteins kommt. Die Kreuzung mit CD19Cre Mäusen führt bereits zu einer Deletion in den frühen Stadien der B-Zellentwicklung. Das Maximum der Deletionseffizienz wird aber erst in der Peripherie erreicht. Die CD19Cre Mäuse wurden als Kontrollmäuse verwendet und für die nachfolgend gezeigten Experimente waren alle Mäuse zwischen 8 und 16 Wochen alt.

##### 3.1.1 Die Expression der nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Komponenten in B-Zellen nach der Cre vermittelten Deletion

Um nachzuweisen, dass das RelB Protein nach der Deletion nicht mehr in B-Zellen der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse zu finden ist und um zu untersuchen wie sich diese Deletion auf die Expression der beiden weiteren nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Komponenten p100 und p52 auswirkt, wurde Gesamtprotein aus B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre und CD19Cre Mäusen präpariert und mit Hilfe der Western Blot Methode analysiert.

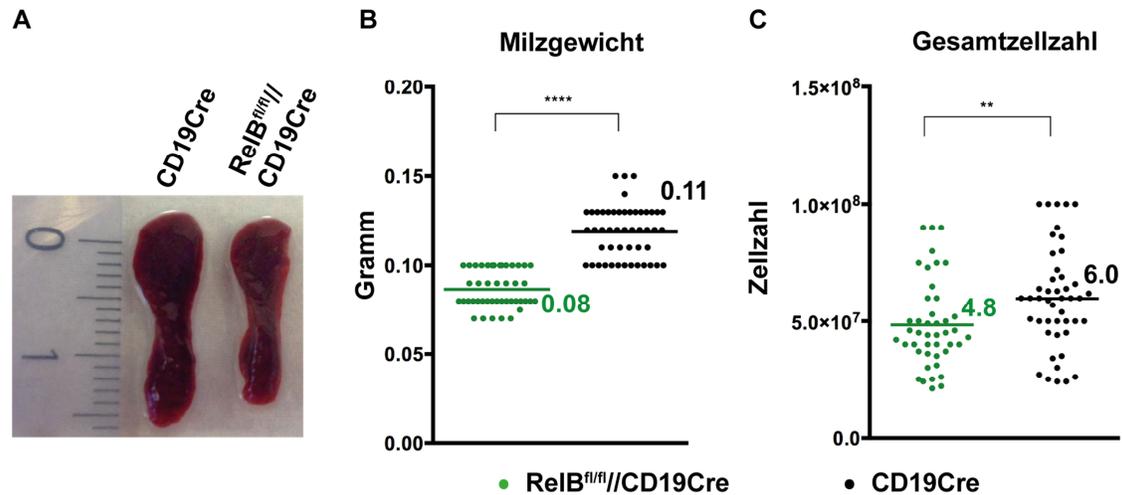


**Abbildung 8: Die nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Komponenten werden in den B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre vermindert exprimiert.** **A.** Die Expression von RelB in B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre und CD19Cre Mäusen. **B.** Der Western Blot zeigt die Expression von p100 und der prozessierten Form p52 in Milz B-Zellen von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen. Der Nachweis von GAPDH dient als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel für drei unabhängige Experimente.

In den B-Zellen der Milz von Kontrollmäusen konnte die spezifische Bande für RelB bei der erwarteten Größe von 70 kDa detektiert werden. Im Vergleich dazu war bei RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen die spezifische Bande für RelB stark vermindert. Die verbleibende schwache Bande könnte entweder auf eine inkomplette Deletion des RelB-Gens oder auf eine Verunreinigung von T-Zellen in der B-Zellpräparation zurückzuführen sein. Nach der B-Zellaufreinigung wird eine Reinheit von ca. 95-98% erreicht. Da in T-Zellen der Milz RelB in vergleichbaren Mengen wie in B-Zellen exprimiert wird (immgen.org), ist es sehr wahrscheinlich, dass die verbleibende Bande bei den RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen von den verbleibenden T-Zellen kommt (Abbildung 8A). Die Inaktivierung von RelB in B-Zellen führte außerdem, im Vergleich zu B-Zellen der Kontrolle, zu einer Verminderung des Proteingehaltes von p100 und von p52 (Abbildung 8B).

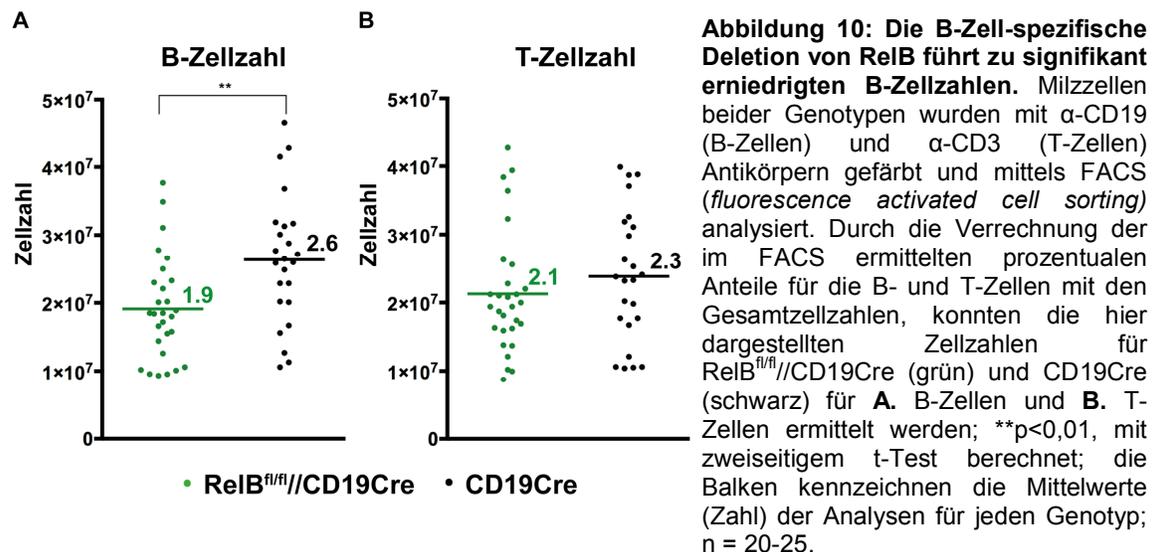
### 3.1.2 RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse weisen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen eine signifikante Reduktion des Milzgewichtes und der B-Zellzahlen auf

Kristina Stojanovic stellte in ihrer Doktorarbeit ein tendenziell reduziertes Milzgewicht und weniger B-Zellen in der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Kontrollmäusen fest. Um zu untersuchen, ob diese Daten signifikant sind, wurden die Milzgröße und die Milzzellzahlen von einer größeren Anzahl von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre und CD19Cre Mäusen ermittelt. Es konnte festgestellt werden, dass Mäuse mit RelB-defizienten B-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen, eine signifikante Reduktion des Milzgewichtes und der Milzzellzahlen aufweisen (Abbildung 9).



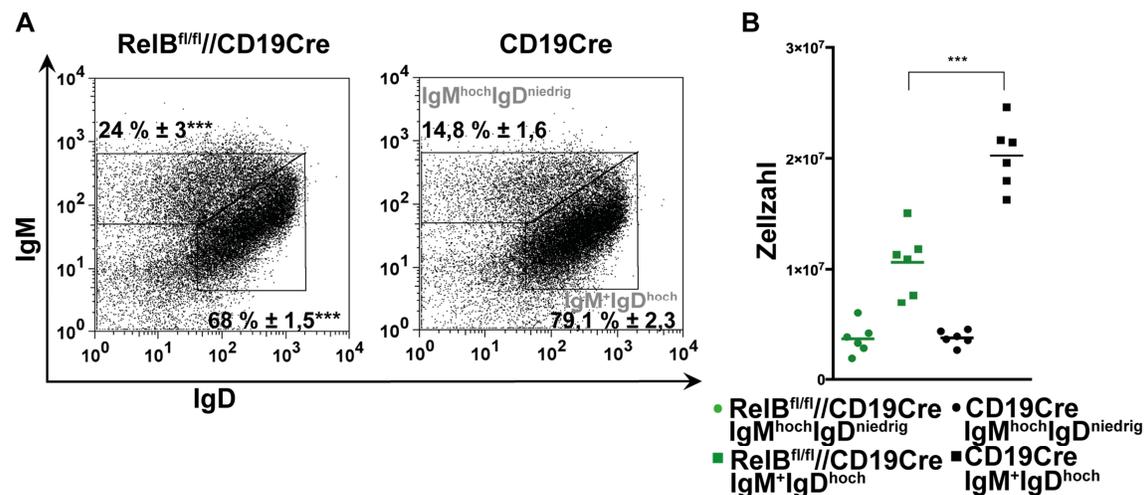
**Abbildung 9: RelB Inaktivierung in B-Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion des Milzgewichts und der Gesamtzellzahlen.** **A.** Größenvergleich der Milzen einer CD19Cre Maus (links) und einer RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre (rechts) Maus. **B.** Darstellung der Milzgewichte von CD19Cre Mäusen (schwarz) und RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre (grün). **C.** Die Gesamtzellzahlen der Milzen von CD19Cre Mäusen (schwarz) und RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre (grün) wurden mittels Zellzählung ermittelt. \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001, mit zweiseitigem t-Test berechnet; der Balken kennzeichnet den Mittelwert (Zahl) aller Datenpunkte für jeden Genotyp; n = 45-50.

Um herauszufinden, ob hauptsächlich die B-Zellen in der Milz der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre erniedrigt sind, wurden die B- und T-Zellzahlen ermittelt. In RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen waren die B-Zellzahlen signifikant reduziert, wohingegen bei der T-Zellzahl kein signifikanter Unterschied zur CD19Cre Kontrolle festgestellt werden konnte (Abbildung 10).



### 3.1.3 Die Deletion von RelB in B-Zellen führt zu einer erkennbaren Reduktion der $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{hoch}}$ B-Zellpopulation in der Milz

Um herauszufinden, welche B-Zellpopulationen in der Milz der  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  Mäuse im Vergleich zu  $\text{CD19Cre}$  Mäusen erniedrigt sind, wurden Milzzellen mit Antikörpern gegen B220, IgM und IgD gefärbt. Man kann durch diese Färbung die folliculären B-Zellen ( $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{hoch}}$ ) von den Marginalzonen B-Zellen, B1 B-Zellen und den transitionalen B-Zellen ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{IgD}^{\text{niedrig}}$ ) unterscheiden. In der Abbildung 11A ist gezeigt, dass die Inaktivierung von RelB in B-Zellen zu einer Erhöhung um 10% bei der  $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{IgD}^{\text{niedrig}}$  B-Zellpopulation und zu einer Erniedrigung um 10% bei der  $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{hoch}}$  B-Zellpopulation führte. Die Berechnung der Gesamtzellzahlen (Abbildung 11B) ergab, dass die  $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{hoch}}$  B-Zellen (folliculäre B-Zellen) in  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  Mäusen im Vergleich zu  $\text{CD19Cre}$  Mäusen signifikant erniedrigt waren, es jedoch keinen signifikanten Unterschied bezüglich der  $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{IgD}^{\text{niedrig}}$  B-Zellpopulation (Marginalzonen, B1 und transitionalen B-Zellen) zwischen den beiden Genotypen gab. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass in  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  Mäusen hauptsächlich die Anzahl der folliculären B-Zellen in der Milz reduziert ist.

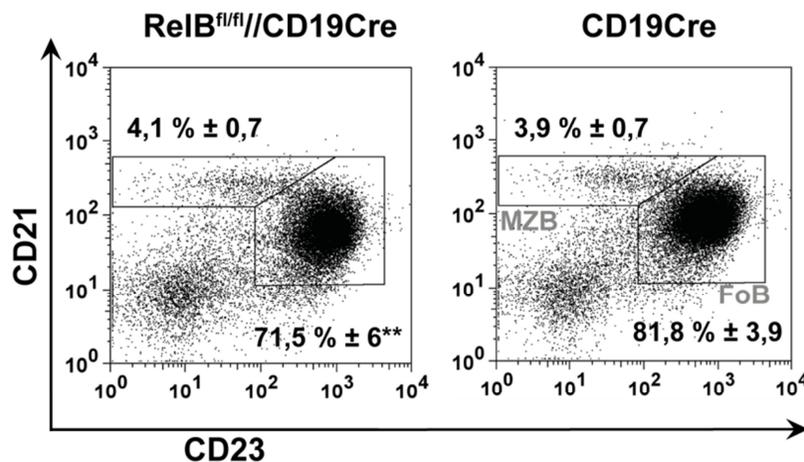


**Abbildung 11: Die Inaktivierung von RelB in B-Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion der folliculären B-Zellen in der Milz. A.** Milzzellen von  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  und  $\text{CD19Cre}$  Mäusen wurden mit  $\alpha\text{-B220}$ ,  $\alpha\text{-IgM}$  und  $\alpha\text{-IgD}$  Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Für die FACS-Analysen wurde jeweils zuerst auf lebende Lymphozyten und dann auf  $\text{B220}^+$  B-Zellen gated. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung mit dem Mittelwert aller Analysen und der Standardabweichung für jeden Genotyp. **B.** Mit Hilfe der prozentualen Anteile aus den FACS-Analysen und der Gesamt-B-Zellzahlen konnten die absoluten Werte für die  $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{IgD}^{\text{niedrig}}$  B-Zellpopulation und die  $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{hoch}}$  B-Zellpopulation für  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  Mäuse (grün) und  $\text{CD19Cre}$  Mäuse (schwarz) ermittelt werden.  $***p < 0,001$ , mit zweiseitigem t-Test berechnet;  $n = 6$ .

Um zu untersuchen, ob die Anteile innerhalb der  $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{IgD}^{\text{niedrig}}$  B-Zellpopulation bei  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  Mäusen verändert sind, wurden weitere Färbungen zur Bestimmung der Anzahl von Marginalzonen B-Zellen, B1 und transitionalen B-Zellen durchgeführt.

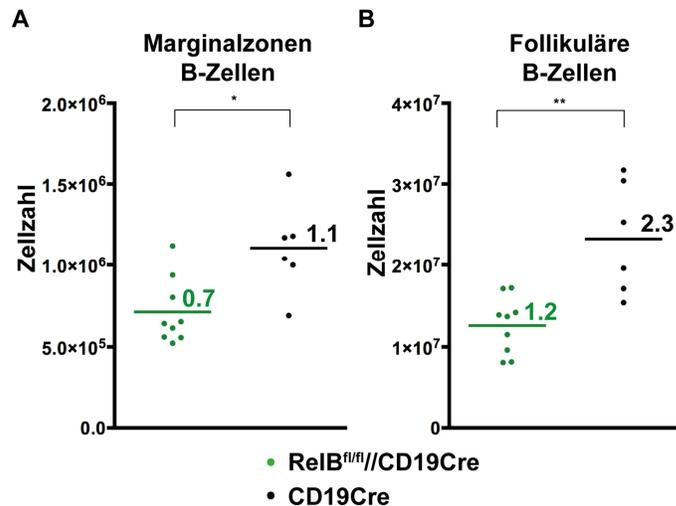
### 3.1.4 In der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen sind vorwiegend reife B2 B-Zellen reduziert

Um die Anzahl der Marginalzonen B-Zellen zu bestimmen, wurden die Milzzellen von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen mit Antikörpern gegen B220, CD21 und CD23 gefärbt. Mit dieser Färbung können Marginalzonen B-Zellen (CD21<sup>hoch</sup>CD23<sup>niedrig</sup>) von folliculären B-Zellen (CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) im FACS unterschieden werden. In der Milz der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse konnte für die prozentuale Anzahl der Marginalzonen B-Zellen keine Veränderung im Vergleich zu CD19Cre Mäusen festgestellt werden. Mit dieser Färbung konnte außerdem die Aussage von Punkt 3.1.3 bestätigt werden, dass die B-Zell-spezifische Deletion von RelB zu einer signifikanten prozentualen Erniedrigung des Anteils der CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> B-Zellen (folliculären B-Zellen) führt.



**Abbildung 12: Die B-Zell-spezifische Deletion von RelB führt zu einer signifikanten prozentualen Reduktion der folliculären B-Zellen in der Milz.** Milzzellen der beiden Genotypen wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD21 und  $\alpha$ -CD23 Antikörpern gefärbt, um folliculäre B-Zellen (CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>; FoB) von Marginalzonen B-Zellen (CD21<sup>hoch</sup>CD23<sup>niedrig</sup>, MZB) zu unterscheiden. Für die FACS-Analysen wurde auf lebende Lymphozyten und B220<sup>+</sup> B-Zellen vorgegattet. Dargestellt ist eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit dem Mittelwert aller Analysen und der Standardabweichung. \*\*p<0,01, mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 6-8.

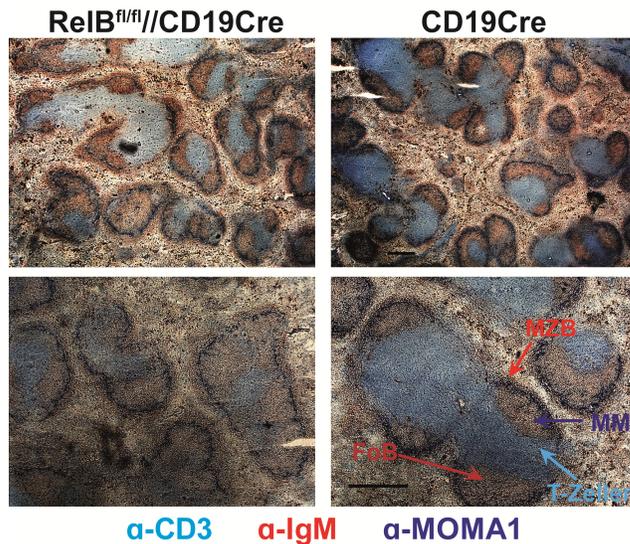
Die Berechnung der absoluten Zellzahlen ergab für RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse im Vergleich zu CD19Cre Mäusen, eine erkennbare Erniedrigung der Marginalzonen B-Zellen und eine starke, signifikante Reduktion in der Anzahl an folliculären B-Zellen in der Milz.



**Abbildung 13: Die Deletion von RelB in B-Zellen führt zu signifikant erniedrigten Marginalzonen und follikulären B-Zellzahlen in der Milz.**

Durch die Verrechnung der aus den FACS-Analysen ermittelten prozentualen Anteile für Marginalzonen B-Zellen und follikulären B-Zellen mit den Gesamt-B-Zellzahlen, konnte für RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre (grün) und CD19Cre (schwarz) Mäuse die Anzahl von Marginalzonen B-Zellen **A.** und follikulären B-Zellen **B.** errechnet werden. Der schwarze Balken kennzeichnet den Mittelwert (Zahl) aller Analysen für jeden Genotyp. \*p<0,05; \*\*p<0,01, mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 8-9.

Um zu untersuchen, ob diese signifikant erniedrigte Anzahl an follikulären und Marginalzonen B-Zellen eine Auswirkung auf die Architektur der Milz hat, wurden Gefrierschnitte für beide Genotypen angefertigt. Die Schnitte wurden dann mit  $\alpha$ -CD3 (T-Zellen, hellblau),  $\alpha$ -Moma-1 (metalophile Makrophagen, dunkelblau) und  $\alpha$ -IgM (B-Zellen, rot) Antikörpern gefärbt und histologisch untersucht. Im Follikel sind die T-Zellen und die follikulären B-Zellen getrennt voneinander lokalisiert. Die metallophilen Makrophagen liegen am inneren Marginalsinusrand und außerhalb des Makrophagenrings beginnt die Marginalzone, welche die Marginalzonen B-Zellen beheimatet. Die Histologie zeigt, dass die Follikelstruktur in RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen erhalten blieb, der Bereich der Marginalzone mit den Marginalzonen B-Zellen aber in RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen etwas breiter erscheint (Abbildung 14).



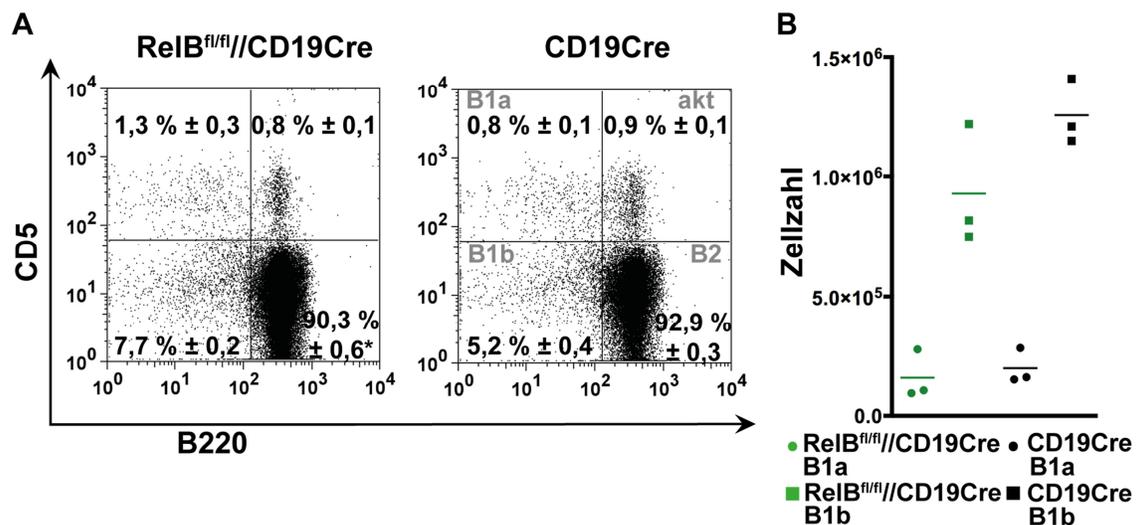
**Abbildung 14: In der Milz der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Maus erscheint die Marginalzone breiter.**

Gefrierschnitte der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre (links) und CD19Cre Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -IgM (B-Zellen; rot),  $\alpha$ -CD3 (T-Zellen; hellblau) und  $\alpha$ -MOMA-1 (metalophile Makrophagen; dunkelblau) Antikörpern gefärbt.

Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Histologiebild von mindestens 3 Mäusen pro Genotyp. MZB = Marginalzonen B-Zellen; FoB = follikuläre B-Zellen; MM = metallophile Makrophagen; Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m; obere Reihe 5  $\times$  und untere Reihe 10  $\times$  Vergrößerung.

### 3.1.5 Mäuse mit RelB-defizienten B-Zellen lassen keinen Unterschied in der B1 B-Zellpopulation erkennen

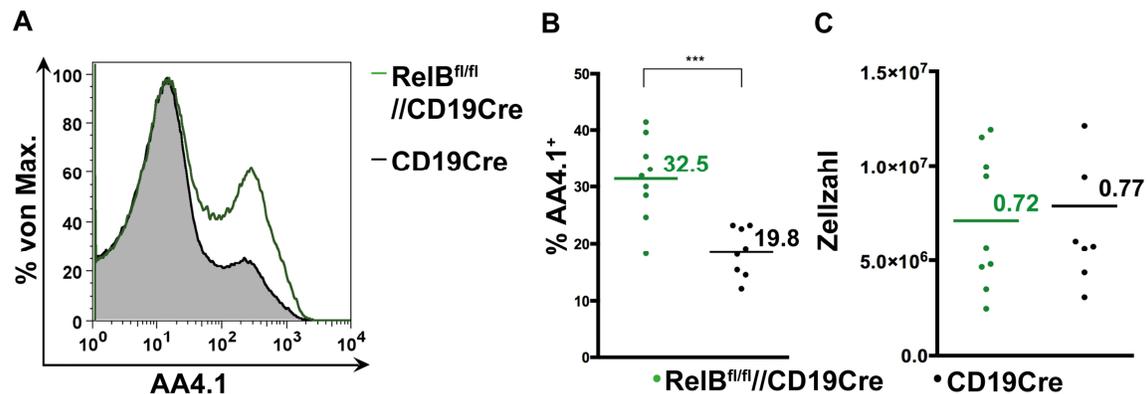
Als nächstes wurde untersucht, ob in der Milz die Anzahl der B1 B-Zellen, die ebenfalls den Phänotyp  $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{IgD}^{\text{niedrig}}$  haben, erhöht ist. B1 B-Zellen sind vorwiegend in der Peritonealhöhle lokalisiert und sind durch den Phänotyp  $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{IgD}^{\text{niedrig}}\text{CD23}^{\text{niedrig}}\text{B220}^{\text{niedrig}}$  charakterisiert. Sie können anhand der CD5 Expression in B1a ( $\text{CD5}^+$ ) und B1b ( $\text{CD5}^-$ ) Zellen unterteilt werden (Baumgarth 2011). Kristina Stojanovic zeigte 2013 in ihrer Doktorarbeit, dass die Deletion von RelB keinen Einfluss auf die B1 B-Zellpopulation in der Peritonealhöhle hat. Um den Anteil der B1 B-Zellen in der Milz zu bestimmen, wurden Milzzellen von  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  Mäusen und  $\text{CD19Cre}$  Mäusen mit dementsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert, wodurch B1a ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^+\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) und B1b ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) von B2 ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^+$ ) und aktivierten B-Zellen ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^+\text{B220}^+$ ) unterschieden werden konnten. Sowohl die prozentualen Anteile, als auch die Zellzahlen waren für B1a und B1b B-Zellen in der Milz der  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  Mäusen im Vergleich zu  $\text{CD19Cre}$  Mäusen vergleichbar.



**Abbildung 15:  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  Mäuse weisen keine großen Unterschiede in der B1a und B1b B-Zellpopulation in der Milz auf.** **A.** FACS Analyse von Zellen aus der Milz der beiden Genotypen welche mit  $\alpha\text{-IgM}$ ,  $\alpha\text{-CD5}$  und  $\alpha\text{-B220}$  Antikörpern gefärbt wurden, um B1a ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^+\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) und B1b ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) von B2 ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^+$ ) und aktivierten B-Zellen ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^+\text{B220}^+$ ) zu differenzieren. Für die Analysen wurde zuvor auf  $\text{IgM}^+$  B-Zellen vorgegattet. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS Färbung mit dem Mittelwert aller Analysen und der Standardabweichung. \*  $p < 0,05$ , mit zweiseitigem t-Test berechnet;  $n = 3-4$ . **B.** Durch die mittels FACS-Analysen ermittelten prozentualen Anteile für B1a und B1b B-Zellen für jeden Genotyp, konnte anhand der Gesamt-B-Zellzahlen die absoluten Zahlen für  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}//\text{CD19Cre}$  (grün) und  $\text{CD19Cre}$  (schwarz) errechnet werden;  $n = 3$ .

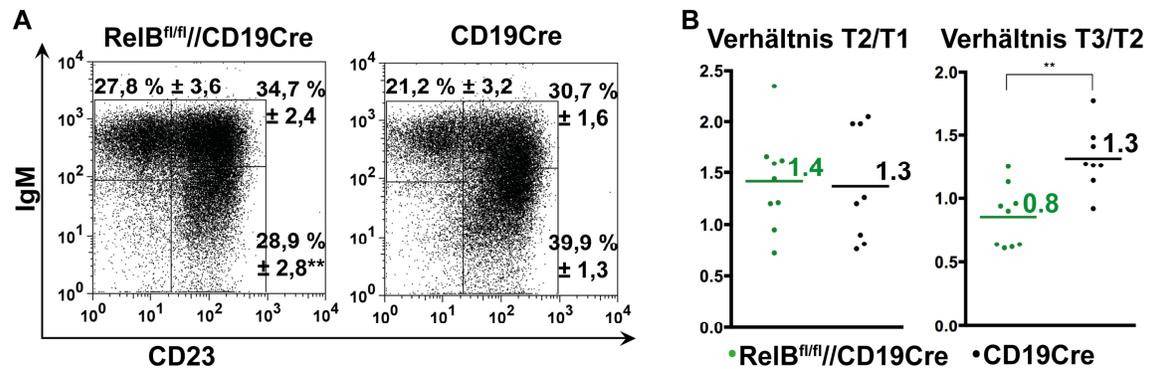
### 3.1.7 In der Milz von $RelB^{fl/fl}$ //CD19Cre Mäusen kommt es zu einer Reduktion der T3 transitionalen B-Zellen

Unreife B-Zellen aus dem Knochenmark haben ebenfalls den Phänotyp  $IgM^{hoch}IgD^{niedrig}$ . Sie sind die ersten B-Zellen, die über das Blut in die Milz einwandern und werden als transitionale B-Zellen bezeichnet (Chung et al. 2003). Diese können mittels FACS-Analysen anhand der Oberflächenmarkierung  $B220^+$  und  $AA4.1^+$  detektiert werden. Um den Anteil der transitionalen B-Zellen in der Milz zu bestimmen, wurden Milzzellen mit  $\alpha$ -B220 und  $\alpha$ -AA4.1 gefärbt. In Abbildung 16 ist gezeigt, dass in der Milz von  $RelB^{fl/fl}$ //CD19Cre Mäusen prozentual eine Erhöhung der  $AA4.1^+$  (transitionalen B-Zellen) im Vergleich zu CD19Cre Mäusen detektierbar war, jedoch waren die absoluten Zahlen aufgrund der erniedrigten Gesamt-B-Zellzahlen in der Milz im Vergleich zu CD19Cre Mäusen nicht verändert.



**Abbildung 16: In  $RelB^{fl/fl}$ //CD19Cre Mäusen kommt es zu einer prozentualen Erhöhung von transitionalen B-Zellen in der Milz.** **A.** FACS-Analyse von Milzzellen von  $RelB^{fl/fl}$ //CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen welche mit  $\alpha$ -B220 und  $\alpha$ -AA4.1 Antikörpern gefärbt wurden, um transitionale B-Zellen zu detektieren. Für die dargestellte Analyse wurde zuvor auf lebende Lymphozyten und  $B220^+$  B-Zellen vorgegattet. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm, welches die Überlagerung von  $AA4.1^+$  B-Zellen von  $RelB^{fl/fl}$ //CD19Cre (grün) und CD19Cre (schwarz) Mäusen zeigt. **B.** Gezeigt ist die prozentuale Verteilung der transitionalen B-Zellen ( $B220^+AA4.1^+$ ) in der Milz von  $RelB^{fl/fl}$ //CD19Cre (grün) und CD19Cre (schwarz) Mäusen. **C.** Durch Verrechnung der prozentualen Anteile für  $AA4.1^+$  B-Zellen aus den FACS-Analysen mit der Gesamt-B-Zellzahl, konnten für  $RelB^{fl/fl}$ //CD19Cre (grün) und CD19Cre (schwarz) die absoluten Werte für transitionale B-Zellen in der Milz ermittelt werden. Die Balken kennzeichnen die Mittelwerte (Zahl) aller Analysen für jeden Genotyp; \*\*\* $p < 0,001$ , berechnet mit dem zweiseitigen t-Test;  $n = 8-9$ .

Es gibt drei verschiedene Stadien der transitionalen B-Zellen: T1-T3. Die einzelnen Differenzierungsstadien können anhand der  $IgM/CD23$  Färbung unterschieden werden. T1 B-Zellen sind  $IgM^{hoch}CD23^-$ , T2 sind  $IgM^{hoch}CD23^{hoch}$  und T3 B-Zellen sind  $IgM^{niedrig}CD23^{hoch}$ . Um aufzuklären, ob bei den  $RelB^{fl/fl}$ //CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen ein Unterschied in den verschiedenen Stadien der transitionalen B-Zellen in der Milz vorliegt, wurden Milzzellen beider Genotypen mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert.

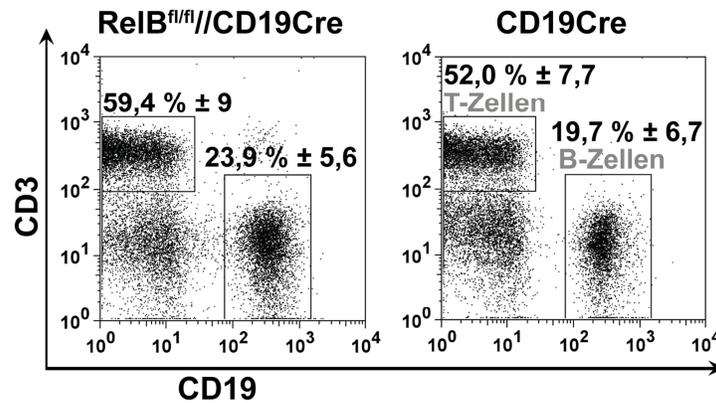


**Abbildung 17: Inaktivierung von RelB in B-Zellen führt zu einer Reduktion der T3 transitionalen B-Zellen.** **A.** Die AA4.1<sup>+</sup> B-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CD23 und IgM gefärbt um die T1-T3 B-Zellstadien im FACS aufzutrennen. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit den Mittelwerten aller Analysen und der Standardabweichung. **B.** Für die Berechnung der Verhältnisse von T1 zu T2 und T2 zu T3, wurden die prozentualen Anteile aus den FACS-Analysen zuerst mit der Gesamtzellzahl der AA4.1<sup>+</sup> B-Zellen verrechnet und anschließend die absoluten Zahlen der T1 B-Zellen durch die der T2 B-Zellen und die der T2 B-Zellen durch die der T3 B-Zellen dividiert. Die Balken kennzeichnen die Mittelwerte (Zahl) für alle Analysen für RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre (grün) und CD19Cre (schwarz) Mäuse. \*\*p<0,01, mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 8-9.

RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse weisen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen eine tendenzielle prozentuale Erhöhung von T1 B-Zellen, eine vergleichbare prozentuale Anzahl von T2 B-Zellen und eine signifikante prozentuale Reduktion von T3 B-Zellen in der Milz auf. Betrachtet man die Ergebnisse der Berechnung der Verhältnisse von T1 zu T2 und T2 zu T3 in Abbildung 17B, ist zu erkennen, dass RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse eine Reduktion von T3 transitionalen B-Zellen in der Milz aufwiesen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass RelB für die Entstehung von transitionalen B-Zellen im T1 und T2 Stadium keine Rolle spielt, jedoch für die Weiterentwicklung des T2 zum T3 Stadiums in der Milz wichtig ist.

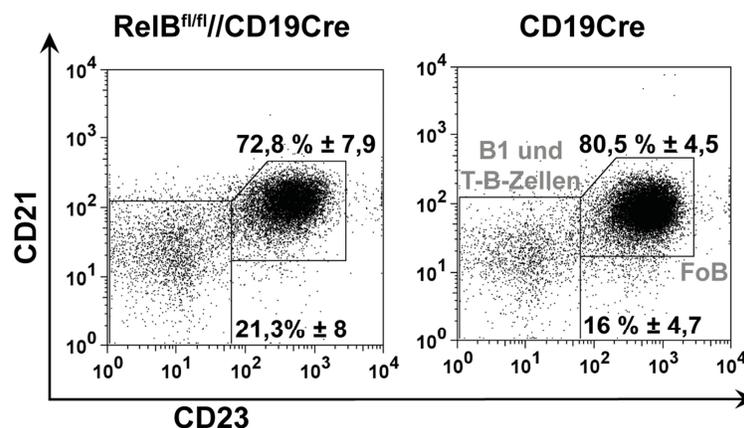
### 3.1.8 Mäuse mit RelB-defizienten B-Zellen zeigen keine großen Unterschiede bei der prozentualen Verteilung von zirkulierenden B-Zellpopulationen im Blut

Unter Punkt 3.1.2 wurde festgestellt, dass die Inaktivierung von RelB in B-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der B-Zellzahlen in der Milz führt. Interessant war es jetzt zu sehen, ob dieser Phänotyp auch im Blut zu erkennen ist. Die Analysen ergaben, dass die prozentuale Verteilung der B- und T-Zellen im Blut der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse vergleichbar mit der Verteilung in CD19Cre Mäusen war.



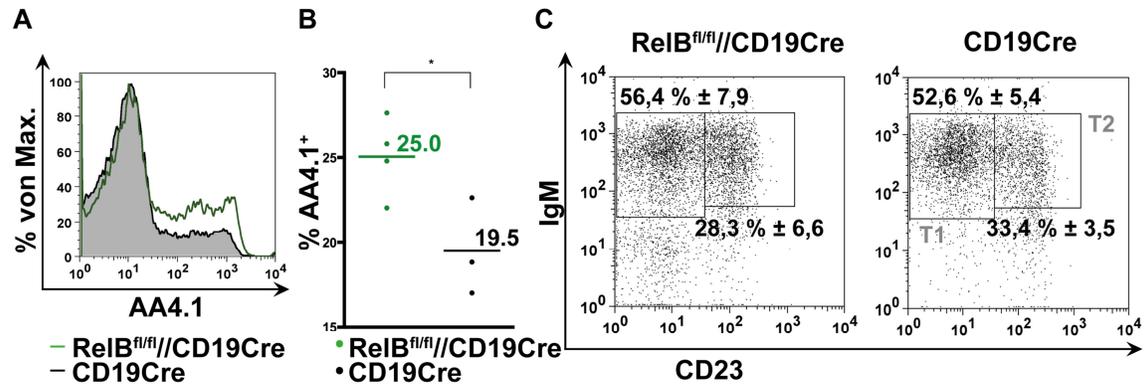
**Abbildung 18: Die Inaktivierung von RelB in B-Zellen hat keinen Einfluss auf das Verhältnis von B- und T-Zellen im Blut.** Färbung der Blutzellen von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre und CD19Cre Mäusen mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD19, um zirkulierende B- (CD19<sup>+</sup>) und T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) aufzutrennen. Für die FACS-Analysen wurde auf Topro-3 negative Zellen (lebende Zellen) und Lymphozyten vorgegattet. Dargestellt ist eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit dem Mittelwert aller Analysen und der Standardabweichung; n = 8.

Im Blut zirkulieren vorwiegend folliculäre B-Zellen und zu einem geringen Prozentsatz transitionale und B1 B-Zellen, jedoch keine Marginalzonen B-Zellen. Um herauszufinden, ob es Unterschiede in der prozentualen Verteilung der zirkulierenden B-Zellpopulationen zwischen den beiden Genotypen gibt, wurden Blutzellen von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen gefärbt und mittels FACS analysiert. Im Blut von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen konnte eine leichte prozentuale Reduktion der folliculären B-Zellen (CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) und eine geringe prozentuale Zunahme der CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation im Vergleich zu CD19Cre Mäusen nachgewiesen werden.



**Abbildung 19: Im Blut der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse sind die folliculären B-Zellen tendenziell reduziert.** Färbung der Blutzellen von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre und CD19Cre Mäusen  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD21 und  $\alpha$ -CD23 Antikörpern, um zirkulierende folliculäre B-Zellen (CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>; FoB) und transitionale und B1 B-Zellen (CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup>; B1 und T-B-Zellen) zu detektieren. Für die FACS-Analyse wurde auf lebende Lymphozyten und B220<sup>+</sup> B-Zellen vorgegattet. Dargestellt ist eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit dem Mittelwert aller Analysen und der Standardabweichung; n = 5.

Aus der Literatur ist bekannt, dass humane transitionale B-Zellen im T1 und T2 Stadium im Blut zur Milz wandern und erst dort zum T3 Stadium weiterdifferenzieren (Agrawal et al. 2013). Abbildung 19 zeigt, dass im Blut von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen prozentual mehr AA4.1<sup>+</sup> B-Zellen zirkulieren als bei CD19Cre Mäusen. Bezüglich der prozentualen Anteile von transitionalen B-Zellen im T1 und T2 Stadiums ist in RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen, eine tendenzielle prozentuale Vermehrung von zirkulierenden T1 B-Zellen erkennbar (Abbildung 20C).



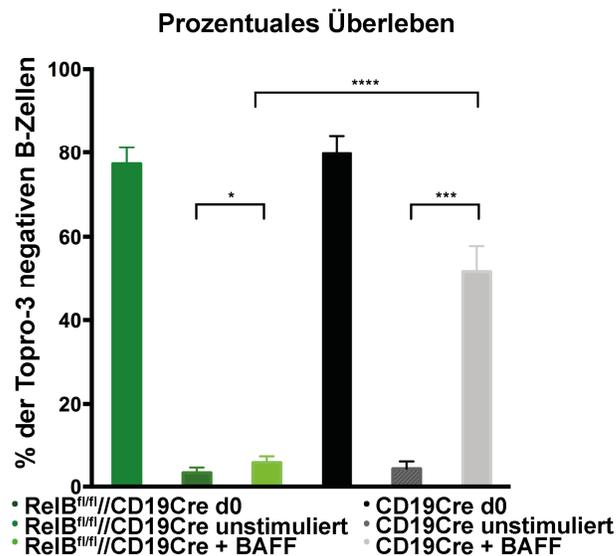
**Abbildung 20: Im Blut von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen zirkulieren prozentual mehr transitionale B-Zellen.** **A.** FACS-Analyse von Blutzellen der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre und CD19Cre Mäuse, welche mit  $\alpha$ -B220 und  $\alpha$ -AA4.1 Antikörpern gefärbt wurden, um transitionale B-Zellen zu detektieren. Für die dargestellte Analyse wurde zuvor auf lebende Lymphozyten und B220<sup>+</sup> B-Zellen vorgegattet. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm, welches die Überlagerung von AA4.1<sup>+</sup> B-Zellen von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre (grün) und CD19Cre (schwarz) Mäusen zeigt. **B.** Gezeigt ist die prozentuale Verteilung der transitionalen B-Zellen (B220<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>) im Blut von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre (grün) und CD19Cre (schwarz) Mäusen. Die Balken kennzeichnen die Mittelwerte (Zahl) aller Analysen für den jeweiligen Genotyp. **C.** Durch weitere Färbung der B220<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup> transitionalen Zellen mit Antikörpern gegen IgM und CD23 können T1 und T2 B-Zellstadien aufgetrennt werden. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS Färbung mit den Mittelwerten aller Analysen mit Standardabweichung; \* p<0,05, mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 3.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Inaktivierung von RelB in B-Zellen keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil von B-Zellen im Blut hat, jedoch dazu führt, dass prozentual mehr transitionale B-Zellen aber weniger folliculäre B-Zellen in RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen zirkulieren. In der Milz der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse sind im Vergleich zu CD19Cre Kontrollmäusen signifikant weniger folliculäre B-Zellen, Marginalzonen B-Zellen und transitionale B-Zellen im T3 Stadium. Es wurde beschrieben, dass das Zytokin BAFF ein wichtiger Faktor für das Überleben von diesen B-Zellpopulationen ist. Es wird angenommen, dass der BAFF-Rezeptor das B-Zellüberleben über den nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg vermittelt (Rowland et al. 2010). Um zu analysieren, ob die Marginalzonen B-Zellen, folliculären B-Zellen und transitionale B-Zellen im T3 Stadium bei RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen reduziert sind, weil sie ohne RelB nicht mehr auf BAFF Signale reagieren können, wurde das Überleben von B-Zellen  $\pm$  BAFF Stimulation genauer untersucht.

## 3.2 Die Rolle des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges für das Überleben, die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen *in vitro*

### 3.2.1 Das durch den BAFF Signalweg vermittelte Überleben der reifen B-Zellen wird über RelB reguliert

B-Zellen aus der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen wurden isoliert und unter BAFF Stimulation in Kultur gehalten. B-Zellen, die ohne BAFF Zugabe in Kultur gehalten wurden, dienten als Negativkontrolle. An Tag 0 (*ex vivo*) und an Tag 3 wurde der Anteil der lebenden B-Zellen beider Genotypen mittels Topro-3-Färbung im FACS bestimmt.



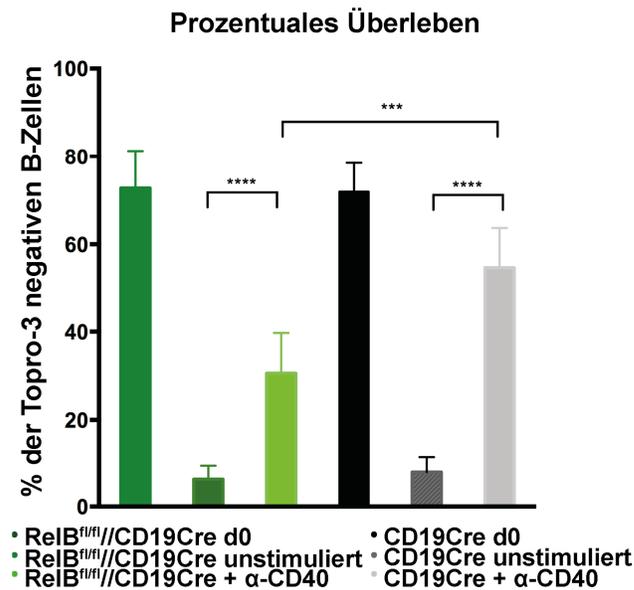
**Abbildung 21: RelB ist essentiell für das BAFF vermittelte Überleben der B-Zellen.** B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen (grüne Farbtöne) und von CD19Cre Mäusen (graue Farbtöne) wurden für drei Tage *in vitro* unter BAFF Stimulation kultiviert. Zur Kontrolle wurden auch unstimulierte B-Zellen beider Genotypen in Kultur genommen. Die prozentualen Anteile der Topro-3 negativen B-Zellen (lebende Zellen) wurden mittels FACS-Analyse an Tag 0 (*ex vivo*) und Tag 3 aus der *in vitro* Kultur bestimmt. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001; mit dem zweiseitigem t-Test berechnet; n = 3-4.

Im Gegensatz zu B-Zellen aus Kontrollmäusen, konnte die BAFF Stimulation den RelB-defizienten B-Zellen nahezu keinen Überlebensvorteil vermitteln. An Tag 3 war das Überleben von BAFF stimulierten B-Zellen der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse (hellgrüner Balken) mit 5 % lebenden Zellen zu stimulierten B-Zellen der CD19Cre Mäuse (hellgrauer Balken) mit 51 % lebenden Zellen, signifikant reduziert. Die Negativkontrollen beider Genotypen überlebten unstimuliert die drei Tage in Kultur mit rund 5 % vergleichbar.

### 3.2.2 Die CD40 Stimulation kann das Überleben von RelB-defizienten B-Zellen verbessern

Es ist aus der Literatur bekannt, dass die CD40 Stimulation sowohl die Aktivierung als auch das Überleben von B-Zellen fördert (Harnett 2004). Durch die Stimulation können der kanonische und nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg aktiviert werden, wobei die Aktivierung des nicht-kanonischen Weges insbesondere wichtig für das verbesserte Überleben der B-

Zellen zu sein scheint (Hostager & Bishop 2013). Um zu untersuchen, ob das Überleben der RelB-defizienten B-Zellen *in vitro* durch CD40 Stimulation gesteigert werden kann, wurden B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen mit  $\alpha$ -CD40 stimuliert und für drei Tage in Kultur gehalten. Unstimulierte B-Zellen beider Genotypen wurden als Negativkontrolle kultiviert.

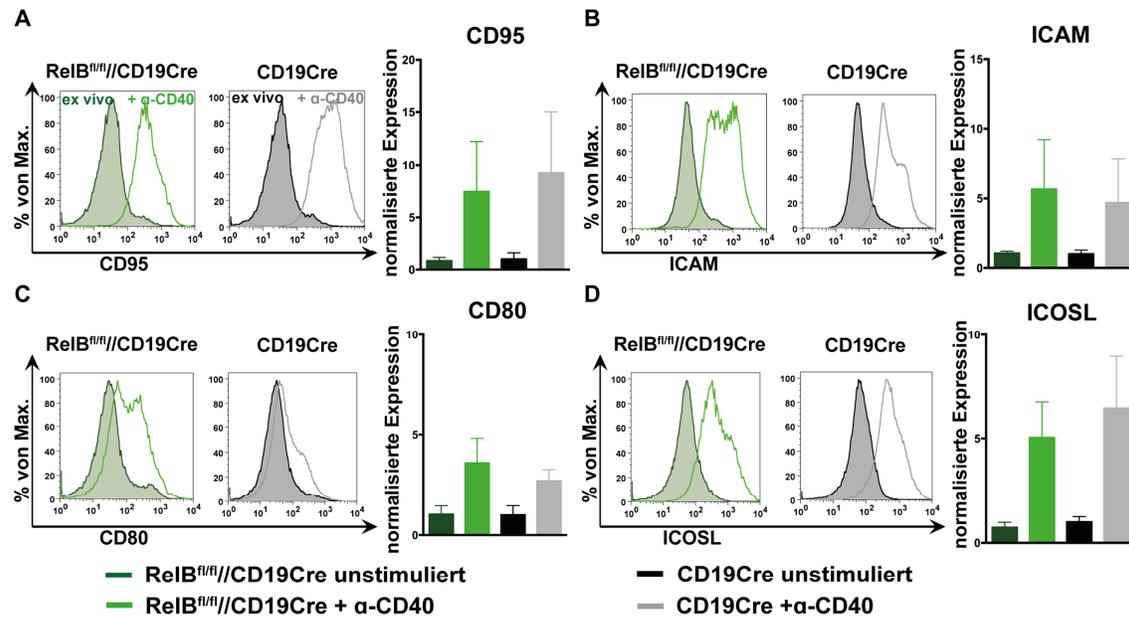


**Abbildung 22: Das Überleben der RelB-defizienten B-Zellen kann durch  $\alpha$ -CD40 Stimulation *in vitro* verbessert werden.** B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen (grüne Farbtöne) und von CD19Cre Mäusen (graue Farbtöne) wurden für drei Tage unter  $\alpha$ -CD40 Stimulation *in vitro* kultiviert. Zur Kontrolle wurden auch B-Zellen ohne Stimulation von beiden Genotypen in Kultur genommen. An Tag 0 (*ex vivo*) und Tag 3 wurden die lebenden B-Zellen der Milz jedes Genotyps mittels Topro-3-Färbung im FACS detektiert. Dargestellt sind die Werte aller Analysen im Balkendiagramm. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001; mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 6-8.

Das Überleben der RelB-defizienten B-Zellen *in vitro* konnte mittels  $\alpha$ -CD40 Stimulation, im Gegensatz zur Stimulation mit BAFF verbessert werden (31 % überlebenden B-Zellen), wenn auch nicht so gut wie bei B-Zellen der Kontrolle, hier überlebten 54 %. Die drei Tage in Kultur ohne zusätzliche Stimulation überlebten die Negativkontrollen beider Genotypen mit rund 7 % vergleichbar.

### 3.2.3 RelB-defiziente B-Zellen können durch CD40 Stimulation *in vitro* aktiviert werden

Die  $\alpha$ -CD40 Stimulation führt zur Hochregulation der Aktivierungsmarker ICAM, ICOS-L, CD80 und CD95. Um herauszufinden, ob diese Aktivierungsmarker in RelB-defizienten B-Zellen ebenfalls hochreguliert werden, wurden B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre und CD19Cre Mäusen isoliert und für 3 Tage mit und ohne  $\alpha$ -CD40 Stimulus kultiviert. An Tag 3 wurden die B-Zellen mit CD95,  $\alpha$ -ICAM,  $\alpha$ -ICOS-L und  $\alpha$ -CD80 Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert (Abbildung 23).

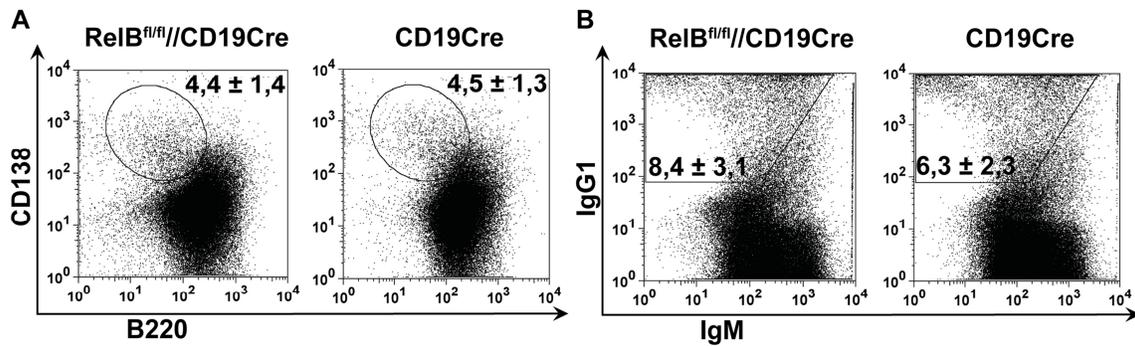


**Abbildung 23: RelB-defiziente B-Zellen können *in vitro* normal aktiviert werden.** B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen (grün) und von CD19Cre Mäusen (schwarz) wurden für drei Tage *in vitro* mit α-CD40 Stimulation kultiviert und die Hochregulation der Aktivierungsmarker wurde nach Antikörperfärbung mit α-CD95 (A), α-ICAM (B), α-CD80 (C), und α-ICOSL (D), mittels FACS-Analyse detektiert. Für die FACS-Analyse wurde mittels Topro-3-Färbung auf die lebenden Zellen vorgegattet. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp worin die Histogramme von Tag 0 (*ex vivo*) mit Tag 3 nach Stimulation überlagert wurden. Im Balkendiagramm sind die normalisierten Mediane der Expressionslevel aus allen FACS-Analysen mit Standardabweichung für jeden Genotyp mit und ohne Stimulation aufgezeigt. Normalisiert wurden die Mediane auf den Mittelwert der Mediane von Tag 0 der unstimulierten CD19Cre Kontrollmäuse.

Die Expression der Aktivierungsmarker wurde in RelB-defizienten B-Zellen durch α-CD40 Stimulation ähnlich gut wie in B-Zellen der Kontrolle induziert.

### 3.2.4 RelB Inaktivierung in B-Zellen hat keinen Einfluss auf die Bildung von Plasmablasten und ist nicht notwendig für den Klassenwechsel zu IgG1<sup>+</sup> B-Zellen *in vitro*

Um die Frage zu beantworten, welche Rolle RelB in B-Zellen für die Differenzierung zu Plasmablasten (PB; CD138<sup>hoch</sup>B220<sup>niedrig</sup>) und für den Klassenwechsel von IgM zu IgG1 *in vitro* spielt, wurden B-Zellen von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen isoliert und für 3 Tage unter LPS Stimulation (für PB Entstehung) oder für 3 Tage unter LPS und IL4 Stimulation (für den Klassenwechsel zu IgG1<sup>+</sup> B-Zellen) in Kultur gehalten. An Tag 3 wurden die Zellen aus der Kultur beider Genotypen für die Detektion von PB mit α-CD138 und α-B220 Antikörpern und für die der IgG1<sup>+</sup> Zellen mit α-IgM und α-IgG1 Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Abbildung 24 zeigt, dass die Abwesenheit von RelB in B-Zellen die Differenzierung zu PB und den Klassenwechsel zu IgG1<sup>+</sup> B-Zellen nicht beeinträchtigt.



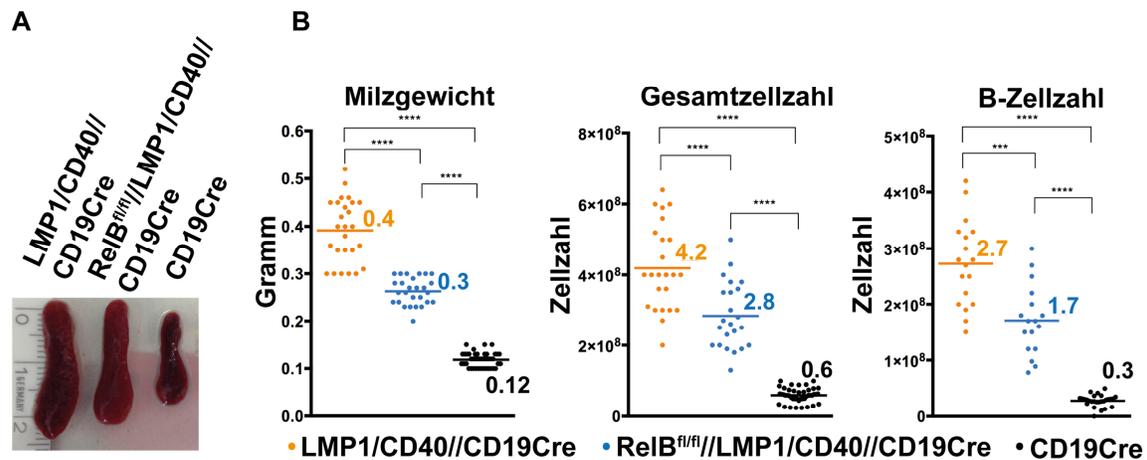
**Abbildung 24: RelB ist in B-Zellen nicht essentiell für die Differenzierung zu Plasmablasten und für den Klassenwechsel zu IgG1<sup>+</sup> B-Zellen.** **A.** B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen (linkes Bild) und von CD19Cre Mäusen (rechtes Bild) wurden für drei Tage *in vitro* unter LPS Stimulation kultiviert und Plasmablasten (CD138<sup>+</sup>B220<sup>niedrig</sup>) nach spezifischer Antikörperfärbung mit  $\alpha$ -CD138 und  $\alpha$ -B220, mittels FACS-Analyse detektiert. **B.** B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen (linkes Bild) und von CD19Cre Mäusen (rechtes Bild) wurden für drei Tage *in vitro* unter LPS und  $\alpha$ -IL4 Stimulation kultiviert und IgG1<sup>+</sup> B-Zellen nach  $\alpha$ -IgG1 und  $\alpha$ -IgM Färbung, mittels FACS-Analyse detektiert. Für beide Analysen wurde auf Topro-3 negative Zellen (lebende Zellen) gegatet und es ist jeweils eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit den Mittelwerten aller Analysen mit Standardabweichung dargestellt; n= 6-8.

### 3.3 Die Bedeutung der B-Zell-spezifischen RelB Deletion und des konstitutiv aktiven CD40 Signalweges auf den B-Zellphänotyp in der Milz

Es wurde unter Punkt 3.2.2 gezeigt, dass das Überleben von RelB-defizienten B-Zellen nach  $\alpha$ -CD40 Stimulation verbessert werden kann, wenn auch nicht so deutlich wie bei B-Zellen der Kontrolle. Es sollte deshalb untersucht werden, welche Auswirkungen die Inaktivierung von RelB in B-Zellen hat, die über ein LMP1/CD40 Fusionsprotein chronisch ein konstitutiv aktives CD40 Signal bekommen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg hyperaktiv ist und dass die B-Zell-spezifische LMP1/CD40 Expression in jungen Mäusen zur Splenomegalie, zur B- und T-Zell-expansion und zur verstärkten B-Zellaktivierung führt (Hömig-Hölzel et al. 2008). Es sollte durch die Inaktivierung von RelB in B-Zellen untersucht werden, welchen Einfluss der hyperaktive nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg auf den Phänotyp der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse hat. Um diese Frage zu beantworten, benötigten wir drei Mausstämme: 1. konditionale transgene LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse mit B-Zell-spezifischer konstitutiv aktiver CD40 Expression 2. RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse, in deren B-Zellen das CD40 Signal konstitutiv aktiv ist und gleichzeitig RelB inaktiviert ist und 3. CD19Cre Mäuse als Kontrolle.

### 3.3.1 RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion der Splenomegalie und der B-Zellexpansion im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen

Die Milzgröße, das Milzgewicht und auch die B-Zellzahlen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht, jedoch im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen signifikant reduziert. Die Daten der Abbildung 25 zeigen auch, dass die Hyperaktivität des nicht-kanonischen Signalweges in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen nur einen beschränkten Einfluss auf die Splenomegalie und B-Zellexpansion hat.

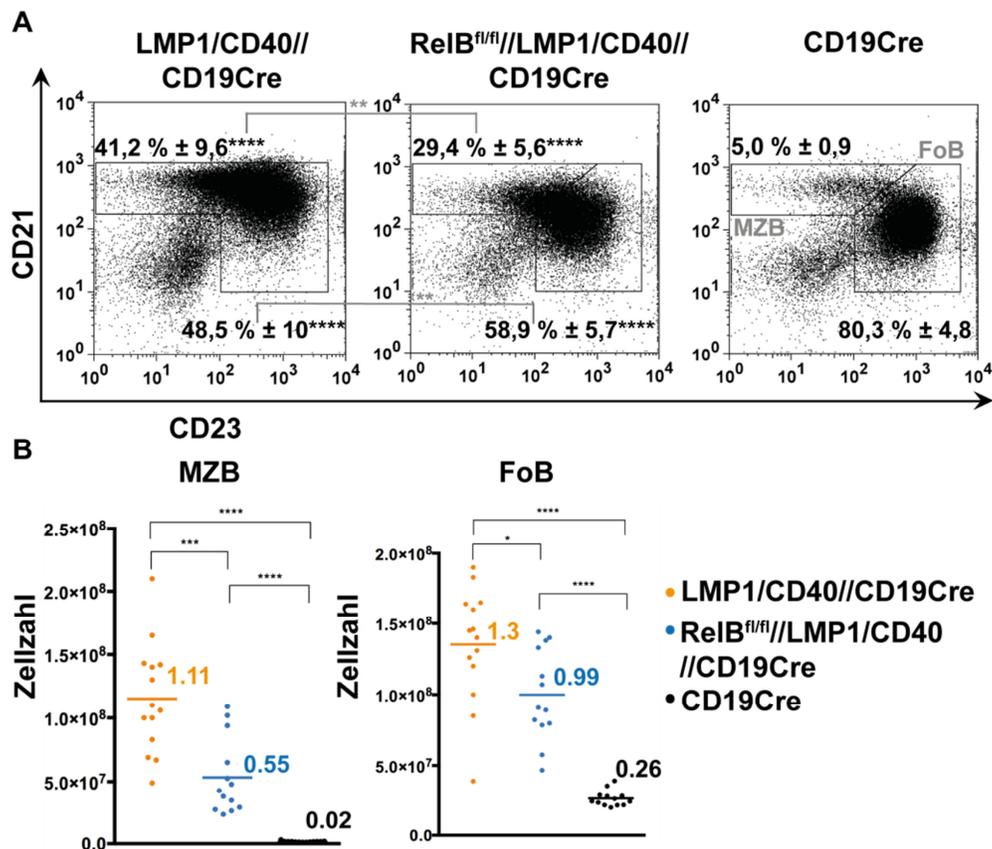


**Abbildung 25: Die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 Mäusen führt zu einer signifikanten Reduktion des Milzgewichtes und der B-Zellzahlen in der Milz. A.** Gezeigt ist die Milzgröße der drei Genotypen. **B.** Dargestellt ist das Milzgewicht, die Gesamt- und die B-Zellzahlen der Milz der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (orange), der RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (blau) und der CD19Cre Mäuse (schwarz). Um die absoluten B-Zellzahlen zu errechnen, wurden die Zellen mit Topro-3 gefärbt, um tote Zellen auszuschließen und mit einem  $\alpha$ -B220 Antikörper um B-Zellen im FACS zu detektieren. Die prozentualen Anteile aus den FACS-Analysen wurden dann mit dem Gesamtzellzahlen verrechnet; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; berechnet mit dem zweiseitigen t-Test;  $n = 25-27$ .

### 3.3.2 Die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen führt zu einer Veränderung des Phänotyps der Marginalzonen und folliculären B-Zellen der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse

Um zu untersuchen, welche B-Zellpopulationen RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen reduziert sind, wurde zuerst die Verteilung der Marginalzonen B-Zellen (CD21<sup>hoch</sup>CD23<sup>niedrig</sup>) und folliculären B-Zellen (CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) im FACS analysiert (Abbildung 26A). Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle noch zu einer prozentualen Erhöhung der Marginalzonen B-Zellen in der Milz führt, wenn auch weniger

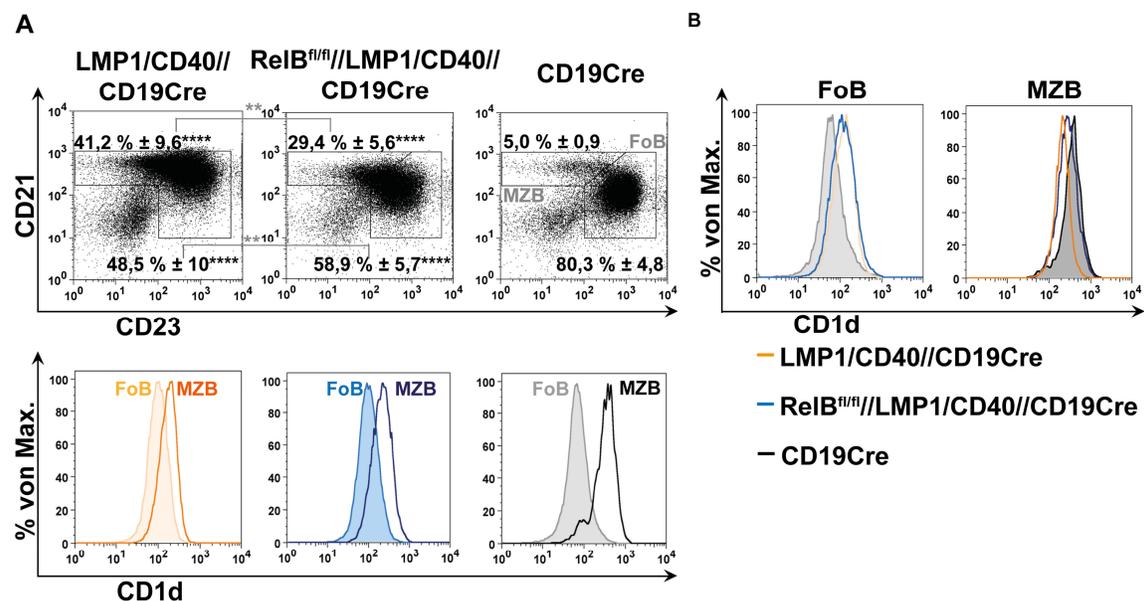
prominent als bei LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen und die prozentualen Anteile der folliculären B-Zellen dementsprechend vermindert waren. Die Verrechnung mit den Gesamt-B-Zellzahlen ergab, dass  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen eine signifikante Reduktion der Marginalzonen B-Zellen und folliculären B-Zellen aufweisen. Beide B-Zellpopulationen waren im Vergleich zu CD19Cre Kontrollmäusen immer noch deutlich erhöht (Abbildung 26B).



**Abbildung 26: Die Deletion von RelB in LMP1/CD40 Mäusen führt im Vergleich zu LMP1/CD40 Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Marginalzonen B-Zellexpansion zugunsten der folliculären B-Zellen in der Milz. A.** Milzzellen von allen drei Genotypen wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD21 und  $\alpha$ -CD23 gefärbt und mittels FACS analysiert. Für die FACS-Analyse wurde auf  $B220^+$  B-Zellen vorgegattet. Durch die CD21/CD23 Färbung können Marginalzonen B-Zellen ( $CD21^{hoch}CD23^{niedrig}$ ) von folliculären B-Zellen ( $CD21^+CD23^+$ ) unterschieden werden. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit den Mittelwerten aller Analysen mit Standardabweichung; \*\*  $p < 0,01$  beschreibt die signifikanten Unterschied von  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen; \*\*\*\* $p < 0,0001$  stellt den signifikanten Unterschied zur CD19Cre Kontrolle dar;  $n = 14-15$ . **B.** Durch Verrechnung der prozentualen Anteile der Marginalzonen (MZB) und folliculären B-Zellen (FoB) mit den Gesamt-B-Zellzahlen, konnten die hier dargestellten absoluten Zellzahlen ermittelt werden; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; mit zweiseitigem t-Test berechnet;  $n = 14-15$ . Die Balken kennzeichnen die Mittelwerte (Zahlen) aller Datenpunkte pro Genotyp.

### 3.3.3 Marginalzonen B-Zellen der $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse zeigen im Vergleich zu folliculären B-Zellen eine verstärkte Expression des Markers CD1d

Ein weiterer Marker um Marginalzonen B-Zellen von folliculären B-Zellen zu unterscheiden ist CD1d. Er wird auf Marginalzonen B-Zellen im Vergleich zu folliculären B-Zellen verstärkt exprimiert. Um die Frage zu klären, ob die verstärkt auftretende  $CD21^{hoch}CD23^{niedrig}$  B-Zellpopulation in  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen auch tatsächlich Marginalzonen B-Zellen sind, wurden diese zusätzlich mit  $\alpha$ -CD1d gefärbt und das Expressionsmuster mit den folliculären B-Zellen und mit der CD19Cre Kontrolle im FACS verglichen (Abbildung 27).



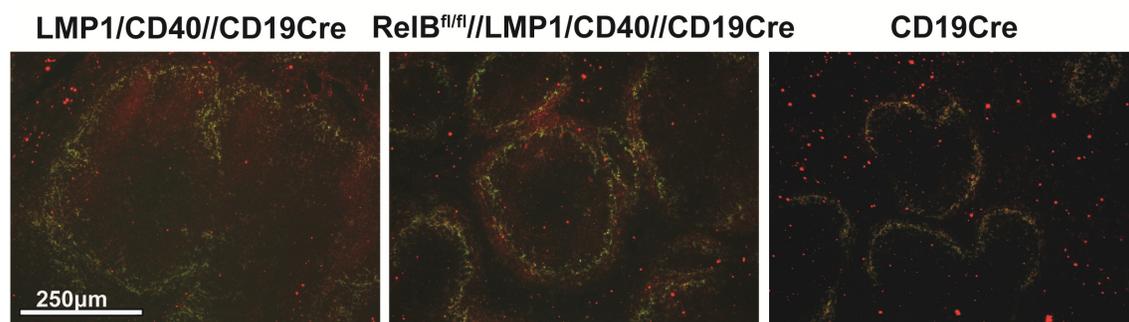
**Abbildung 27:** Die  $CD21^{hoch}CD23^{-}$  B-Zellpopulation in LMP1/CD40 Mäusen exprimiert im Vergleich zu folliculären B-Zellen verstärkt den Marker CD1d. **A.** Milzzellen von allen drei Genotypen wurden mit  $\alpha$ -CD21,  $\alpha$ -CD23 und  $\alpha$ -CD1d Antikörpern gefärbt. Mittels FACS-Analyse auf  $B220^{+}$  B-Zellen konnten die Marginalzonen B-Zellen ( $CD21^{hoch}CD23^{niedrig}$ ; MZB) von den folliculären B-Zellen ( $CD21^{+}CD23^{+}$ ; FoB) unterschieden (oberes Bild) werden. Im unteren Bild ist für jeden Genotyp die CD1d Expression der jeweiligen B-Zellpopulationen als Histogramm aufgezeigt. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp. **B.** Gezeigt ist hier die Überlagerung der CD1d Expression von folliculären B-Zellen (linkes Bild; FoB) und für Marginalzonen B-Zellen (rechtes Bild; MZB) von LMP1/CD40//CD19Cre (orange),  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre (blau) und CD19Cre Mäusen (schwarz); n = 15-20.

Es konnte gezeigt werden, dass die  $CD21^{hoch}CD23^{niedrig}$  B-Zellpopulation in  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen eine erhöhte Expression von CD1d im Vergleich zu folliculären B-Zellen aufwies. Allerdings war der Unterschied in der CD1d Expression zwischen Marginalzonen B-Zellen und folliculären B-Zellen in der CD19Cre Kontrolle stärker ausgeprägt als in den LMP1/CD40 Mäusen, was darauf

zurückzuführen ist, dass die CD1d Expression in LMP1/CD40 Mäusen (mit und ohne RelB) im Vergleich zu Kontrollmäusen auf folliculären B-Zellen höher und auf Marginalzonen B-Zellen verringert ist.

### 3.3.4 Nach Inaktivierung von RelB in B-Zellen sitzen CD1d<sup>+</sup> Zellen in der Marginalzone

Kristina Stojanovic konnte in ihrer Doktorarbeit 2013 zeigen, dass in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen eine starke Akkumulation von B-Zellen in den stark vergrößerten Follikeln auftritt und eine vergleichbar schmale Marginal-B-Zellzone zu detektieren ist, die nicht die massive Expansion der Marginalzonen B-Zellen, die im FACS sichtbar war, widerspiegelt. Im Vergleich dazu erschien in den RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen die Marginalzone wieder breiter. Die Follikel waren immer noch vergrößert, wenn auch nicht so prominent wie in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. Um herauszufinden, wo die CD1d<sup>+</sup> Zellen in den RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen lokalisiert sind, wurden Cryoschnitte der Milz von allen drei Genotypen mit CD1d-Bio (primärer Antikörper) und SA-594 (sekundärer Antikörper, rot) und MOMA-1 (grün) gefärbt und histologisch untersucht.

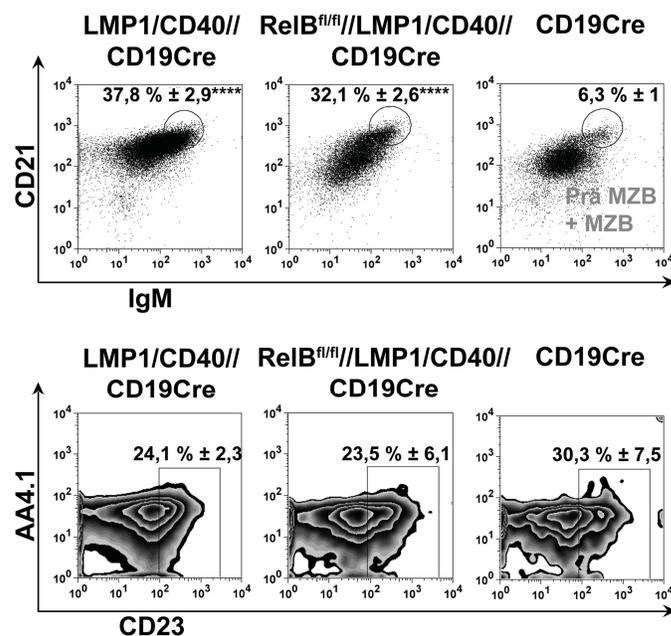


**Abbildung 28: Im Gegensatz zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen sitzen die CD1d<sup>+</sup> Zellen in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen in der Marginalzone.** Cryoschnitte der Milz von allen drei Genotypen wurden mit  $\alpha$ -CD1d (rot) und  $\alpha$ -MOMA-1 (grün) Antikörpern gefärbt und histologisch analysiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives histologisches Ergebnis für jeden Genotyp. Maßstabsbalken = 100 $\mu$ m; 10 x Vergrößerung; n = 3-4.

Die Auswertung der Histologie ergab, dass CD1d<sup>+</sup> Zellen in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen sich vermehrt in der Marginalzone befinden und nur wenige im Follikel detektierbar sind. Im Gegensatz dazu ist in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen die Mehrzahl der CD1d<sup>+</sup> Zellen im Follikel lokalisiert. Dies lässt vermuten, dass das konstitutive aktive CD40 Signal die Entstehung von Marginalzonen B-Zellen treibt, jedoch die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges verhindert, dass die gebildeten Marginalzonen B-Zellen in die Marginalzonen wandern können. Die Färbung der Kontrolle (CD19Cre) zeigt wie erwartet kleine Follikel und nur eine dünne Marginalzone.

### 3.3.5 Die verstärkte Differenzierung zu Marginalzonen B-Zellen beginnt in den LMP1/CD40 Mäusen im Prä-Marginalzonen B-Zellstadium

Um zu klären, ob die verstärkte Differenzierung zu Marginalzonen B-Zellen schon im Vorläuferstadium, dem Prä-Marginalzonen B-Zellstadium stattfindet, wurden B-Zellen aus der Milz von allen drei Genotypen mit Antikörpern gegen CD21, IgM, AA4.1 und CD23 gefärbt. Durch vorgaten auf die  $CD21^{hoch}IgM^{hoch}$  Population (Marginalzonen B-Zellen und Prä-Marginalzonen B-Zellen) und anschließender Auftrennung von AA4.1 gegen CD23 können die Prä-Marginalzonen B-Zellen ( $AA4.1^{niedrig}CD23^{hoch}$ ) von den Marginalzonen B-Zellen ( $AA4.1^{niedrig}CD23^{niedrig}$ ) unterschieden werden (Srivastava et al. 2005). Wie erwartet, ist der prozentuale Anteil der  $CD21^{hoch}IgM^{hoch}$  Population in  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöht. Der prozentuale Anteil der Prä-Marginalzonen B-Zellen ist bei allen drei Genotypen vergleichbar (Abbildung 29). Somit scheint das konstitutive CD40 Signal in B-Zellen die Differenzierung zu Marginalzonen B-Zellen schon ab dem frühen Prä-Marginalzonen B-Zellstadium zu treiben.

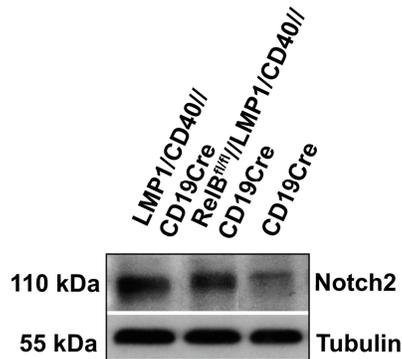


**Abbildung 29: Konstitutives CD40 treibt die Differenzierung zu Marginalzonen B-Zellen schon ab dem frühen Prä-Stadium.** B-Zellen der Milz von allen drei Genotypen wurden mit  $\alpha$ -CD21,  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -AA4.1 und  $\alpha$ -CD23 Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. In der FACS-Analyse wurde auf die  $CD21^{hoch}IgM^{hoch}$  B-Zellpopulation (Marginalzonen B-Zellen und Prä-Marginalzonen B-Zellen) vorgegattet. Anschließend wurden die Prä-Marginalzonen B-Zellen ( $AA4.1^{niedrig}CD23^{+}$ ) von den Marginalzonen B-Zellen ( $AA4.1^{niedrig}CD23^{niedrig}$ ) unterschieden. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit den Mittelwerten aller Analysen mit Standardabweichung; n = 4-5.

### 3.3.6 LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen weisen unabhängig von RelB eine erhöhte Notch2-Expression auf

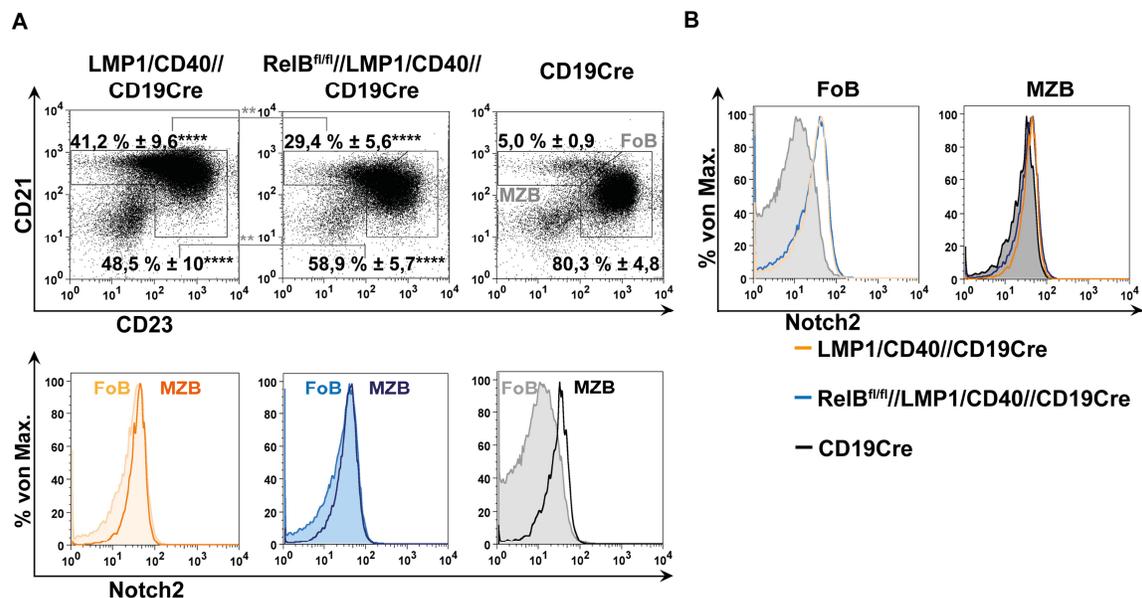
Aus der Literatur ist bekannt, dass Notch2 Signale für die Differenzierung zu Marginalzonen B-Zellen in der Milz essentiell sind (Pillai & Cariappa 2009; Hampel et al. 2011). Mäuse mit heterozygotem Notch2 Knockout in B-Zellen weisen keine Marginalzonen B-Zellen auf, wobei andere B-Zellpopulationen nicht beeinträchtigt sind (Saito et al. 2003). Daher sollte

untersucht werden, ob die LMP1/CD40 Expression in B-Zellen zu einer Hochregulation der Notch2-Expression führt und dadurch vermehrt Marginalzonen B-Zellen gebildet werden. Die Western Blot Analysen zeigen, dass  $RelB^{fl/fl}$ /LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen vermehrt Notch2 exprimieren.



**Abbildung 30: Notch2 wird in den B-Zellen der LMP1/CD40 Mäuse verstärkt exprimiert.** Der Western Blot zeigt die Expression von Notch2 (110 kDa) in B-Zellen der Milz von LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (links),  $RelB^{fl/fl}$ /LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (mittig) und CD19Cre Mäuse (rechts). Der Nachweis von Tubulin (55 kDa) dient als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel für drei unabhängige Experimente.

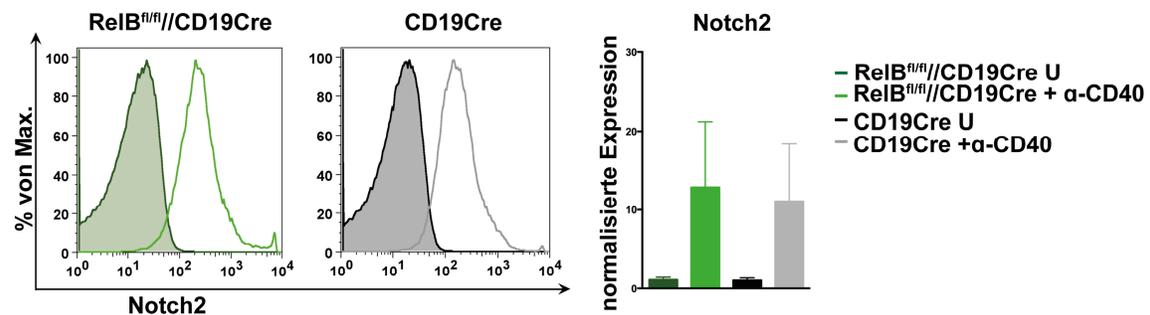
Marginalzonen B-Zellen exprimieren im Vergleich zu follikulären B-Zellen vermehrt Notch2 auf der Oberfläche. Um auszuschließen, dass die im Western Blot detektierte erhöhte Notch2-Expression in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen mit und ohne  $RelB$  auf den erhöhten Anteil an MZB's zurückzuführen ist, wurden Milzzellen von  $RelB^{fl/fl}$ /LMP1/CD40//CD19Cre, LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen mit  $\alpha$ -Notch2 Antikörpern gefärbt und mittels FACS-Analyse die Notch2 Expression auf der Oberfläche von Marginalzonen B-Zellen und follikulären B-Zellen untersucht.



**Abbildung 31. Follikuläre B-Zellen der LMP1/CD40 Mäusen exprimieren vermehrt Notch2 auf der Oberfläche.** A. Milzzellen von allen drei Genotypen wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD21,  $\alpha$ -CD23 und  $\alpha$ -Notch2 Antikörpern gefärbt und mittels FACS-Analyse auf Lymphozyten und B220<sup>+</sup> B-Zellen wurden

(Fortsetzung Bildunterschrift) die Marginalzonen B-Zellen ( $CD21^{\text{hoch}}CD23^{\text{niedrig}}$ ) und folliculäre B-Zellen ( $CD21^+CD23^+$ ) unterschieden (oberes Bild). Das untere Bild zeigt für jeden Genotyp die Überlagerung der Notch2 Expression für die jeweiligen B-Zellpopulationen als Histogramm. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit den Mittelwerten aller Analysen und der Standardabweichung. **B.** Dargestellt ist ein Histogramm, welches die Überlagerung der Notch2 Expression von Marginalzonen B-Zellen (linkes Bild) der LMP1/CD40//CD19Cre (orange),  $RelB^{\text{fl/fl}}$ //LMP1/CD40//CD19Cre (blau) und CD19Cre Mäusen (schwarz) zeigt. Das rechte Bild zeigt das Gleiche für folliculäre B-Zellen; MZB = Marginalzonen B-Zellen; FoB = folliculäre B-Zellen; n = 6-8.

Die Expression von Notch2 auf der Oberfläche von Marginalzonen B-Zellen von LMP1/CD40 Mäusen war mit der von Kontrollmäusen vergleichbar. Interessanterweise war jedoch bei LMP1/CD40 Mäusen, unabhängig von RelB, im Vergleich zu Kontrollmäusen, auch auf den folliculären B-Zellen eine Hochregulation von Notch2 auf der Oberfläche zu detektieren. Dies deutete darauf hin, dass die LMP1/CD40 Expression unabhängig von RelB zur Hochregulation von Notch2 führt. Um herauszufinden, ob die Notch2 Expression auch nach Stimulation des endogenen CD40-Rezeptors RelB unabhängig ist, wurden B-Zellen aus der Milz von  $RelB^{\text{fl/fl}}$ //CD19Cre und CD19Cre Mäusen isoliert und mit  $\alpha$ -CD40 stimuliert. Nach drei Tagen wurde mittels FACS von beiden Genotypen die Notch2 Expression auf der Oberfläche detektiert (Abbildung 32). Die Auswertung der Daten ergab, dass die Stimulation mit  $\alpha$ -CD40 *in vitro* unabhängig von RelB zur verstärkten Expression von Notch2 auf der Oberfläche von B-Zellen führt.

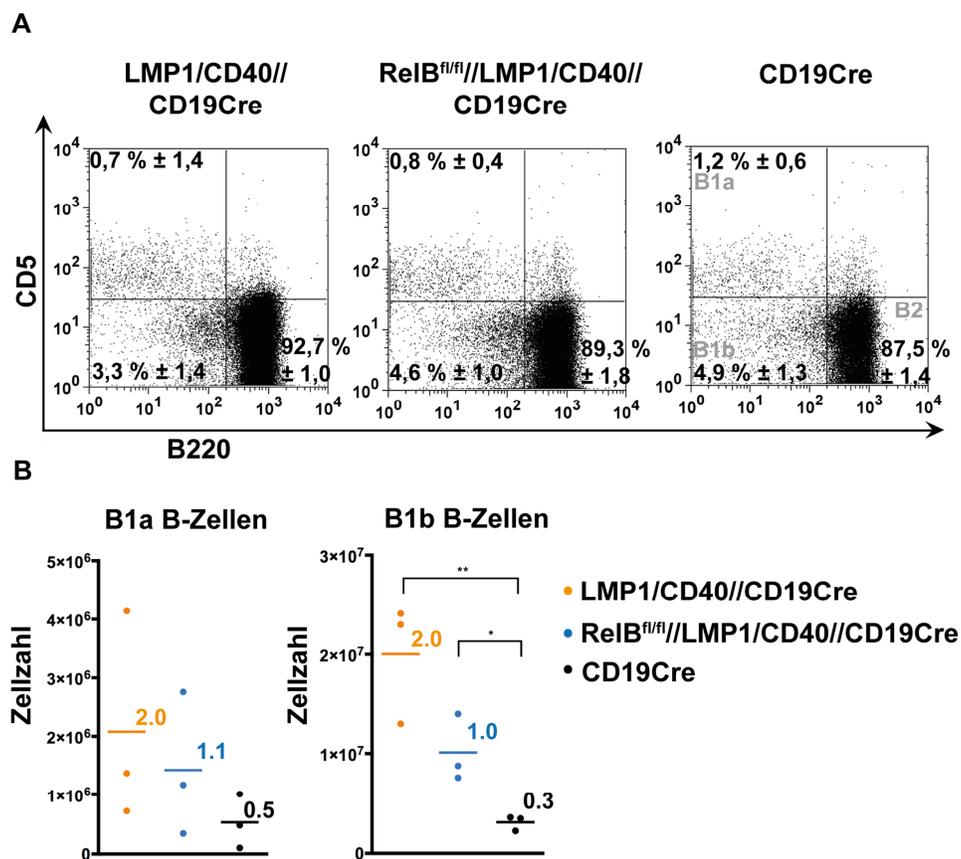


**Abbildung 32. *In vitro* führt die Stimulation mit  $\alpha$ -CD40 zu einer verstärkten Notch2 Expression auf der Oberfläche von B-Zellen.** B-Zellen der Milz von  $RelB^{\text{fl/fl}}$ //CD19Cre und CD19Cre Mäusen wurden mit  $\alpha$ -CD40 stimuliert und für drei Tage kultiviert. An Tag 0 (*ex vivo*) und Tag 3 wurden die kultivierten B-Zellen der beiden Genotypen mit  $\alpha$ -Notch2 gefärbt und mittels FACS die Notch2 Expression auf der Oberfläche detektiert. Für die FACS-Analysen wurde zuerst auf Topro-3 negative (lebende Zellen) gated. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm für den jeweiligen Genotyp, bei dem die Expression von Notch2 *ex vivo* mit der Expression an Tag 3 überlagert wurde. Das Balkendiagramm zeigt die normalisierte mittlere Fluoreszenz des Expressionslevel für Notch2 von allen Analysen für den jeweiligen Genotyp mit Standardabweichung. Normalisiert wurden die Mediane auf den Mittelwert aller Mediane der unstimulierten CD19 Kontrollmäuse an Tag 0; U = unstimuliert; n = 8.

### 3.3.7 In der Milz der LMP1/CD40 Mäuse sind vermehrt B1 B-Zellen

LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse weisen weniger B1 B-Zellen im Peritoneum auf und nach RelB Inaktivierung in LMP1/CD40 Mäusen erreichen diese wieder das Kontrollniveau (Stojanovic 2013). Um die Frage zu beantworten, ob konstitutiv aktive CD40 Signale auch zu

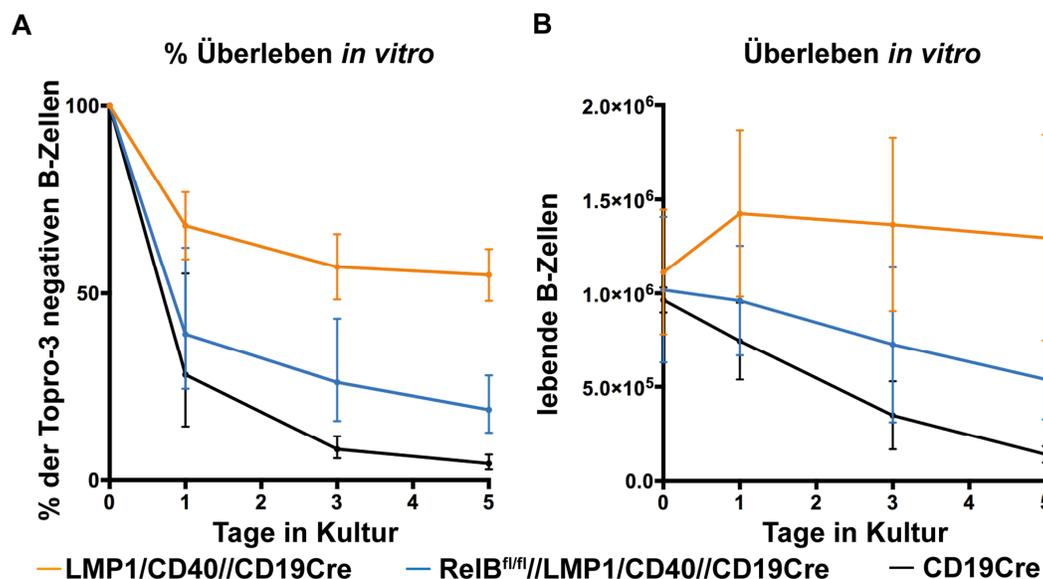
Veränderungen in der B1 B-Zellpopulation in der Milz führen, wurden Milzzellen der drei Genotypen mit Antikörpern gefärbt und mittels FACS die prozentualen Anteile von B1a ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^+\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) und B1b ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) und von B2 ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^+$ : Marginalzonen B-Zellen und folliculäre B-Zellen) B-Zellen bestimmt (Abbildung 33A). Die Daten zeigen, dass bezüglich der prozentualen Verteilung von B1a und B1b B-Zellen zu B2 B-Zellen in der Milz zwischen den drei Genotypen keine Verschiebungen vorliegen. Erst nach Berechnung der absoluten Zellzahlen ergab sich für die LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne RelB, eine signifikante Erhöhung der B1b B-Zellzahlen im Vergleich zur CD19Cre Kontrolle. Die B1a B-Zellzahlen wiesen zwar einen sichtbaren, jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Genotypen auf.



**Abbildung 33. Das konstitutiv aktive CD40 Signal in B-Zellen führt unabhängig von RelB zu signifikant erhöhten B1b Zellzahlen. A.** Milzzellen von allen drei Genotypen wurden mit  $\alpha\text{-IgM}$ ,  $\alpha\text{-CD5}$  und  $\alpha\text{-B220}$  Antikörpern gefärbt. Mittels FACS-Analyse auf lebende Lymphozyten und  $\text{IgM}^+$  B-Zellen wurden die B1a ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^+\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) und B1b ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) von B2 ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^+$ ) B-Zellen aufgetrennt Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS-Färbung für jeden Genotyp mit den Mittelwerten aller Analysen und der Standardabweichung;  $n=3$ . **B.** Nach durchflusszytometrischer Analyse konnten die prozentualen Anteile für die B1a ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^+\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) und B1b ( $\text{IgM}^{\text{hoch}}\text{CD5}^-\text{B220}^{\text{niedrig}}$ ) B-Zellen bestimmt werden. Durch Verrechnung der prozentualen Anteile mit den Gesamt-B-Zellzahlen konnten die hier dargestellten absoluten Zellzahlen für LMP1/CD40//CD19Cre (orange), RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre (blau) und CD19Cre Mäuse (schwarz) ermittelt werden. Die Balken kennzeichnen die Mittelwerte (Zahlen) aller Datenpunkte pro Genotyp; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , mit zweiseitigem t-Test berechnet;  $n = 3$ .

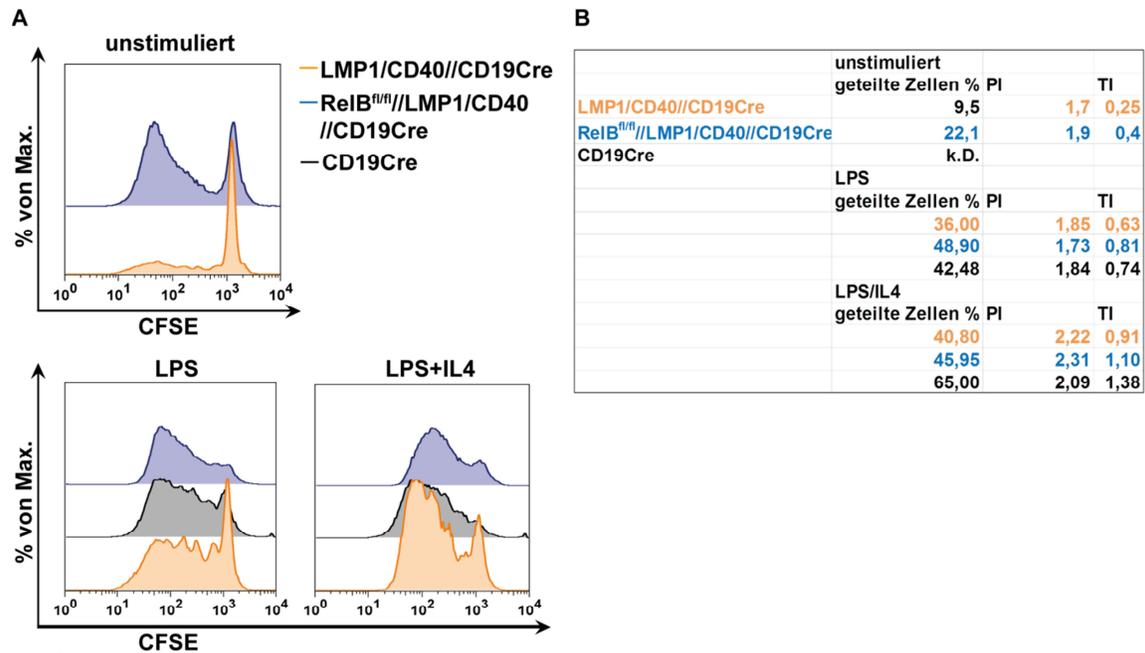
### 3.3.8 RelB spielt eine Rolle für das verbesserte Überleben der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen *in vitro*

Es konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass B-Zellen der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse ein verbessertes Überleben und Vorteile im Proliferationsverhalten gegenüber B-Zellen von CD19Cre Kontrollmäusen *in vitro* aufweisen (Hömig-Hölzel et al. 2008). Um herauszufinden, welche Rolle RelB für das verbesserte Überleben LMP1/CD40 exprimierender B-Zellen spielt, wurden B-Zellen der Milz von LMP1/CD40//CD19Cre, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen isoliert und für 5 Tage ohne Stimulation in Kultur genommen und das Überleben mittels Topro-3-Färbung im FACS und Bestimmung der Zellzahl durch Trypanblaufärbung ermittelt. Die Überlebenskurve in Abbildung 34 zeigt, dass im Laufe der *in vitro* Kultur die LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen mit RelB besser überlebten als diese ohne RelB. Des Weiteren konnte auch festgestellt werden, dass B-Zellen mit konstitutiv aktivem CD40 und Inaktivierung von RelB immer noch über ein verbessertes Überlebenspotenzial gegenüber B-Zellen der Kontrolle verfügten. RelB scheint somit für das verbesserte Überleben der LMP1/CD40 eine Rolle zu spielen.



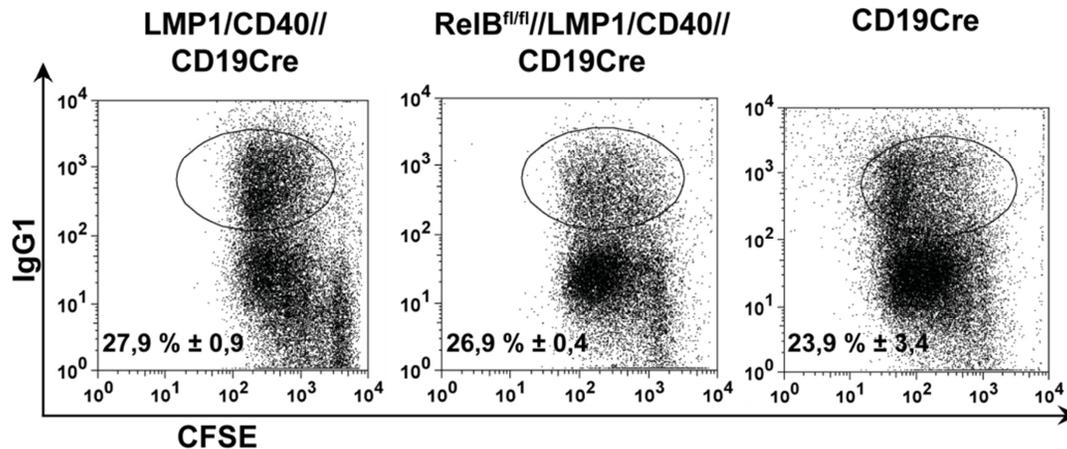
**Abbildung 34: RelB spielt eine Rolle für das verbesserte Überleben der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen *in vitro*.** B-Zellen aus der Milz von LMP1/CD40//CD19Cre, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen wurden für 5 Tage ohne Stimulation kultiviert. **A.** Die prozentualen Anteile der Topro-3 negativen Zellen (lebende Zellen) wurden mittels FACS an Tag 0 (*ex vivo*), 1, 3 und 5 detektiert. Die Werte für Tag 0 wurden auf 100% gesetzt. **B.** Für die Ermittlung der lebenden B-Zellen mittels Trypanblaufärbung (Trypanblau-negative Zellen sind die lebenden Zellen), wurden die kultivierten B-Zellen an Tag 0 (*ex vivo*), 1, 3 und 5 mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt; n = 5-6.

Um die Proliferation von B-Zellen zu analysieren, wurden B-Zellen aller drei Genotypen mit CFDA-SE (Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester) gefärbt und für 5 Tage kultiviert. CFDA-SE lagert sich in die Membran der B-Zellen ein und kann durch Abspaltung zweier Azetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen in das fluoreszierende CFSE (Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester) umgewandelt werden. Bei der Zellteilung wird das CFSE dann gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Der Teilungsindex steht für die durchschnittliche Anzahl von Zellteilungen, welche eine Zelle der Gesamtpopulation durchlaufen hat. Der Proliferationsindex errechnet sich aus der Anzahl der Teilungen dividiert durch die Anzahl der Zellen, welche sich geteilt haben. Er berücksichtigt nur die Zellen, die mindestens eine Teilung durchlaufen haben, das heisst, nur reagierende Zellen werden hier berücksichtigt. Somit ist der Proliferationsindex wohl der bedeutendere Wert, um das Proliferationsverhalten von Zellen untereinander zu vergleichen. Die Auswertung der Daten ergab, dass sich prozentual mehr unstimulierte B-Zellen der  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse, als B-Zellen der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse geteilt haben. Auch der Teilungsindex spricht dafür, dass sich LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen mit RelB im Durchschnitt weniger geteilt haben (0,25) als LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen ohne RelB (0,4). Auch beim Proliferationsindex sieht man, dass sich B-Zellen der  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse vermehrt geteilt haben. In diesem Ansatz wurde keine Kontrolle mitgeführt, da nur ca. 3% der Kontroll-B-Zellen an Tag 5 überlebten. Um zu untersuchen, ob eine exogene Stimulation einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der LMP1/CD40 B-Zellen mit und ohne RelB im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen hat, wurden B-Zellen mit LPS- oder LPS+IL4-haltigem Medium kultiviert und an Tag 5 das Proliferationsmuster analysiert. Der Proliferationsindex deutet darauf hin, dass LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen mit und ohne RelB ein vergleichbares Proliferationsverhalten nach Stimulation aufweisen. Allerdings scheinen sich die LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen mit RelB etwas schlechter im Vergleich zu RelB deletierten B-Zellen zu teilen. Die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges scheint somit einen eher hemmenden Einfluss auf die Proliferation der B-Zellen zu haben. Dies war in unstimulierten B-Zellen noch deutlicher als in stimulierten B-Zellen zu erkennen.



**Abbildung 35: Die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges hemmt teilweise die Proliferation der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen *in vitro*.** B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre, LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen wurden mit CFDA-SE gefärbt und 5 Tage ohne Stimulation oder unter LPS,  $\alpha$ -CD40+IL4 oder LPS+IL4 Stimulation kultiviert. CFDA-SE wird in der Zelle in CFSE umgewandelt und bei jeder Zellteilung geben die CFSE gefärbten Zellen den Farbstoff gleichmäßig an ihre Tochterzellen weiter. Somit kann die Abnahme der Fluoreszenz durch FACS-Analyse verfolgt werden. Das Proliferationsprofil wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis für 3-4 unabhängige Experimente. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte aller Analysen für jeden Genotyp. TI = Teilungsindex; PI = Proliferationsindex; n = 3-6.

Um zu untersuchen, ob LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen mit RelB und ohne RelB den Klassenwechsel zu IgG1 durchführen können, wurden B-Zellen von LMP1/CD40//CD19Cre, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen isoliert, mit CFDA-SE gefärbt und für 4 Tage mit LPS+IL4-haltigem Medium in Kultur gehalten. An Tag 4 wurden die kultivierten Zellen der drei Genotypen mittels FACS-Analyse auf IgG1<sup>+</sup> Zellen untersucht. Da die B-Zellen sich teilen müssen, um den Klassenwechsel durchzuführen, wurde gleichzeitig auch die CFSE Intensität überprüft. Abbildung 36 zeigt, dass obwohl sich auch hier Kontroll-B-Zellen und RelB-deletierte LMP1/CD40 B-Zellen etwas besser geteilt haben als LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen, wurde bei den drei Genotypen kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der IgG1<sup>+</sup> Zellen beobachtet.

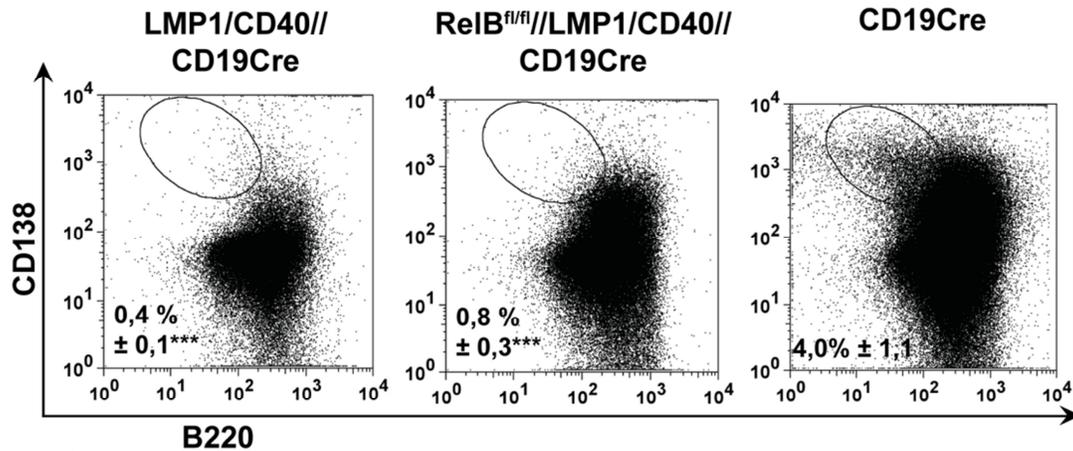


**Abbildung 36: RelB spielt keine Rolle in den LMP1/CD40 Mäusen für den Klassenwechsel zum IgG1-Isotyp *in vitro*.** B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre, LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen wurden unter LPS und IL4 Stimulation für 4 Tage *in vitro* kultiviert. Anschließend wurden die B-Zellen auf ihre IgG1 Expression auf der Oberfläche mittels FACS untersucht. Für die FACS-Analysen wurde zuerst auf Tpro-3 negative (lebende Zellen) vorgegattet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer FACS-Analyse für jeden Genotyp mit dem errechneten Mittelwert aller Analysen mit Standardabweichung; n = 4-5.

### 3.3.9 Die Expression von LMP1/CD40 in B-Zellen hemmt unabhängig von RelB die Differenzierung zu Plasmazellen *in vitro* und führt zu erniedrigten Antikörpertiter im Blut

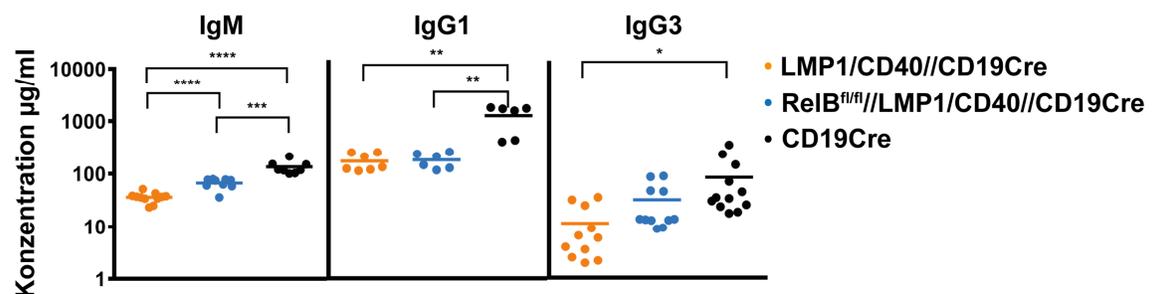
Es ist beschrieben, dass CD40 Signale die Plasmazelldifferenzierung inhibieren (Satpathy et al. 2010). Um zu untersuchen, ob konstitutive CD40 Signale in B-Zellen die Plasmazelldifferenzierung *in vitro* inhibieren kann und welche Auswirkungen die Inaktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges auf diesen Phänotyp hat, wurden B-Zellen von RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre, LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen für 4 Tage mit LPS-haltigem Medium kultiviert und anschließend mittels FACS-Analyse die Anteile der CD138<sup>+</sup>B220<sup>niedrig</sup> Plasmablasten bestimmt (Abbildung 37). LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen sind *in vitro* nicht in der Lage nach 4 Tagen zu Plasmablasten zu differenzieren. Auch die Inaktivierung von RelB kann diesen inhibierenden Effekt von LMP1/CD40 nicht aufheben. Die Plasmazellbildung wurde im gleichen Experiment auch an den Tagen 1, 2 und 3 untersucht, um auszuschließen, dass LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen schneller zu Plasmablasten differenzieren und diese an Tag 4 schon wieder zurückgehen. Jedoch konnten auch an diesen Tagen keine Plasmablasten detektiert werden (nicht gezeigte Daten). Zusätzlich konnten wir mittels intrazellulären FACS-Analysen zeigen, dass LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen zwar IRF4 hochregulieren können, jedoch scheinen sie in der Blimp-1 Hochregulation inhibiert zu sein (nicht gezeigte Daten). Dieses Experiment deutete darauf hin, dass LPM1/CD40 die Plasmablastendifferenzierung *in vitro* inhibiert, die

verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges aber nicht für diesen Phänotyp verantwortlich zu sein scheint.



**Abbildung 37: Das konstitutiv aktive CD40 Signal in LMP1/CD40 Mäusen inhibiert unabhängig von RelB die Plasmazelldifferenzierung *in vitro*.** B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre, LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen wurden mit LPS Stimulation für 4 Tage *in vitro* kultiviert. Anschließend wurden die B-Zellen mit  $\alpha$ -B220 und  $\alpha$ -CD138 gefärbt und mittels FACS analysiert um die Differenzierung zu Plasmablasten (CD138<sup>+</sup>B220<sup>niedrig</sup>) zu untersuchen. Für die FACS-Analyse wurde auf Topro-3 negative (lebende Zellen) gegatet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer FACS-Analyse für jeden Genotyp mit dem errechneten Mittelwert aller Analysen mit Standardabweichung. \*\*\*p<0,001; mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 4-5.

Um zu analysieren, ob der Plasmablastendifferenzierungsdefekt, der *in vitro* in LMP1/CD40 Mäusen festgestellt wurde, einen Effekt auf die basalen Antikörpertiter im Blut hat, wurden mittels ELISA die Konzentrationen der Immunglobulin-Isotypen IgM, IgG1 und IgG3 bestimmt.



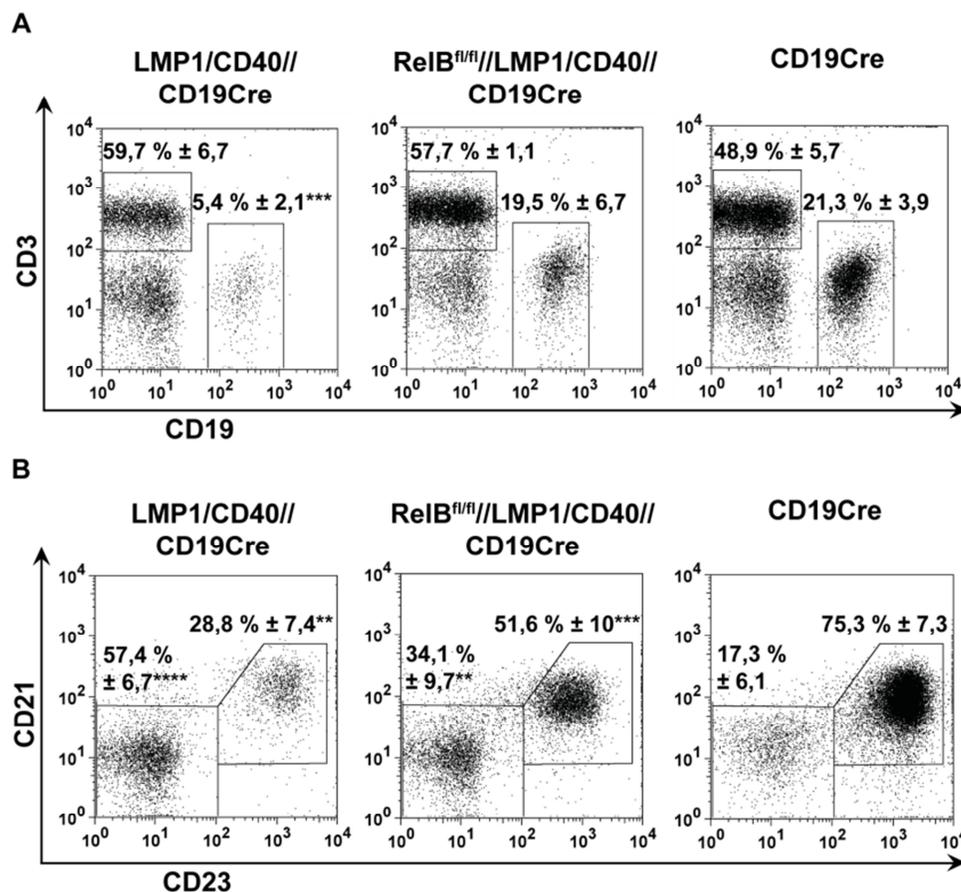
**Abbildung 38: Erniedrigte Titer verschiedener Immunglobulin-Isotypen im Serum von LMP1/CD40 Mäusen.** Dargestellt sind die Konzentrationen ( $\mu$ g/ml) der Immunglobuline IgM, IgG1 und IgG3 im Serum von LMP1/CD40 Mäusen und CD19Cre Mäusen. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte mittels ELISA. Analysiert wurden 4-6 Mäuse pro Genotyp. Die Balken kennzeichnen die Mittelwerte (Zahl). \*p<0,05; \*\*\*p< 0,001; \*\*\*\* p< 0,0001, mit zweiseitigem t-Test berechnet.

Wie erwartet, waren im Serum der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse unabhängig von RelB im Vergleich zu Kontrollmäusen deutlich weniger IgM Antikörper und klassengewechselte IgG1 und IgG3 Antikörper vorhanden. Durch die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 Mäusen

konnte im Vergleich zu LMP1/CD40 Mäusen die Anzahl der IgM und IgG3 Antikörpertiter im Blut zwar etwas angehoben werden, jedoch nicht auf Kontrollniveau.

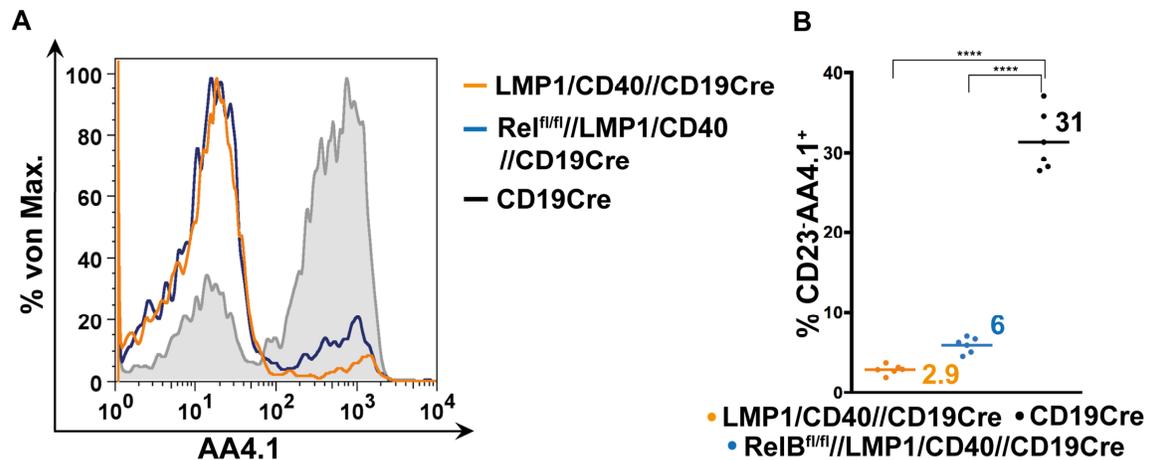
### 3.3.10 Der hyperaktive nicht-kanonische Signalweg führt zu einer prozentualen Reduktion von B-Zellen im Blut

Um zu analysieren, ob in LMP1/CD40 Mäusen die B-Zellexpansion nur in den sekundären lymphoiden Organen auftritt oder auch im Blut detektierbar ist und welche Rolle der hyperaktive NF- $\kappa$ B Signalweg dabei spielt, wurden bei  $RelB^{fl/fl}$ /LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen die prozentualen Anteile von B- ( $CD19^+$ ) und T-Zellen ( $CD3^+$ ) im Blut mittels FACS bestimmt.



**Abbildung 39: Nach Inaktivierung von  $RelB$  in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen zirkulieren wieder vermehrt B-Zellen im Blut.** **A.** Blutzellen von LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen,  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen wurden mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD19 Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Für die FACS-Analyse wurde zuerst auf Topro-3 negative (lebende Zellen) vorgegattet. Dargestellt ist die Verteilung von B-Zellen ( $CD19^+$ ) zu T-Zellen ( $CD3^+$ ) im Blut für jeden Genotyp. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit den Mittelwerten der prozentualen Anteile von mindestens 5 Mäusen pro Genotyp. **B.** Blutzellen von LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen (links),  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen (mittig) und CD19Cre Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD21 und  $\alpha$ -CD23 Antikörpern gefärbt und mittels FACS die Verteilung von zirkulierenden folliculären B-Zellen ( $CD21^+CD23^+$ ) zu transitionalen und B1 B-Zellen ( $CD21^{niedrig}CD23^-$ ) detektiert. Für die FACS-Analysen wurde auf lebende Lymphozyten und B220<sup>+</sup> B-Zellen vorgegattet. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel für eine FACS-Analyse mit den Mittelwerten aller Analysen und der Standardabweichung für jeden Genotyp; n = 3-4. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001; mit zweiseitigem t-Test berechnet.

Außerdem wurde untersucht, ob es Unterschiede in der prozentualen Verteilung der zirkulierenden B-Zellpopulationen im Blut gibt. Wie unter Punkt 3.1.8 erwähnt, zirkulieren vorwiegend folliculäre B-Zellen ( $CD21^+CD23^+$ ) und nur zu einem geringeren Prozentsatz transitionale im T1 Stadium und B1 B-Zellen ( $CD21^{niedrig}CD23^-$ ) im Blut. In LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen war die Anzahl der zirkulierenden B-Zellen im Blut im Vergleich zu Kontrollmäusen stark vermindert. Nach Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen wurde der Anteil an zirkulierenden B-Zellen im Blut wieder nahezu auf Kontrollniveau angehoben. Des Weiteren wurde festgestellt, dass in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen der prozentuale Anteil an zirkulierenden folliculären B-Zellen (28,8 %) im Vergleich zur Kontrolle (75,3 %) signifikant reduziert war. Dieser Effekt war in den RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen mit 56,6 % im Vergleich zu CD19Cre Mäusen auch erkennbar, jedoch weniger ausgeprägt als in den LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. Der prozentuale Anteil für die  $CD21^{niedrig}CD23^-$  B-Zellpopulation (transitionale T1 und B1 B-Zellen) war in den LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen signifikant im Vergleich zu Kontrollmäusen erhöht. In RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen war der prozentuale Anteil dieser Population im Vergleich zu Kontrollmäusen immer noch verstärkt, doch deutlich reduziert im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der hyperaktive nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg in B-Zellen der LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen zu einem erniedrigten prozentualen Anteil von B-Zellen im Blut führt. Hierbei sind vor allem die zirkulierenden folliculären B-Zellen reduziert. Des Weiteren führt er zu einem erhöhten prozentualen Anteil an B1 oder/ und transitionalen T1 B-Zellen im Blut. Um die Frage zu klären, ob die  $CD21^{niedrig}CD23^-$  B-Zellpopulation im Blut der LMP1/CD40 Mäusen vermehrt B1 oder transitionale T1 B-Zellen beinhaltet, wurde diese auf die Expression von AA4.1<sup>+</sup> untersucht. Die Färbung der zirkulierenden B-Zellen im Blut führte zu dem Ergebnis, dass LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne RelB im Vergleich zu CD19Cre Mäusen prozentual weniger AA4.1<sup>+</sup> B-Zellen aufweisen. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass in LMP1/CD40 Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen im Blut vermehrt B1 B-Zellen zirkulieren.



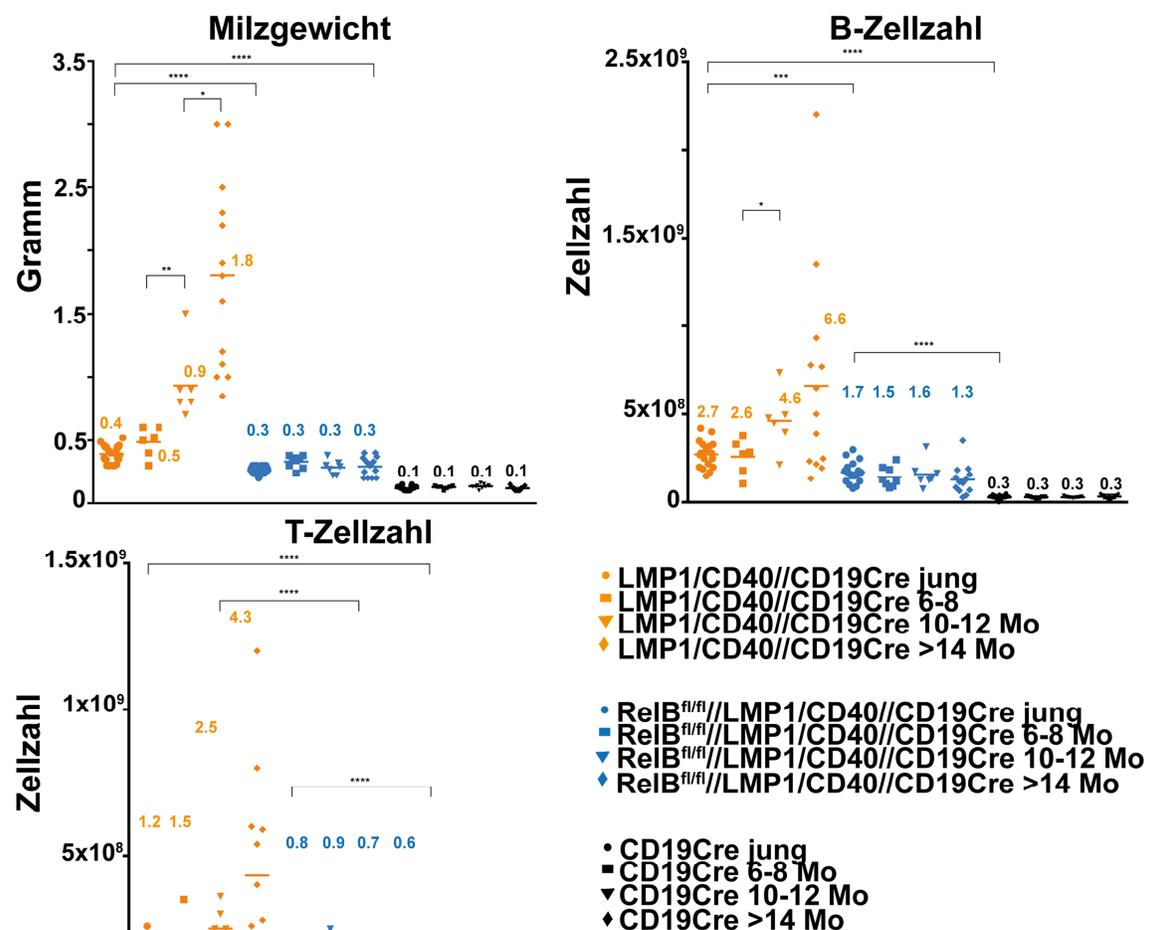
**Abbildung 40: Im Blut der LMP1/CD40 Mäuse zirkulieren prozentual weniger transitionale T1 und vermehrt B1 B-Zellen.** **A.** Blutzellen von LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen (orange), RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen (blau) und CD19Cre Mäusen (schwarz) wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -AA4.1 und  $\alpha$ -CD23 Antikörpern gefärbt und mittels FACS die Anzahl von zirkulierenden transitionalen T1 B-Zellen (CD23<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>) detektiert. Für die FACS-Analysen wurde auf lebende Lymphozyten, B220<sup>+</sup> und CD23<sup>-</sup> B-Zellen vorgegattet. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm für eine Expression von AA4.1; n = 6. **B.** Gezeigt ist die prozentuale Verteilung der transitionalen B-Zellen (B220<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>) in der Milz von LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen (orange), RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen (blau) und CD19Cre (schwarz) Mäusen. Der orange, blaue und schwarze Balken kennzeichnet den Mittelwert (Zahl in Prozent) aller Analysen für jeden Genotyp. \*\*\*\*p<0,0001, mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 6.

### 3.4 Die Bedeutung von RelB und konstitutiv aktiven CD40 Signalen für die Entstehung von B-Zelltumoren in der Milz

Unsere Daten zeigten, dass das konstitutive CD40 Signal in B-Zellen mit und ohne RelB zu einer Splenomegalie und B-Zellexpansion in jungen Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen führt, wobei dieser Phänotyp nach Inaktivierung von RelB weniger stark ausgeprägt ist. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass in den jungen LMP1/CD40 Mäusen bestimmte B-Zellpopulationen wie Marginalzonen B-Zellen und B1 B-Zellen in der Milz expandiert sind und RelB dabei nur bedingt eine Rolle spielt. Es ist bekannt, dass gealterte LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse ab einem Alter von > 12 Monaten teilweise eine weitere enorme Splenomegalie und B- und T-Zellexpansion aufweisen (Hömig-Hölzel et al. 2008), die wahrscheinlich durch die Entstehung von B-Zelllymphomen auftritt. Um die Frage zu klären, welchen Einfluss der hyperaktive nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg auf diesen Phänotyp hat, wurden die Milzgewichte, Milzzellzahlen und der B-Zellphänotyp von RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre, LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Kontrollmäusen zu bestimmten Zeitpunkten in einem Zeitraum von jungen Mäusen (< 4 Monate) bis > 14 Monate analysiert.

### 3.4.1 Der hyperaktive nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg spielt eine Rolle für die weitere Zunahme des Milzgewichtes und der B- und T-Zellzahlen in der Milz der LMP1/CD40 Mäuse über die Zeit

Um die Veränderung des Milzgewichtes und der B- und T-Zellzahlen in der Milz über die Zeit von allen drei Genotypen zu analysieren, wurden die Milzgewichte und Zellzahlen von 6-8 Monaten alten Mäusen, 10-12 Monate alten Mäusen und Mäusen, die älter als 14 Monate waren, bestimmt. Um die möglichen Veränderungen über die Zeit genau vergleichen zu können, wurden die Daten von jungen Mäusen (< 4 Monaten) der drei Genotypen nochmals in die Grafik mit aufgenommen.



**Abbildung 41.** Das konstitutiv aktive CD40 Signal in LMP1/CD40 Mäusen führt abhängig von RelB zu einer Zunahme des Milzgewichtes und der B- und T-Zellzahlen über die Zeit. Darstellung der Milzgewichte und B- und T-Zellzahlen in der Milz von jungen (< 4 Monate) Mäusen, 6-8 Monate alten Mäusen, 10-12 Monate alten Mäusen und Mäusen mit einem Alter von > 14 Monaten für LMP1/CD40//CD19Cre (orange), RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre (blau) und für CD19Cre (schwarz). Zahlen stellen den Mittelwert für alle Analysen für den jeweiligen Genotyp dar. Mo = Monate; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001; mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 6-25.

Das Milzgewicht und die B- und T-Zellzahlen in der Milz der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse nahm zwischen 10-12 Monate und > 14 Monate im Vergleich zu jungen Mäusen deutlich zu. Dieser Phänotyp war bei  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen nicht erkennbar. Hier blieben das Milzgewicht und die B- und T-Zellzahlen in der Milz über die Zeit unverändert bestehen. Es ist anzunehmen, dass der hyperaktive nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg in B-Zellen für die weitere Zunahme der B- und T-Zellzahlen in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen eine entscheidende Rolle spielt. Interessant ist zu sehen, dass es nicht bei allen gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse > 14 Monaten zur B- und/oder T-Zellexpansion kam, jedoch nahm bei allen das Milzgewicht deutlich zu. Um zu analysieren, ob es im Verlauf der Zeit zu einer Veränderung im Verhältnis von B-Zellen zu T-Zellen in der Milz gibt, wurden die prozentualen Anteile der CD3<sup>+</sup> Zellen (T-Zellen) und CD19<sup>+</sup> Zellen (B-Zellen) mittels FACS für alle drei Genotypen bestimmt. Für die jungen Mäuse (< 4 Monate) deutete sich folgender Faktor für durchschnittliche Verhältnis von B zu T-Zellen ab: LMP1/CD40//CD19Cre: 2,3;  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre: 2,1 und CD19Cre: 1,1. Im Alter von 6-8 Monaten traten bei allen Genotypen noch keine erkennbaren Veränderungen im B/T-Zellverhältnis auf. Die Ergebnisse für 10-12 und der > 14 Monate alten Mäuse ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der B- und T-Zellanteile in der Milz der 10-12 Monate alten LMP1/CD40//CD19Cre,  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäuse.**

Alter	10 - 12 Monate						
Genotyp	LMP1/CD40//CD19Cre						
Mausnummer	#13	#14	#44	#48	#100		
Milzgewicht	0,8	0,7	0,8	0,9	0,9		
B-Zellzahl	4,78E+08	4,44E+08	4,95E+08	7,36E+08	2,14E+08		
T-Zellzahl	1,82E+08	2,82E+08	3,08E+08	3,65E+08	1,50E+08		
% B-Zellen	67,3	56	55	61,3	51		
% T-Zellen	25,7	35,2	34,2	30,4	35,6		
Verhältnis B/T	2,6	1,6	1,6	2,0	1,4		
Genotyp	$RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre						
Mausnummer	#879	#883	#920	#931	#977	#981	#138
Milzgewicht	0,22	0,27	0,38	0,22	0,32	0,29	0,3
B-Zellzahl	1,3E+08	1,7E+08	3,2E+08	1,27E+08	1,25E+08	1,77E+08	7,50E+07
T-Zellzahl	7,06E+07	1,1E+08	1,4E+08	5,34E+07	5,48E+07	8,53E+07	5,85E+07
% B-Zellen	60,3	55	63,2	63,5	62,4	61	50
% T-Zellen	32,1	38	27,4	26,7	27,4	29,4	39
Verhältnis B/T	1,9	1,4	2,3	2,4	2,3	2,1	1,3
Genotyp	CD19Cre						
Mausnummer	#3	#16	#96				
Milzgewicht	0,14	0,15	0,14				
B-Zellzahl	3,03E+07	3,18E+07	2,87E+07				
T-Zellzahl	2,54E+07	3,14E+07	2,87E+07				
% B-Zellen	48,9	42,4	42,8				
% T-Zellen	40,9	41,8	42,8				
Verhältnis B/T	1,2	1,0	1,0				

Bei den 10-12 Monate alten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen sind leichte Verschiebungen der prozentualen Anteile von B- zu T-Zellen zu erkennen, teilweise nehmen sogar die T-Zellen stärker prozentual zu (#14, #44 und #100). In einigen  $RelB^{fl/fl}$ //LMP1/CD40//CD19Cre

Mäusen ist dies auch zu sehen (#883 und #138). Zu diesem Zeitpunkt nehmen auch die absoluten B- und T-Zellzahlen bei LMP1/CD40 Mäusen mit RelB im Gegensatz zu RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und Kontrollmäusen deutlich zu. Die 10-12 Monate alten Kontrollmäuse sind bezüglich der prozentualen Verteilung von B- und T-Zellen vergleichbar mit jungen Mäusen.

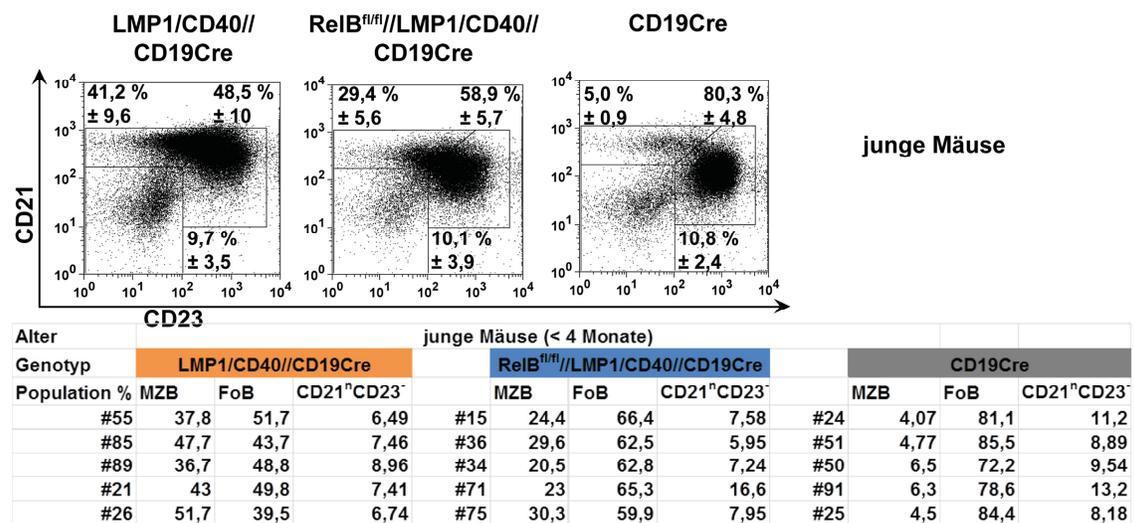
**Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der B- und T-Zellanteile in der Milz der > 14 Monate alten LMP1/CD40//CD19Cre, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäuse.**

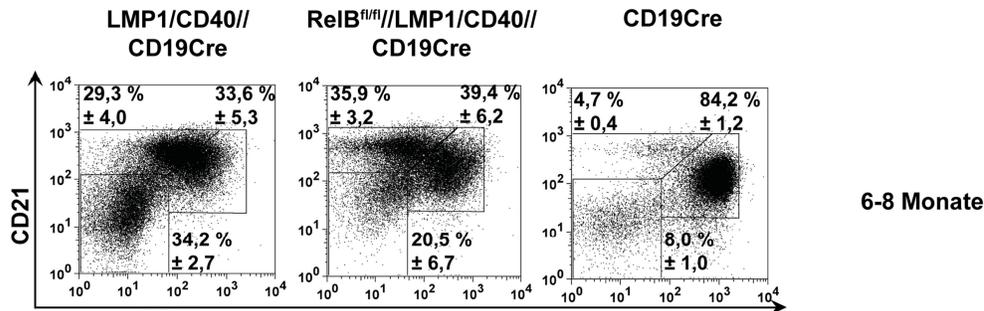
Alter	> 14 Monate							
Genotyp	LMP1/CD40//CD19Cre							
Mausnummer	#20	#29	#25	#34	#46	#52	#54	#67
Milzgewicht	1,9	1	2,5	1,6	1,1	1	3	2,3
B-Zellzahl	7,7E+08	5E+08	6,5E+08	2,2E+08	2,5E+08	1,3E+08	2E+08	2,2E+09
T-Zellzahl	5,7E+08	3,9E+08	2,1E+08	2,9E+08	1,8E+08	2,8E+08	1,3E+09	2,4E+08
% B-Zellen	51,3	50	65	36,4	49,7	25,8	12,2	81,5
% T-Zellen	38,6	39,5	20,7	47,8	36,8	52,9	80,5	8,89
Verhältnis B/T	1,3	1,3	3,1	0,8	1,4	0,5	0,2	9,2
Genotyp	RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre							
Mausnummer	#865	#909	#921	#917	#927	#933	#949	
Milzgewicht	0,3	0,4	0,3	0,25	0,4	0,3	0,4	
B-Zellzahl	1,1E+08	3,5E+08	1,4E+08	1,9E+08	1,3E+08	1,6E+08	1,8E+08	
T-Zellzahl	7,40E+07	1,92E+08	4,74E+07	1,20E+08	8,11E+07	5,95E+07	7,36E+07	
% B-Zellen	54,7	58,6	70,8	54,7	50,3	66,2	40,1	
% T-Zellen	37	32	23,7	34,4	31,2	24,8	16	
Verhältnis B/T	1,5	1,8	3,0	1,6	1,6	2,7	2,5	
Genotyp	CD19Cre							
Mausnummer	#20	#21	#70					
Milzgewicht	0,13	0,15	0,12					
B-Zellzahl	3,05E+07	4,82E+07	4,01E+07					
T-Zellzahl	2,01E+07	3,06E+07	2,56E+07					
% B-Zellen	52,6	51,8	50,8					
% T-Zellen	34,7	34,4	32,4					
Verhältnis B/T	1,51	1,58	1,6					

Bei den LMP1/CD40 Mäusen mit RelB in einem Alter über 14 Monate, trat eine hohe Varianz im B/T-Zell-Verhältnis in der Milz auf. Es gab einige, die vergleichbar mit den 10-12 Monate alten Mäusen waren, wohingegen sich bei anderen Mäusen entweder die B- oder die T-Zellanteile in eine Richtung verschoben haben. Eine LMP1/CD40 Maus (#54) hatte ca. 80 % T-Zellen in der Milz und die B-Zellzahlen waren vergleichbar mit jungen LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. Diese Maus wies somit eine extreme T-Zellexpansion auf. Betrachtet man eine LMP1/CD40 Maus (#67), so wies diese mit ca. 82 % B-Zellen in der Milz eine extreme B-Zellexpansion auf. Die T-Zellzahlen dieser Maus waren vergleichbar mit jungen LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. Nach Inaktivierung von RelB kam es auch teilweise zu Verschiebungen in den prozentualen Anteilen der B- und T-Zellen, jedoch war die extrem starke B- und/oder T-Zellexpansion, die in vielen LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen zu beobachten war, in keiner der analysierten Mäuse zu erkennen.

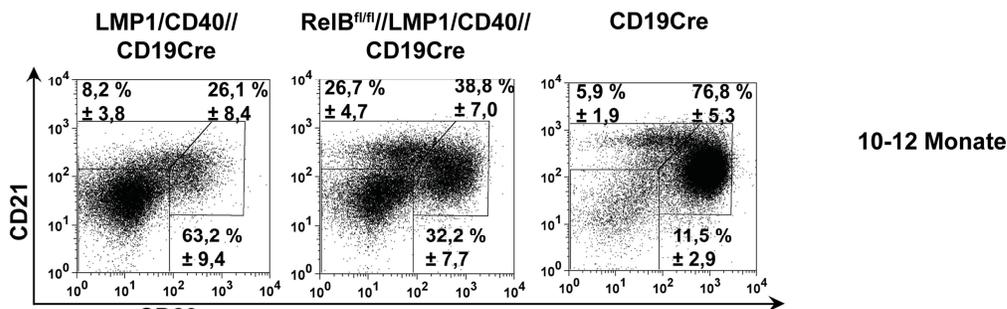
### 3.4.2 In LMP1/CD40 Mäusen ohne RelB entwickelt sich die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz verzögert

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass in gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen eine CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz dominiert, die sich phänotypisch von den Haupt-B-Zellpopulation in jungen Mäusen unterscheidet (Hömig-Hölzel et al. 2008). Um herauszufinden, wie und mit welcher Geschwindigkeit sich diese aberrante Population in der Milz entwickelt und welche Rolle RelB für die Entstehung und den Phänotyp dieser aberranten Population spielt, wurden Milzzellen von jungen Mäusen, 6-8 Monaten alten Mäusen, 10-12 Monate alten und Mäusen die älter als 14 Monate waren, mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt und im FACS analysiert. Für jede Analyse wurden Kontrollmäuse im gleichen Alter mit untersucht.

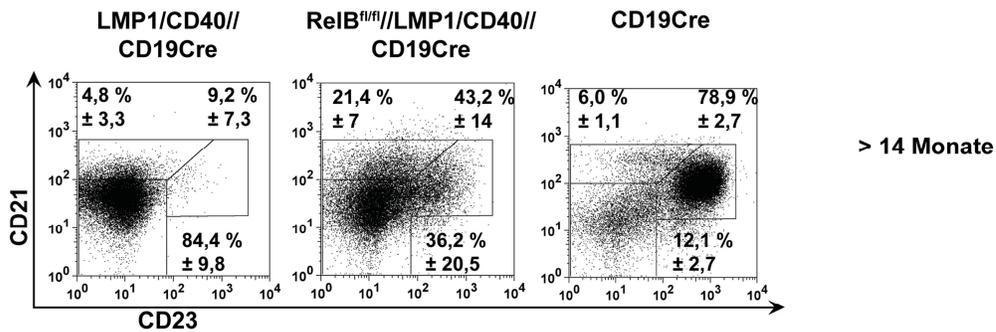




Alter	6-8 Monate alte Mäuse										
	LMP1/CD40//CD19Cre			RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre			CD19Cre				
Genotyp	MZB	FoB	aberrant	MZB	FoB	aberrant	MZB	FoB	FoB	CD21 <sup>n</sup> CD23 <sup>-</sup>	
#103	31,5	34,6	31	#990	39,8	38,7	18,1	#105	4,44	82,4	7,6
#110	32,5	28,8	38,6	#986	37,5	31,6	30,7	#104	5,1	84,2	9,94
#151	31,1	29	33,5	#1060	34	31	27,3	#144	5,39	83,4	7,39
#5854	22,4	42	33,6	#96	29,6	44,1	20,9	#5857	4,06	85,5	7,35
				#97	37,2	47,7	11,2	#39	4,5	85,7	7,28
				#99	37,3	43,2	14,9				



Alter	10-12 Monate alte Mäuse										
	LMP1/CD40//CD19Cre			RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre			CD19Cre				
Genotyp	MZB	FoB	aberrant	MZB	FoB	aberrant	MZB	FoB	FoB	CD21 <sup>n</sup> CD23 <sup>-</sup>	
#13	10,4	19,6	66	#879	28,2	36,2	30,3	#3	4,95	77,9	9,65
#14	14,3	33	49,7	#883	27,9	52	19,6	#7	6	82,9	9,7
#44	3,5	27,3	66,1	#920	30,6	35	30,6	#16	5,1	67,5	13,9
#48	4,91	36,9	56,7	#931	29,6	31,4	38,4	#3837	4,06	74,8	16,1
#100	7,97	14,1	77,5	#981	17,4	39,7	42,1	#97	9,66	80,9	8,32
				#138	28,3	39,2	27,2				



Alter	> 14 Monate alte Mäuse										
	LMP1/CD40//CD19Cre			RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre			CD19Cre				
Genotyp	MZB	FoB	aberrant	MZB	FoB	aberrant	MZB	FoB	FoB	CD21 <sup>n</sup> CD23 <sup>-</sup>	
#20	2,48	3,61	93	#865	20,2	48,7	32,7	#58	5,42	81,7	10,1
#29	13	26,3	60,7	#909	21,4	57,2	21,2	#19	4	82,3	12,6
#34	3,45	8,22	88	#921	29,4	57,9	10,5	#20	7	78,1	12,7
#25	3,44	10,8	83,8	#917	22,9	38,1	48,4	#21	7,2	78,1	11,7
#46	3,56	11,5	81,7	#927	32,1	52,1	15,1	#85	7,12	77,8	10,9
#52	3,68	9,05	84,2	#933	12,1	32,4	57,2	#83	5,35	73,6	18,3
#54	2,59	4,13	92,9	#949	12,3	16,1	68,2	#70	6,46	80,8	9,06
#67	6,71	0,7	91,5								

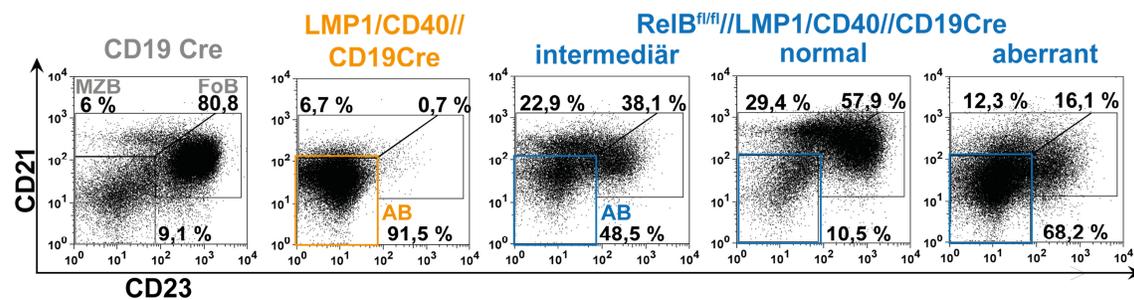
**(Bildunterschrift vorige Seite) Abbildung 42. Die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>/CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation entwickelt sich in den Milzen der RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen verzögert.**

Milzzellen von LMP1/CD40//CD19Cre, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und von CD19Cre Mäusen wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD21 und  $\alpha$ -CD23 Antikörpern gefärbt um die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation im Verlauf mittels FACS zu untersuchen. Dazu wurden die Milzzellen der drei Genotypen zu den Zeitpunkten 4, 6-8, 10-12 und > 14 Monate analysiert. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative FACS-Analyse für jeden Genotyp mit dem Mittelwert aller Analysen und Standardabweichung. Darunter befindet sich jeweils eine Tabelle, welche alle analysierten Mäuse der drei Genotypen pro Zeitraum zeigt; farblich markierte Prozentangaben bedeutet Vorhandensein der aberranten Population in der jeweiligen analysierten Maus (Prozentanteil der aberranten Population liegt über dem ermittelten Mittelwert); CD21<sup>n</sup> = CD21<sup>niedrig</sup>; n = 4 - 8.

Die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation nahm in der Milz der LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen in dem Zeitraum zwischen 6-8 Monaten bis über 14 Monaten in allen analysierten Mäusen konstant prozentual zu. Die aberrante B-Zellpopulation nahm auch nach Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen den CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> Phänotyp an, jedoch gab es zwei deutliche Unterschiede: i) so war ein Auftreten nicht immer in allen analysierten Mäusen zu beobachten und ii) der durchschnittliche prozentuale Anteil der aberranten Population in der Milz der gealterten Mäusen (> 14 Monate) war mit ~40 % weniger prominent vertreten als bei den LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen mit ~85 %. Zusätzlich war in beiden transgenen Mäusen zu beobachten, dass folliculäre (CD21<sup>hoch</sup>CD23<sup>+</sup>) und Marginalzonen B-Zellen (CD21<sup>hoch</sup>CD23<sup>niedrig</sup>) proportional zur Zunahme der aberranten Population, prozentual verringert im FACS detektierbar waren. In den Kontrollmäusen konnte keine aberrante Population in der Milz beobachtet werden, so zeigten gealterte Kontrollmäuse einen B-Zellphänotyp der vergleichbar mit dem FACS Profil der jungen Mäuse war. Des Weiteren konnte bei den gealterten, über 14 Monate alten LMP1/CD40 Mäusen mit RelB festgestellt werden, dass das Auftreten der aberranten B-Zellpopulation in der Milz nicht immer auch mit einer weiteren, zusätzlichen B-Zellexpansion korreliert, oftmals blieben die B-Zellzahlen vergleichbar mit jüngeren LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. So war auch in einer gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Maus mit 80 % T-Zellen und keiner weiteren B-Zellexpansion im Vergleich zu jüngeren Mäusen, der Phänotyp der aberranten B-Zellpopulation in der Milz erkennbar. In RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen war in keiner der analysierten Mäuse eine zusätzliche B-Zellexpansion zu verzeichnen. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass das konstitutive CD40 Signal in B-Zellen in gealterten Mäusen zu dem CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> Phänotyp der B-Zellen in der Milz beiträgt, jedoch nicht gleichzeitig mit einer starken, zusätzlichen B-Zellexpansion einhergehen muss. Nach Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen tritt die aberrante Population mit einer geringeren Inzidenz auf, was die Annahme zulässt, dass die Inaktivierung von RelB zu einer verlangsamten Entwicklung der aberranten Population in der Milz über die Zeit führt. Im nächsten Schritt sollte die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation der Milz, näher charakterisiert werden.

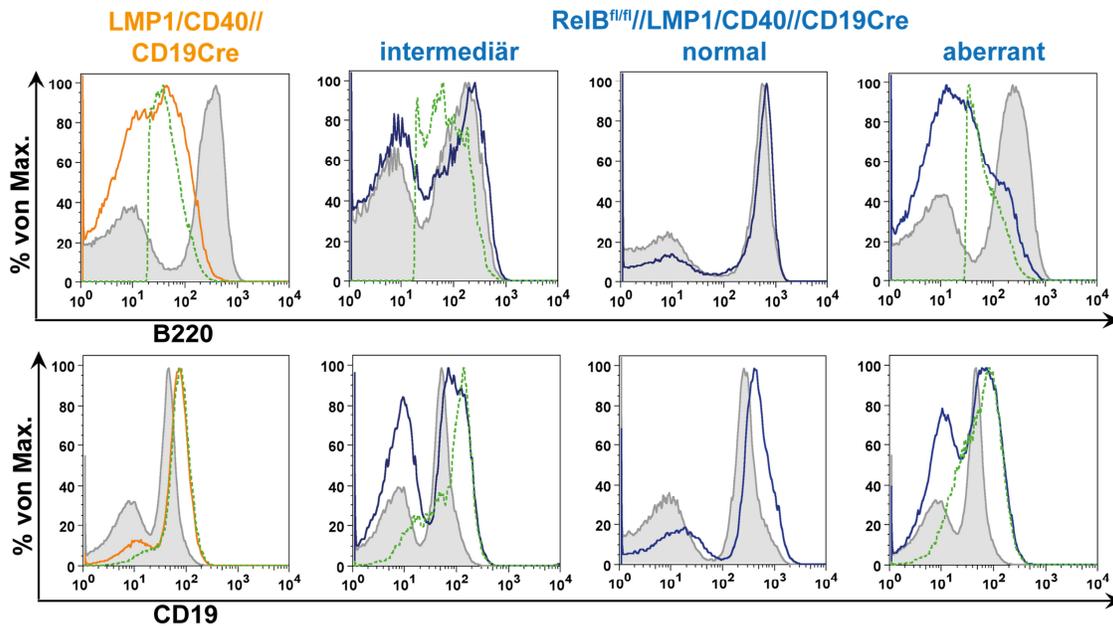
### 3.4.3 Weitere Charakteristika der aberranten CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz der gealterten LMP1/CD40 Mäuse weist weitere Charakteristika auf

Um die CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> aberrante B-Zellpopulation aus der Milz der gealterten (> 14 Monate alten) LMP1/CD40 Mäuse näher charakterisieren zu können, wurden Milzzellen mit Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Da keine besonderen Auffälligkeiten in Kontrollmäusen festgestellt werden konnte, wurde eine Kontrollmaus als repräsentatives Ergebnis gewählt (#70). Der beobachtete Phänotyp der CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> Population der gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse war überwiegend vergleichbar, wodurch hier eine Maus als charakteristisches Beispiel diente (#67). Der Phänotyp in den gealterten RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen erwies sich als heterogener im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und wurde in 3 Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1 = aberrante Gruppe: gleicht den gealterten LMP1/CD40/CD19Cre Mäusen, Gruppe 2 = normale Gruppe: ähnelt phänotypisch den jungen RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und Gruppe 3 = intermediäre Gruppe: beschreibt einen intermediären Phänotyp zwischen jungen RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und gealterten LMP1/CD40/CD19Cre Mäusen. Für die nähere Beschreibung der aberranten Population in der Milz der RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse wurde jeweils ein Beispiel aus jeder Gruppe ausgesucht (Gruppe 1: #949, Gruppe 2: #921 und Gruppe 3: #917).



**Abbildung 43: Das Auftreten der CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz der gealterten RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen ist heterogener.** Milzzellen der gealterten LMP1/CD40//CD19Cre, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäuse wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD21 und  $\alpha$ -CD23 Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Für die dargestellte FACS-Analyse wurde auf lebende Lymphozyten und B220<sup>+</sup> B-Zellen vorgegattet. Die farblich markierten Rechtecke kennzeichnen die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation der Milz der LMP1/CD40 Mäuse. AB = aberrante Population; MZB = Marginalzonen B-Zellen; FoB = folliculäre B-Zellen.

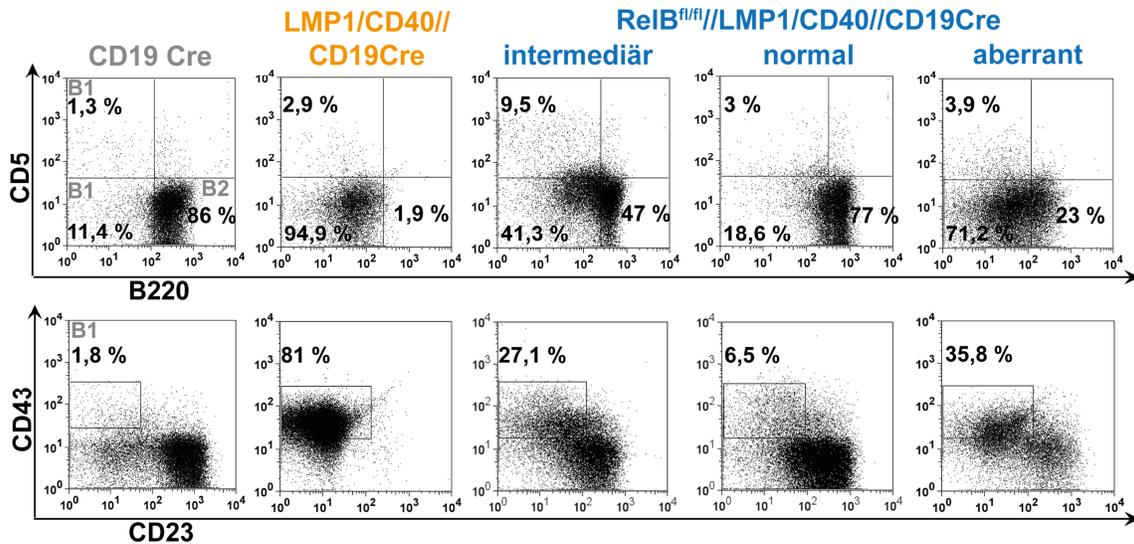
Zur näheren Charakterisierung der aberranten Population (farblich markiert in Abbildung 43) wurde zuerst die B220 und CD19 Expression auf der Oberfläche mittels FACS untersucht.



**Abbildung 44:** Die  $CD21^{\text{niedrig}}CD23^-$  B-Zellpopulation in der Milz ist  $B220^{\text{niedrig}}$  und  $CD19^{\text{hoch}}$ . Milzzellen von gealterten LMP1/CD40//CD19Cre (orange, #67),  $RelB^{\text{fl/fl}}$ /LMP1/CD40//CD19Cre (blau, #917, #921 und #949) und von CD19Cre Mäusen (grau) wurden mit  $\alpha$ -B220 und  $\alpha$ -CD19 Antikörpern gefärbt, um die aberrante Population bezüglich dieser Oberflächenmarker näher beschreiben zu können. Für die FACS Analyse wurde auf lebende Lymphozyten vorgegattet. Expression von B220 (obere Reihe) und CD19 (untere Reihe) der  $RelB^{\text{fl/fl}}$ /LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse und LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse im Vergleich mit CD19Cre Kontrollmäusen als Überlagerung im Histogramm dargestellt. Die gestrichelte Linie (grün) kennzeichnet spezifisch die aberrante Population bezüglich ihrer B220 und CD19 Expression für den jeweiligen Genotyp.

Die aberrante Population der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse, spezifisch gekennzeichnet durch die grüne gestrichelte Linie in Abbildung 44, wies eine Reduktion der B220 und gleichzeitig eine Erhöhung der CD19 Expression auf der Oberfläche, im Vergleich zu Lymphozyten der Kontrollmäuse, auf. In der aberranten Gruppe der  $RelB^{\text{fl/fl}}$ /LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse konnte beobachtet werden, dass auch hier, wie bei den gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen, die aberrante  $CD21^{\text{niedrig}}CD23^-$  Population eine reduzierte B220 Expression und eine etwas höhere CD19 Expression im Vergleich zu B-Zellen der Kontrolle aufweist. Anhand dieser Ergebnisse konnte die aberrante  $CD21^{\text{niedrig}}CD23^-$  B-Zellpopulation der Milz als  $B220^{\text{niedrig}}$  und  $CD19^{\text{hoch}}$  charakterisiert werden.

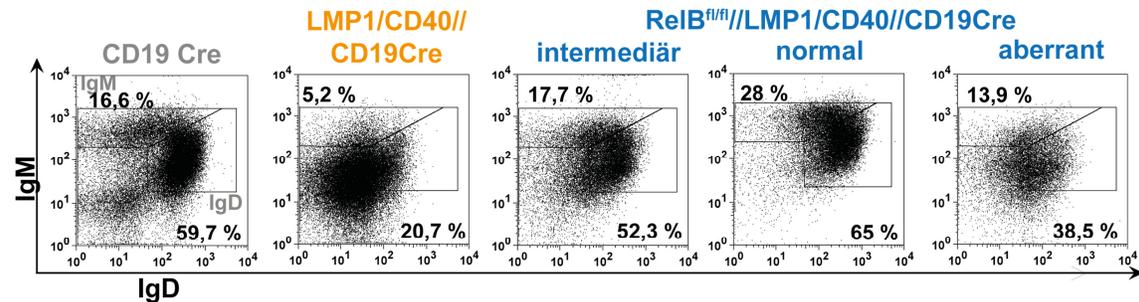
B1 B-Zellen in der Milz haben hinsichtlich der Oberflächenmarkierung  $CD21^{\text{niedrig}}CD23^-$   $B220^{\text{niedrig}}CD19^{\text{hoch}}$  das gleiche Expressionsprofil wie die aberrante B-Zellpopulation. B1 B-Zellen der Milz werde des Weiteren durch die Marker  $CD43^+IgM^{\text{hoch}}IgD^{\text{variabel}}CD5^{-/+}$  (Baumgarth 2011) charakterisiert. Um zu untersuchen, ob die aberrante B-Zellpopulation noch weitere Marker von B1 B-Zellen exprimieren, wurden die Milzzellen der gealterten LMP1/CD40 Mäuse mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels FACS Analyse analysiert.



**Abbildung 45: Die aberrante B-Zellpopulation der Milz der gealterten LMP1/CD40 Mäuse nimmt einen charakteristischen Phänotyp an.** Milzzellen von gealterten LMP1/CD40//CD19Cre, ReIB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und von CD19Cre Mäusen wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD5,  $\alpha$ -CD43,  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -CD19 und  $\alpha$ -CD23 Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert um B1a (IgM<sup>hoch</sup>CD5<sup>hoch</sup>B220<sup>niedrig</sup>) und B1b (IgM<sup>hoch</sup>CD5<sup>niedrig</sup>B220<sup>niedrig</sup>) von B2 (IgM<sup>hoch</sup>CD5<sup>niedrig</sup>B220<sup>hoch</sup>) B-Zellen unterscheiden zu können. Dargestellt ist eine FACS-Analyse für jeden Genotyp mit den jeweiligen prozentualen Anteilen. Für die FACS-Analyse wurde auf lebende Lymphozyten vorgegattet. Für die CD5 Färbung wurde auf IgM<sup>+</sup>-Zellen und für die CD43 Färbung auf CD19<sup>+</sup>-Zellen vorgegattet.

Die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> Population ist in den gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen CD43<sup>+</sup> und negativ für CD5. Diese Population konnte in der aberranten und intermediären Gruppe von ReIB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen auch detektiert werden, wenn auch zu einem geringeren Prozentsatz als bei LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und in der intermediären Gruppe prozentual entsprechend weniger, als in der aberranten Gruppe. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die aberrante Population in ReIB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen verzögert entwickelt, im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. Die verbleibenden prozentualen Anteile der B220<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> B2 B-Zellen in der aberranten und intermediären Gruppe der ReIB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse, resultieren wahrscheinlich aus den verbliebenen FoB's (B220<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>). Die repräsentative ReIB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Maus aus der normalen Gruppe, war in ihrem B-Zellprofil vergleichbar mit jungen Mäusen, es waren entsprechende prozentuale Anteile für B2 und B1a und B1b B-Zellen zu beobachten. Als letzten Schritt wurde das IgM/IgD B-Zellprofil der gealterten Mäuse auf mögliche Veränderungen hin untersucht. Das Expressionsprofil variierte sehr stark innerhalb der gealterten LMP1/CD40 Mäusen unabhängig von ReIB. Der erwartete IgM<sup>hoch</sup>IgD<sup>niedrig</sup> Phänotyp der die B1 B-Zellen beschreibt, konnte nur teilweise beobachtet werden. Bei der LMP1/CD40//CD19Cre Maus und der ReIB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Maus der aberranten Gruppe, war sowohl IgM als auch IgD auf der Oberfläche stark runter reguliert. Bei der ReIB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Maus der intermediären Gruppe, ist eine geringe Reduktion der IgM Expression zu

beobachten im Vergleich zur Maus der normalen Gruppe, welche im IgM/IgD-B-Zellprofil den Phänotyp der jungen  $RelB^{fl/fl}$ /LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse repräsentiert. Die Analyse der Kontrollmaus führte zu einem erwartenden IgM/IgD-Profil der B-Zellen.

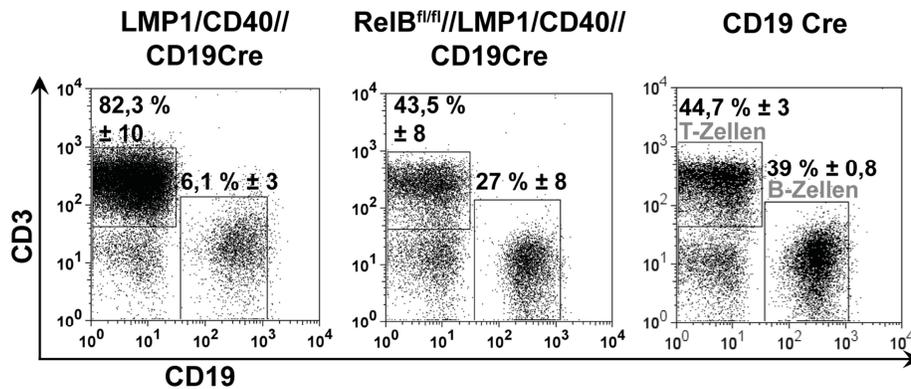


**Abbildung 46: Das IgM/IgD-B-Zellprofil in der Milz variiert in den gealterten LMP1/CD40 Mäusen.** Milzzellen von gealterten LMP1/CD40//CD19Cre,  $RelB^{fl/fl}$ /LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen wurden mit  $\alpha$ -CD19,  $\alpha$ -IgM und  $\alpha$ -IgD gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt ist die jeweilige FACS Analyse, bei der auf lebende Lymphozyten und  $CD19^+$  B-Zellen vorgegattet wurde.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die aberrante Population in gealterten (> 14 Monate)  $RelB^{fl/fl}$ /LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen einen vergleichbaren Phänotyp wie in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen besitzt. Das Expressionsprofil für die IgM/IgD Oberflächenmarkierung variierte unabhängig von  $RelB$  in den gealterten LMP1/CD40 Mäusen stark. Anhand der FACS-Daten konnten wir die dominierende aberrante  $CD21^{niedrig}CD23^-$  B-Zellpopulation der Milz der gealterten LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne  $RelB$  nicht eindeutig einer bestimmten B-Zellgruppe zuordnen. Die Kombination der unterschiedlichen Färbungen wies jedoch darauf hin, dass die aberrante Population den Phänotyp  $B220^{niedrig}CD19^{hoch}CD43^+CD5^-IgM/IgD^{variabel}$  annimmt.

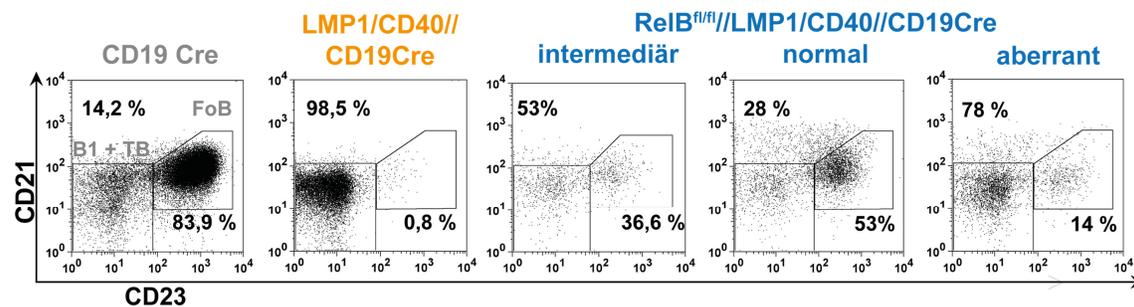
#### 3.4.4 Die aberrante $CD21^{niedrig}CD23^-$ B-Zellpopulation ist neben der Milz auch im Blut vertreten

Wir wollten als nächstes untersuchen, ob auch eine Veränderung im B-Zellphänotyp der Blutzellen der gealterten (> 14 Monate alten) LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne  $RelB$  festgestellt werden kann. Dafür analysierten wir zuerst die prozentuale Verteilung der zirkulierenden B- und T-Zellen und konnten für die drei Genotypen nur geringe Unterschiede in der Verteilung der zirkulierenden B- und T-Zellen zu den jeweiligen jungen Mäusen feststellen (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Die zirkulierenden B- und T-Zellzahlen im Blut sind bei den drei Genotypen vergleichbar mit jungen Mäusen. Blutzellen der drei Genotypen wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD19 gefärbt. Mittels FACS Analyse auf lebende Lymphozyten wurden die zirkulierenden B-Zellen für LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (links) und RelB<sup>fl/fl</sup>/LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (mittig) im Vergleich zu Kontrollmäusen (rechts) untersucht. Dargestellt ist eine repräsentative FACS-Analyse für jeden Genotyp; n = 4.

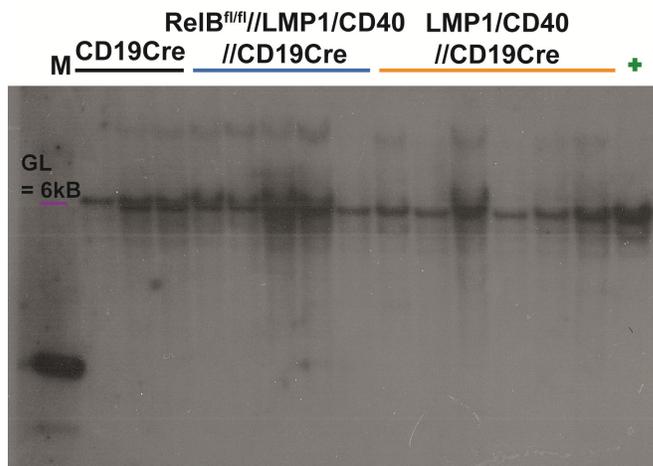
In Abbildung 48 ist zu erkennen, dass in gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und in RelB<sup>fl/fl</sup>/LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen aus der aberranten Gruppe, die CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation neben der Milz, auch zusätzlich im Blut zu detektieren war. Je höher der prozentuale Anteil der aberranten Population in der Milz war, umso höher war er auch im Blut. Umgekehrt war dann der prozentuale Anteil der zirkulierenden folliculären B-Zellen geringer, wenn der Anteil der aberranten Population zunahm. Betrachtet man das Beispiel der normalen Gruppe der RelB<sup>fl/fl</sup>/LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse, bei der die aberrante Population in der Milz nicht zu detektieren war, so war hier der Phänotyp der zirkulierenden B-Zellen vergleichbar mit den jungen RelB<sup>fl/fl</sup>/LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. Auch die Kontrollmäuse zeigten keine Veränderungen im B-Zellphänotyp im Vergleich zum Profil der jungen Kontrollmäuse.



**Abbildung 48:** Die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation zirkuliert auch im Blut. Blutzellen der drei Genotypen wurden mit  $\alpha$ -B220,  $\alpha$ -CD21 und  $\alpha$ -CD23 gefärbt. Mittels FACS Analyse auf lebende Lymphozyten und B220<sup>+</sup> Zellen wurden die zirkulierenden B-Zellen für LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse und RelB<sup>fl/fl</sup>/LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse im Vergleich zur Kontrolle untersucht. Dargestellt ist die jeweilige FACS-Analyse bei der zuvor auf lebende Lymphozyten und B220<sup>+</sup> B-Zellen vorgegattet wurde. FoB = folliculäre B-Zellen; TB = transitionale B-Zellen.

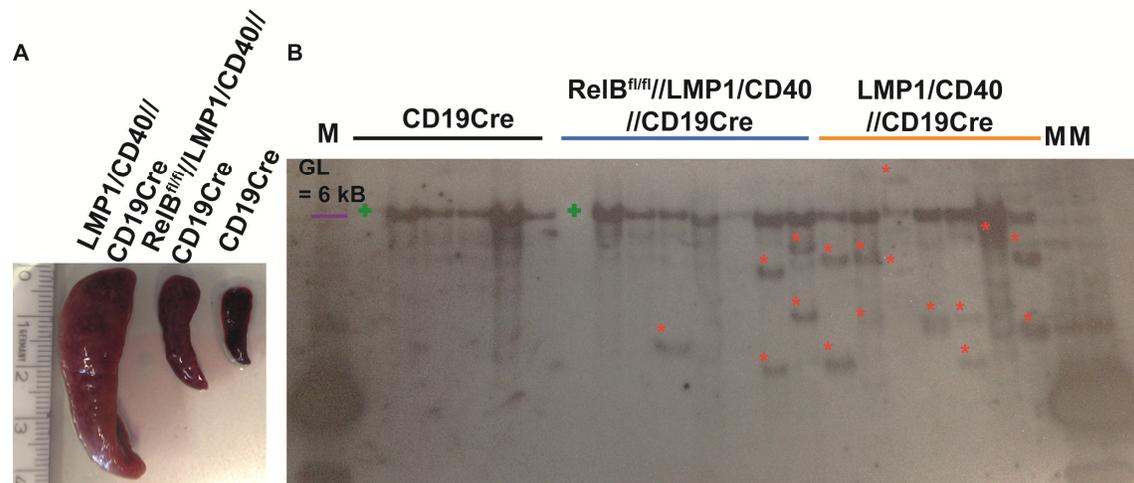
### 3.4.5 Gealterte RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre (> 14 Monate) entwickeln im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen zu einer geringeren Inzidenz Tumore in der Milz

Cornelia Hömig-Hölzel konnte mit ihrer Arbeit in unserem Labor nachweisen, dass mindestens 60 % der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse ab einem Alter von > 12 Monate B-Zelllymphome in der Milz entwickeln (Hömig-Hölzel et al. 2008). Wir konnten feststellen, dass LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse ab einem Alter von 10-12 Monaten teilweise ein fast verdoppeltes Milzgewicht und teilweise vermehrt B-Zellen im Vergleich zu jungen Mäusen aufweisen. Auch zeigten die Mäuse zu diesem Zeitpunkt mit ~65 % schon verstärkt die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz. Bei RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im gleichen Alter war weder eine Milzgewicht- noch B-Zellzunahme zu beobachten und die aberrante B-Zellpopulation war mit ~32 % im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen weniger stark vertreten. Zunächst wollten wir untersuchen, ob gealterte LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse bereits mit einem Alter zwischen 10-12 Monaten B-Zelltumore in der Milz entwickeln. Bei B-Zelllymphomen kommt es in der Regel zu einer Expansion von einem oder mehreren B-Zellklonen. Zur Untersuchung der Tumorentstehung, wurde die Southern Blot Analyse angewandt. Das Prinzip der Methode beruht darauf, klonal (mono- oder polyklonal) expandierte B-Zellen in der Milz zu detektieren. Dazu wurde genomische DNS der Milzzellen mit EcoRI verdaut. Der Blot mit der DNS aus den Milzzellen der jeweiligen Genotypen wurde mit einer radioaktiv gelabelten IgH-Sonde hybridisiert, die spezifisch an eine komplementäre Sequenz in dem Bereich zwischen J4 und E $\mu$  des IgH-Lokus im B-Zellrezeptor bindet. Die auftretende Bande mit der Größe von 6 kB repräsentiert die ursprüngliche Keimbahn-Anordnung des B-Zellrezeptors. Können weitere Banden unterschiedlichster Länge in einer Probe identifiziert werden, so resultieren diese aus neu entstandenen EcoRI Schnittstellen nach Umlagerung des B-Zellrezeptors (VDJ-Rekombination), welche dann aufgrund der klonalen Expandierung der B-Zelle mit Hilfe dieser Methode detektierbar sind. Können 1 bis 2 weitere Banden ermittelt werden, so spricht dies für eine monoklonale Expansion der B-Zelle und bei mehr als 2 weiteren Banden spricht man von polyklonaler Expansion. LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne RelB entwickeln in einem Alter zwischen 10 und 12 Monaten noch keine B-Zelltumore in der Milz (Abbildung 49). In keiner der analysierten Mäuse (transgen oder Kontrolle) konnte eine eindeutige zusätzliche Bande festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass die aberrante Population zur dominierenden B-Zellpopulation in der Milz der LMP1/CD40//CD19Cre und teilweise in den RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im Laufe der Zeit wird, ihr Auftreten in einem Alter zwischen 10 und 12 Monaten jedoch noch keine monoklonale B-Zellexpansion widerspiegelt.



**Abbildung 49: LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne RelB entwickeln in einem Alter zwischen 10-12 Monate keine B-Zelltumore in der Milz.** Dargestellt ist eine repräsentative Southern Blot Analyse der B-Zellen der Milz für LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (rechts, orange), RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (mittig, blau) und CD19Cre Mäusen (links, schwarz) in einem Alter zwischen 10-12 Monate. M = Marker; + = Positivkontrolle; GL = *germline*, B-Zellrezeptor in der Keimbahn-Anordnung bei 6 kB (lila Strich).

Als nächstes wollten wir die Frage beantworten, ob die Inaktivierung von RelB Einfluss auf die Lymphomentstehung in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen ab einem Alter von über 14 Monaten hat. In der folgenden Abbildung ist ein repräsentatives Bild der Milzen aus einer meiner Analysen der alten Mäuse (> 14 Monate) dargestellt, welches die Größenverhältnisse der Milzen der LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu den Milzen der RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und zu Kontrollmilzen verdeutlicht. Des Weiteren ist eine charakteristische Southern Blot Analyse der Milzzellen der gealterten Mäuse abgebildet, welche zeigt, dass in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse ebenfalls monoklonale B-Zellpopulationen in der Milz auftreten, diese im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen jedoch eine geringere Inzidenz aufweisen. Die Daten zeigten, dass von 12 getesteten RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen bei 6 Mäusen (50 %) 1-2 zusätzliche Banden detektierbar waren und von den 12 getesteten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen wiesen alle 12 Mäuse (100 %) 1-2 zusätzliche Banden auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Deletion von RelB in B-Zellen von LMP1/CD40 Mäusen zu einer geringeren Tumorinzidenz in der Milz führt.



**Abbildung 50: RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse entwickeln im Alter ab 14 Monaten zu einer geringeren Inzidenz Tumore in der Milz.** **A.** Repräsentative Darstellung der Milzen der drei Genotypen im Alter von über 14 Monaten im direkten Vergleich. **B.** Charakteristische Southern Blot Analyse mit EcoRI geschnittener DNS von gealterten (> 14 Monate) RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre, LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Kontrollmäusen. Die obere Bande bei 6 kB zeigt die Keimbahn-Anordnung des B-Zellrezeptors, bei dem keine Umlagerung des Lokus stattgefunden hat. Die mit roten Sternchen gekennzeichneten Banden zeigen zusätzliche detektierte Banden. Die grünen Kreuze kennzeichnen ausgefallene Spuren, in denen keine oder zu wenig DNS vorhanden war. M = Marker; GL = *germline*, B-Zellrezeptor in der Keimbahn-Anordnung bei 6 kB (lila Strich).

Wir haben uns im nächsten Schritt angeschaut, ob sich die Tumor-B-Zellpopulation in den LMP1/CD40//CD19Cre (zusätzliche Bande im Southernblot) phänotypisch von den RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre mit (zusätzliche Band im Southernblot) und ohne Tumor (keine zusätzliche Bande) unterscheiden. Im Gegensatz zu 10-12 Monate alten LMP1/CD40 Mäusen war jetzt eindeutig zu erkennen, dass eine Korrelation zwischen Auftreten der CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation in der FACS-Analyse und zusätzlichen Banden im Southern Blot bestand, was die Vermutung zulässt, dass diese zur Tumor-B-Zellpopulation der Milz geworden ist. LMP1/CD40 Mäuse im Alter von über 14 Monaten, welche die aberrante B-Zellpopulation in der Milz aufwiesen, ließen, unabhängig von RelB, auch zusätzliche Banden in der Southern Blot Analyse erkennen. Gealterte RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse ohne zusätzliche Bande im Southern Blot, waren auch im B-Zell-Phänotyp eher mit jungen Mäusen vergleichbar und die aberrante B-Zellpopulation in der Milz zu einem geringeren Prozentsatz detektierbar. Die folgende Tabelle dient als Übersicht einiger analysierten, über 14 Monate alten LMP1/CD40 Mäusen mit und ohne RelB und Kontrollmäusen.

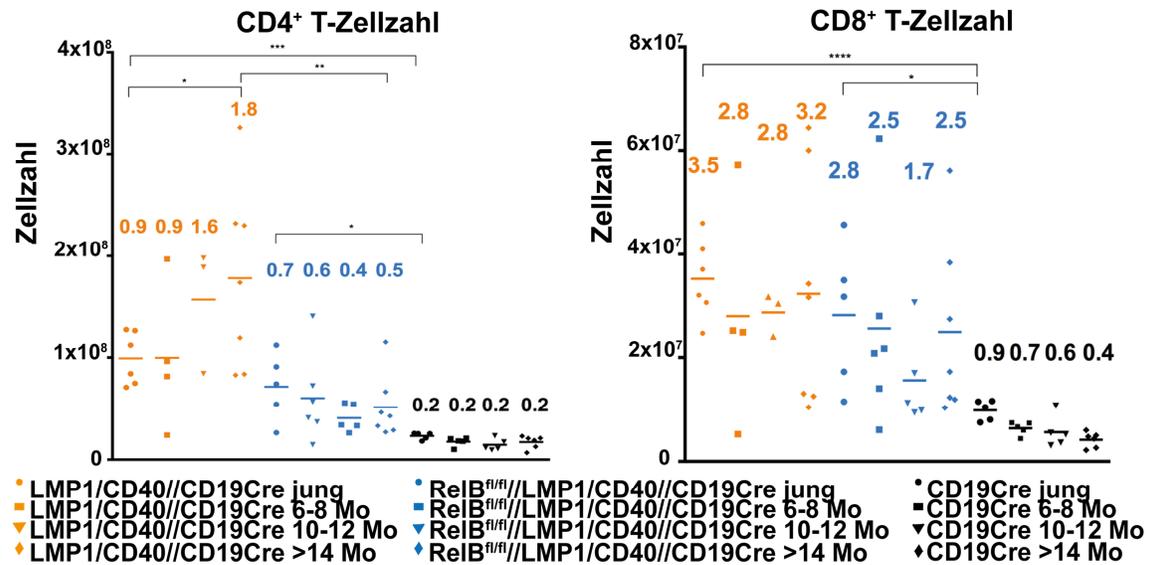
Genotyp	LMP1/CD40//CD19Cre										RelB <sup>fl/fl</sup> //LMP1/CD40//CD19Cre							CD19Cre	
	#20	#29	#25	#34	#46	#52	#54	#67	#865	#909	#921	#917	#927	#933	#949	#20	#21	#70	
Mausnummer	14	15	16	16	15	15	15	16	15	15	15	16	15	15	16	15	16	16	
Alter (Monat)	1,9	1,0	2,5	1,6	1,1	1,0	3,0	2,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,1	0,2	0,1	
Milzgewicht (g)	51,3	50,0	65,0	36,4	49,7	25,8	12,0	87,5	54,7	58,6	70,8	54,7	50,3	66,2	40,1	52,6	53,6	50,8	
B-Zellen (10 <sup>7</sup> )	77	50	65	22	30	15	20	230	10	32	15	19	13	16	20	3	4,8	4,2	
Anteil T-Z %	38,6	39,5	20,7	48,2	36,8	52,9	80,5	8,8	37,0	32,0	23,7	34,4	31,2	24,8	16,0	34,7	34,4	32,4	
T-Zellen (10 <sup>7</sup> )	59	40	20	29	18	28	130	24	7,4	20	4,7	12	8,1	6	7,4	2	3	2,5	
Anteil CD4+ %	39,3	57,5	68,0	55,3	65,9	65,0	89,6	39,5	45,5	57,6	61,7	55,1	57,5	71,5	39,4	64,6	76,7	71,2	
Anteil CD69+ %	73,3	61,6	55,8	67,2	58,5	66,1	30,0	80,9	32,0	46,3	51,8	44,0	30,5	37,1	34,5	19,5	24,0	23,1	
CD4+-Zellen(10 <sup>7</sup> )	23	23	14,0	16	12	18	100	9,5	3,3	11	2,9	6,6	4,6	4,3	2,9	1,3	2,3	2,0	
Anteil CD8+ %	5,8	15,0	6,7	8,7	7,3	23,0	4,7	4,8	14,4	28,0	26,7	30,1	34,7	20,1	25,8	21,0	15,5	15,7	
Anteil CD69+ %	81,8	50,6	59,9	65,7	51,3	23,7	38,2	73,5	11,2	40,8	39,6	29,8	21,1	37,1	44,8	12,5	14,5	16,9	
CD8+-Zellen (10 <sup>7</sup> )	3,4	6	1,3	2,5	1,3	6,4	2,4	1	1	5,6	1,3	3,8	2,8	1,2	1,9	0,4	0,5	0,5	
Marker B-Z Milz																			
B220	low	low/+	low	low	low	low	+	low	low	+	+	low/+	+	low/+	low	+	+	+	
CD19	++	+/++	+/++	+/++	++	++	+	+	+	+	+	+/++	+	+/++	low	+	+	+	
CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> %	93%	60,7%	88%	83,8%	81,7%	84,2%	91,3%	90%	32,7%	23,4%	11,7%	41%	14,3%	60%	60%	13%	13%	10%	
IgM <sup>hoch</sup> IgD <sup>niedrig</sup> %	72,6	42,1	57,4	30,9	29,5	14,7	53,4	low	31,1	30,1	23,1	21,8	31	60,9	low	14	13	10,1	
IgM <sup>+</sup> IgD <sup>hoch</sup> %	16	44,9	33,7	46,6	42,5	38,8	23,9	-	51,5	66	71,5	69,7	56,9	28,3	-	72,5	67	77,6	
CD43 <sup>+</sup> %	69,4	53,7	83,7	41,4	26,1	58	71,9	74	31,2	31	9,1	20	14,7	61,9	40,2	6,2	6,2	4,5	
CD21 <sup>niedrig</sup> CD23 <sup>-</sup> Blut %	91,6%	77,9%	k.D.	91,8%	90,4%	97,0%	99,1%	98,0%	80,0%	37,0%	21,8%	67,0%	29,4%	83,5%	77,0%	-	-	-	
Southern Blot	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	

(vorige Seite) **Tabelle 3: Die Tabelle zeigt die analysierten LMP1/CD40//CD19Cre, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäuse ab einem Alter von 14 Monaten.** Dargestellt sind Zellzahlen, phänotypische B-Zellmarkierungen auf der Oberfläche in der Milz, das Auftreten der aberranten Population im Blut und die Ergebnisse der Southern Blot Analysen; + = zusätzliche Banden detektierbar; - = keine zusätzlichen Banden zur Wildtypbande erkennbar; low = niedrig Expression; K.D. = keine Daten verfügbar; + = positive Population; ++ = Population mit hoher Expression; int = intermediäre Expression; B-Z = B-Zellen; T-Z = T-Zellen.

### **3.4.6 In gealterten RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen sind kaum naive, jedoch hoch aktivierte T-Zellen in der Milz**

Kristina Stojanovic konnte in ihrer Doktorarbeit 2013 zeigen, dass in jungen LMP1/CD40 Mäusen mit und ohne RelB, im Vergleich zu Kontrollmäusen, sowohl die CD4<sup>+</sup> als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen erhöht waren. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF-κB Signalweges in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen nicht für die T-Zellexpansion in jungen Mäusen verantwortlich ist. Ich konnte feststellen, dass auch bezüglich der prozentualen Verteilung zwischen den drei Genotypen in der Milz kein großer Unterschied festzustellen war, so ergab sich folgende durchschnittliche prozentuale CD4/CD8 Verteilung: LMP1/CD40//CD19Cre 63,8 % ± 2,9 / 21,9 % ± 1,6; RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre 61,3 % ± 7,5 / 23,4 % ± 2,1 und CD19Cre Mäusen 62,3 % ± 3,1 / 27 % ± 2,3. Im Lauf der Zeit nahmen in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen neben den B-Zellen, auch die T-Zellen zu. Um herauszufinden, ob die weitere T-Zellexpansion in LMP1/CD40 Mäusen über die Zeit durch CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgelöst wurde, wurden die absoluten Zahlen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Zeitraum von jungen bis gealterten Mäusen bestimmt. Um die Daten vergleichen zu können, wurden die T-Zellzahlen der jungen Mäuse aus meinen Analysen in die Grafik mit aufgenommen. Die Darstellung der allgemeinen T-Zellzahlen ist in Abbildung 41 zu finden.

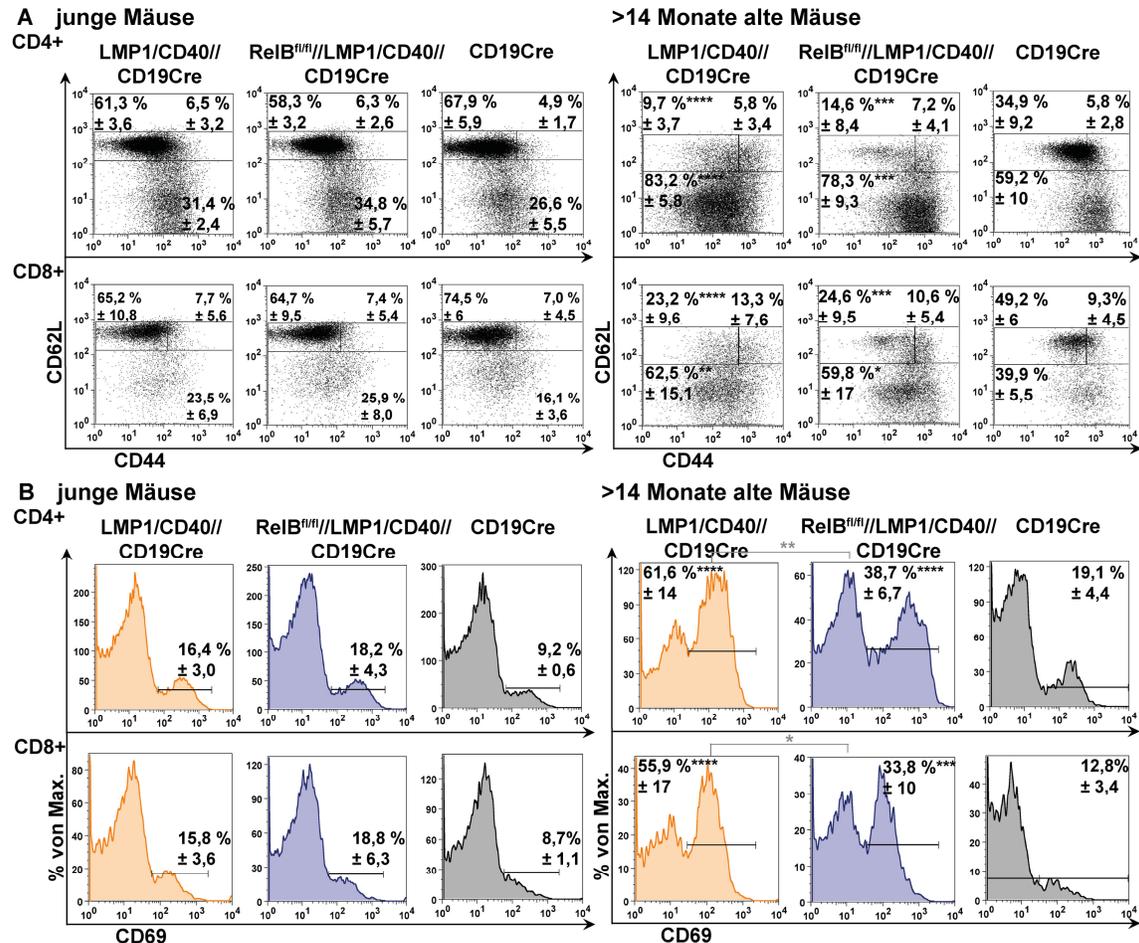
Diese Daten zeigen, dass die weitere T-Zellexpansion in der Milz in gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen vor allem aus der Zunahme der CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die Zeit resultierte. In gealterten RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen war zu beobachten, dass es nicht zu einer weiteren Zunahme der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz kam. In den analysierten Kontrollmäusen konnten keine Veränderungen in der Anzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu jungen Mäusen beobachtet werden.



**Abbildung 51:** In LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen nehmen vor allem die CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die Zeit zu. Milzzellen von LMP1/CD40//CD19Cre (orange), RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre (blau) und für CD19Cre (schwarz) wurden mit  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD4 und  $\alpha$ -CD8 Antikörpern gefärbt und mittels FACS-Analyse konnten, nach vorgaten auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen, die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt werden. Durch Verrechnung der prozentualen Anteile mit den Gesamtzellzahlen konnten die hier dargestellten absoluten Zellzahlen für den jeweiligen Genotyp für einen bestimmten Zeitpunkt von jungen (< 4 Monate), 6-8 Monate, 10-12 Monate und gealterten Mäusen (> 14 Monate) ermittelt werden. Der Balken kennzeichnet den Mittelwert (Zahl) aller Datenpunkte pro Genotyp. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001; mit zweiseitigem t-Test berechnet; n = 5-20.

Um zu analysieren, ob in gealterten (> 14 Monate) LMP1/CD40 Mäusen mit und ohne RelB eine Verschiebung der prozentualen Anteile von naiven T-Zellen (CD62L<sup>hoch</sup>CD44<sup>niedrig</sup>) und Gedächtnis-T-Zellen (CD62L<sup>hoch</sup>CD44<sup>hoch</sup>) zu Effektor-T-Gedächtniszellen (CD62L<sup>niedrig</sup>CD44<sup>hoch</sup>) auftritt, wurden Milzzellen von jungen (< 4 Monaten) und gealterten (> 14 Monate) RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre, LMP1/CD40//CD19Cre und CD19Cre Mäusen mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Zusätzlich sollte auch die Frage geklärt werden, ob ein Unterschied im Aktivierungsstatus der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in jungen und gealterten Mäusen und zwischen den einzelnen Genotypen zu detektieren ist. Dazu wurde auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Milz-T-Zellen aller drei Genotypen die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche analysiert. Die Untersuchungen haben ergeben, dass sowohl bei den CD4<sup>+</sup> als auch bei den CD8<sup>+</sup> in jungen RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre, kein großer Unterschied in der Verteilung der naiven T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-T-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen bestand. Auch bei der Aktivierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren die Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sehr gering. In den gealterten RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen ist jedoch ein deutlicher Phänotyp im Vergleich zu CD19Cre Mäusen erkennbar: i) es sind kaum naive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennbar, dafür vermehrt Effektor-T-Gedächtniszellen und ii) die CD4<sup>+</sup> und

CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind deutlich aktiver (CD69<sup>+</sup>), wenn auch bei den RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen deutlich weniger ausgeprägt im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen.



**Abbildung 52.** In alten LMP1/CD40 Mäusen sind unabhängig von RelB keine naiven T-Zellen mehr erkennbar und die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind hoch aktiviert. **A.** Milzzellen von jungen (< 4 Monate) und alten (> 14 Monate) LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen wurden zuerst mit α-CD3, α-CD4, α-CD8, α-CD62L und α-CD44 Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Verteilung von naiven T-Zellen, (CD62L<sup>hoch</sup>CD44<sup>niedrig</sup>), zentralen T Gedächtniszellen (CD62L<sup>hoch</sup>CD44<sup>hoch</sup>) und Effektor-T-Gedächtniszellen (CD62L<sup>niedrig</sup>CD44<sup>hoch</sup>) in jungen und alten Mäusen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit den Mittelwerten der prozentualen Anteile von mindestens 5 Mäusen pro Genotyp. **B.** Milzzellen von jungen (< 4 Monate) und alten (> 14 Monate) LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen, RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und CD19Cre Mäusen wurden mit α-CD3, α-CD4, α-CD8 und α-CD69 Antikörper gefärbt und die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche von T-Zellen mittels FACS detektiert. Für die FACS-Analyse wurde auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen vorgegattet. Die obere Reihe zeigt jeweils die CD4<sup>+</sup>, die Untere die CD8<sup>+</sup> T-Zellen; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001.

Die Erkenntnisse aus den T-Zell-Analysen weisen darauf hin, dass die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF-κB Signalweges in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen für die T-Zellexpansion in den Milzen der jungen Mäuse keine entscheidende Rolle spielt, jedoch verstärkt die CD4 T-Zellexpansion in den gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen beeinflussen könnte.

## 4 Diskussion

Die alleinige Funktion des Transkriptionsfaktors RelB in B-Zellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. RelB<sup>-/-</sup> Gesamtknockout-Mäuse weisen einen komplexen Phänotyp auf, einschließlich entzündlicher Zellinfiltrationen in mehreren Organen, myeloischer Hyperplasie, Splenomegalie und einer beeinträchtigten Milzarchitektur. Diese Daten machen deutlich, dass RelB eine essentielle Rolle für verschiedene spezifische und unspezifische Immunreaktionen spielt und seine Funktion nicht von anderen Mitgliedern der Rel-Familie kompensiert werden kann (Weih et al. 1995; Weih et al. 1997; Weih et al. 2001). Kristina Stojanovic konnte in ihrer Doktorarbeit 2013 zeigen, dass die Deletion von RelB in B-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Mäusen führt, jedoch keinen Einfluss auf die B-Zellentstehung im Knochenmark hat. Sie konnte auch zeigen, dass RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse ein tendenziell reduziertes Milzgewicht und weniger B-Zellen in der Milz haben und im Lymphknoten die follikulären B-Zellen erkennbar erniedrigt waren. Im ersten Teil dieser vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden: (i) ist die Reduktion des Milzgewichtes und der B-Zellzahlen in der Milz signifikant? und falls ja (ii) welche B-Zellpopulationen sind in den RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Kontrollmäusen *in vivo* reduziert? (iii) welchen Einfluss hat eine B-Zell-spezifische Deletion von RelB auf die B-Zelldifferenzierung, die B-Zellaktivierung sowie das Überleben von B-Zellen *in vitro*? Um diese Fragen beantworten zu können, wurden RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit CD19Cre Mäusen gekreuzt, was zu einem Verlust eines funktionsfähigen RelB-Proteins in B-Zellen bei den RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen führte.

### 4.1 Die Rolle des nicht-kanonischen NF-κB Signalweges auf die B-Zelldifferenzierung *in vivo*

#### 4.1.1 Die nicht-kanonischen NF-κB Komponenten werden in den B-Zellen der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen vermindert exprimiert

Zu Beginn der Arbeit wurde die Expression der nicht-kanonischen NF-κB Komponenten in B-Zellen der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse mittels Western Blot Analysen untersucht und mit B-Zellen der Kontrollmäuse verglichen. Die RelB Bande war in den B-Zellen der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen stark reduziert, jedoch nicht komplett weg. Es ist anzunehmen, dass die schwache Bande von den verbleibenden T-Zellen resultiert, die sich nach der B-Zellisolation aus der Milz noch in der Probe befinden. Die Inaktivierung von RelB führte außerdem zu deutlich niedrigeren p100 und p52 Level in B-

Zellen. Ein Grund für den reduzierten p100 Proteingehalt könnte sein, dass RelB für die Stabilisierung von p100 wichtig ist. Studien an RelB-defizienten Zellkulturzellen zeigten, dass in diesen die p100 Expressionslevel stark reduziert waren und durch Transfektion mit RelB die Halbwertszeit von p100 verlängert werden konnte. Diese Theorie wird weiter unterstützt durch Versuche mit RelB<sup>-/-</sup> MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*), wodurch gezeigt wurde, dass in Abwesenheit von RelB die Protein-Expression von p100 im Vergleich zu Wildtyp-MEFs reduziert ist (Fusco et al. 2016). Diese Fakten implizieren eine mögliche Rolle für RelB bei der Stabilisierung von p100.

#### 4.1.2 Die Deletion von RelB in B-Zellen führt zu einer Reduktion der reifen B2 Zellen

Bei RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen trat im Vergleich zu CD19Cre Kontrollmäusen eine signifikante Reduktion des Milzgewichtes auf, welches in Relation mit signifikant reduzierten Gesamtzellzahlen in der Milz stand. Die erniedrigten Gesamtzellzahlen resultierten aus den signifikant erniedrigten B-Zellzahlen in der Milz der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse. Bei der genaueren Analyse, welche B-Zellpopulationen in den RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen reduziert sind, konnten wir aufklären, dass transitionale B-Zellen im T3 Stadium, folliculäre B-Zellen und auch Marginalzonen B-Zellen in der Milz signifikant vermindert sind, wohingegen kein Effekt auf das B1 B-Zellkompartiment festgestellt werden konnte. Auch im Blut der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse zeichnete sich die Tendenz zur Reduktion von zirkulierenden folliculären B-Zellen ab. Kristina Stojanovic konnte 2013 in ihrer Doktorarbeit zeigen, dass ebenso im Lymphknoten der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse die folliculären B-Zellen erkennbar erniedrigt waren. De Silva und seine Kollegen publizierten, dass RelB/NFκB2 B-Zell-spezifische Doppelknockout-Mäuse reduzierte prozentuale Anteile von folliculären und transitionalen B-Zellen im T3 Stadium aufweisen (De Silva et al. 2016). Unsere Daten zeigen, dass die alleinige Deletion von RelB in den B-Zellen ausreicht, um die Anzahl der reifen B2 B-Zellen in der Peripherie zu dezimieren. Der Doppelknockout von RelB und p100/p52 in B-Zellen kann diesen Phänotyp verstärken, reicht jedoch nicht für einen kompletten Verlust der peripheren B-Zellen aus (De Silva et al. 2016). In RelB<sup>-/-</sup>c-Rel<sup>-/-</sup>Doppelknockoutmäusen sind die reifen B-Zellen stärker als in den Einzelknockoutmäusen reduziert (Almaden et al. 2016). Zusätzlich führt der Doppelknockout von NFκB1<sup>-/-</sup>NFκB2<sup>-/-</sup> in Mäusen zu einem Verlust von reifen B-Zellen (Attar et al. 1997; Franzoso et al. 1998; Claudio et al. 2002). Diese Daten lassen vermuten, dass der kanonische und der nicht-kanonische NF-κB Signalweg sich bis zu einem gewissen Grad während der B-Zelldifferenzierung und Homöostase ergänzen können. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde der BAFF/BAFFR Signalweg als ein wichtiger Faktor für das Überleben und für die Reifung von T2, folliculärer und Marginalzonen B-Zellen beschrieben und im Gegensatz dazu, ist er nicht in die Entstehung und Aufrechterhaltung der B1 B-Zellen

involviert (Bossen & Schneider 2006; Batten et al. 2000; Gardam & Brink 2014; Mackay & Browning 2002; Rolink & Melchers 2002). Es wird vermutet, dass die Abhängigkeit der B-Zellen von BAFF in der Milz ab dem T2 B-Zellstadium beginnt, da hier eine Zunahme der BAFFR-Expression detektiert wurde (Meyer-Bahlburg et al. 2008; Rowland et al. 2010; Sasaki et al. 2004). BAFF Signale aktivieren hauptsächlich den nicht-kanonischen Signalweg und es wird vermutet, dass über diesen Signalweg das Überleben der reifen B-Zellen vermittelt wird (Gardam & Brink 2014; Morrison et al. 2005). BAFF<sup>-/-</sup> Mäuse weisen einen Verlust der transitionalen T2 B-Zellen, der folliculären und Marginalzonen B-Zellen auf, während die B-Zellentstehung im Knochenmark, die Entwicklung der T1 B-Zellen und B1 B-Zellen unberührt ist (Schiemann et al. 2001; Rahman et al. 2003). BAFFR<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse haben einen weniger ausgeprägten Phänotyp als BAFF-defiziente Mäuse, jedoch auch sie zeigen stark reduzierte späte transitionale und folliculäre B-Zellzahlen und einen vollständigen Verlust von Marginalzonen B-Zellen (Lin et al. 2015; Sasaki et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeigten *in vivo* Studien, dass eine Überexpression von BAFF zu erhöhten peripheren B-Zellzahlen führt (Mackay et al. 1999; Lesley et al. 2004). Der ähnliche, wenn auch weniger stark ausgeprägten Phänotyp unserer RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse, ist ein Hinweis darauf, dass RelB-defiziente B-Zellen *in vivo* nicht mehr vollständig über den BAFFR stimuliert werden können. Die RelB-defizienten reifen T2 B-Zellen könnten dadurch zum einen in ihrem Differenzierungspotenzial beeinträchtigt sein und es dann in Folge dessen zu einer Reduktion der reifen B2 B-Zellen in der Peripherie kommen. Zum anderen könnte das reduzierte Überlebenspotenzial der T2 B-Zellen, folliculären und Marginalzonen B-Zellen zu einer weiteren Verminderung dieser B-Zellpopulationen führen.

## **4.2 Die Funktion von RelB für das Überleben, die Aktivierung und die Differenzierung der B-Zellen *in vitro***

### **4.2.1 RelB-defiziente B-Zellen reagieren verschlechtert auf BAFF Stimulation**

Wir haben deshalb die Stimulierbarkeit *ex vivo* isolierter RelB-defizienter B-Zellen durch exogene BAFF Stimulation untersucht. Im Gegensatz zu B-Zellen der Kontrolle, konnte durch BAFF Stimulation das Überleben von RelB-defizienten B-Zellen *in vitro* nicht verbessert werden. Jedoch führte die  $\alpha$ -CD40 Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils an lebenden RelB-deletierten B-Zellen, wenn auch nicht ganz so hoch wie der der Kontroll-B-Zellen. Diese Ergebnisse sprechen demnach dafür, dass die mangelnde Reaktivität der RelB-defizienten B-Zellen auf BAFF Signale, für die signifikante Reduktion der B2 B-Zellen in der Peripherie verantwortlich ist. Ähnliche Ergebnisse wurden inzwischen

von zwei weiteren Gruppen beschrieben. RelB/NFκB2-defiziente B-Zellen weisen einen Defekt in der Lebensfähigkeit der B-Zellen nach BAFF Stimulation auf, wohingegen die Stimulation mit α-CD40 zu einer verbesserten Lebensfähigkeit führte (De Silva et al. 2016). Almaden und seine Kollegen fanden heraus, dass B-Zellen von RelB<sup>-/-</sup>c-Rel<sup>-/-</sup> Doppeltknockoutmäusen ein verringertes Überlebenspotential nach BAFF Stimulation zeigten (Almaden et al. 2016). Wir konnten anhand der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse zum ersten Mal zeigen, dass RelB in B-Zellen für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Sowohl der BAFFR als auch CD40 können den nicht-kanonischen NF-κB Signalweg aktivieren. Der BAFFR gilt als der Hauptakteur in der NF-κB2 Prozessierung in ruhenden B-Zellen *in vivo* (Kayagaki et al. 2002; Claudio et al. 2002). CD40 Signale spielen hauptsächlich während der B-Zellaktivierung eine Rolle (Harnett 2004). Während CD40 in gleichem Maße den kanonischen und nicht-kanonischen NF-κB Signalweg aktiviert, ist die Fähigkeit des BAFFR für die Aktivierung des kanonischen Signalweges begrenzt (Morrison et al. 2005; Zarnegar et al. 2004). Diese einzigartige Funktion des BAFFR bevorzugt den nicht-kanonischen NF-κB Signalweg zu stimulieren, könnte an der atypischen TRAF-Bindedomäne *PVPAT* des BAFFR liegen, welche bevorzugt an TRAF3 bindet und nicht mit TRAF2 interagieren kann. Sie ist homolog zur TRAF2/TRAF3-Bindestelle *PVQET*-Domäne von CD40. Morrison und seine Kollegen konnten anhand von Zellkulturstudien aufklären, dass diese atypische Bindedomäne *PVPAT* des BAFFR nicht nur als ein wichtiges Signalmotiv fungiert, sondern auch die Signalspezifität bei der Induktion des nicht-kanonischen NF-κB Signalweges zu bestimmen scheint. Ferner zeigten sie durch Modifizierung der *PVPAT* Sequenz zur typischen TRAF2/TRAF3-Bindesequenz *PVQET*, dass dies ausreichend ist, um den BAFFR dazu zu bringen, ein starkes kanonisches NF-κB Signaling zu induzieren (Morrison et al. 2005). Ferner wurde auch beschrieben, dass bevorzugt TRAF2 in die Aktivierung des kanonischen NF-κB Signalweges involviert ist (Vince et al. 2009; Nguyen et al. 1999). Unsere unterschiedlichen Ergebnisse nach BAFF und α-CD40 Stimulation der RelB-defizienten B-Zellen *in vitro* könnten demnach damit zusammenhängen, dass die α-CD40 Stimulation offensichtlich einen anderen Signalweg in RelB-defizienten B-Zellen aktiviert, welcher in der Lage ist, den Defekt im Überleben nach BAFF Stimulation RelB unabhängig zu überwinden.

#### **4.2.1 B-Zellen der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse sind aktivierbar und können zu Plasmablasten und IgG1<sup>+</sup> Zellen differenzieren**

Aus den *in vivo* Daten meiner Kollegin Kristina Stojanovic wissen wir, dass RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse nach T-Zellabhängiger Immunisierung Keimzentren ausbilden können und die IgM und IgG1-Antikörpertiter im Serum vergleichbar mit denen von Kontrollmäusen sind. Snapper und seine Kollegen konnten anhand isolierter B-Zellen aus RelB<sup>-/-</sup> Mäusen demonstrieren,

dass RelB-defiziente B-Zellen ähnlich gut wie Kontroll-B-Zellen nach LPS+IL4 Stimulation *in vitro* zum IgG1 Isotyp wechseln (Snapper et al. 1996). Wir haben uns die Aktivierung der RelB-defizienten B-Zellen *in vitro* nochmals näher angeschaut. Die  $\alpha$ -CD40 Stimulierung führte in RelB-defizienten B-Zellen zur Hochregulation von CD95, ICAM, ICOSL und CD80, was darauf hindeutet, dass diese B-Zellen ähnlich wie Kontroll-B-Zellen *in vitro* aktiviert werden können. Ferner konnten die *in vitro* stimulierten RelB-defizienten B-Zellen ähnlich wie Kontroll-B-Zellen mit LPS zur Plasmablasten-Differenzierung und unter LPS und IL4 Stimulation zum Klassenwechsel zu IgG1<sup>+</sup> Zellen angeregt werden. Somit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass RelB in B-Zellen keine essentielle Rolle für die Aktivierung der B-Zellen und für die terminale Differenzierung zu Plasmablasten spielt und bestätigen, dass RelB nicht für den Klassenwechsel zu IgG1<sup>+</sup> Zellen benötigt wird.

### **4.3 Die Bedeutung von RelB und des konstitutiv aktiven CD40 Signalweges auf den B-Zellphänotyp in der Milz**

Es wurde unter Punkt 3.2.2 gezeigt, dass das Überleben von RelB-defizienten B-Zellen nach  $\alpha$ -CD40 Stimulation verbessert werden kann, wenn auch nicht so deutlich wie bei B-Zellen der Kontrolle. Es sollte deshalb im zweiten Teil meiner Arbeit untersucht werden, welche phänotypischen Auswirkungen die Inaktivierung von RelB in B-Zellen hat, die über ein LMP1/CD40 Fusionsprotein chronisch ein konstitutiv aktives CD40 Signal bekommen.

#### **4.3.1 Die Bedeutung von RelB in der LMP1/CD40 induzierten B-Zell Expansion**

Die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Milzgewichte und der B-Zellexpansion im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen, jedoch war beides verglichen mit Kontrollmäusen immer noch signifikant erhöht. Es gibt einige Hinweise darauf, dass eine konstitutive Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges zur B-Zellexpansion führt. TRAF2- und TRAF3-defiziente Mäuse weisen eine verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges, durch vermehrte Akkumulation von RelB und p52 im Kern auf, was zu einer Expansion von B-Zellen in der Milz führt (Gardam et al. 2008; Grech et al. 2004; Lin et al. 2015; Xie et al. 2007). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte Translokation von RelB und /oder p52 in den Kern, wie sie in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen zu beobachten ist, nicht alleine für die B-Zellexpansion verantwortlich ist. Es gibt für beide transgenen LMP1/CD40 Mauslinien keine Anzeichen darauf, dass die nukleäre Translokation von RelA oder cRel (Mitglieder des kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges) in den B-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen verstärkt ist. Wir konnten jedoch feststellen, dass in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen mit und

ohne RelB verstärkt p50 im Kern zu finden ist, ein weiteres Mitglied der kanonischen NF- $\kappa$ B Familie. Es ist bekannt, dass p50 neben RelA und c-Rel auch mit RelB Heterodimere eingehen kann um die Transkription bestimmter Zielgene zu aktivieren oder als p50 Homodimer in den Kern transloziert und dort eher eine reprimierende Funktion auf die Transkription ausübt (Ryseck et al. 1992; Guan et al. 2005; Derudder et al. 2003; Udalova et al. 2000). Da in den RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen weder RelA noch cRel vermehrt im Kern detektierbar war und kein RelB vorhanden ist, gehen wir davon aus, dass verstärkt p50 Homodimere gebildet werden und diese eine reprimierende Funktion auf die Expression einiger Gene haben. Zusätzlich sind in beiden LMP1/CD40 Mauslinien unabhängig von RelB die MAPK Kinasen ERK und JNK vermehrt in den B-Zellen aktiviert. Unsere Daten weisen darauf hin, dass die vermehrte Translokation von RelB-p50 Heterodimeren in den Kern der jungen LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse zwar zur B-Zellexpansion beiträgt, jedoch die zusätzlich über den LMP1/CD40 aktivierten Signalwege, wie die verstärkte ERK und JNK Aktivität, den entscheidenden Beitrag zur B-Zellexpansion in der Milz liefern.

#### **4.3.2 Die Bedeutung von RelB für den veränderten Phänotyp der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse**

In LMP1/CD40 Mäusen sind vor allem die CD21<sup>hoch</sup>CD23<sup>niedrig</sup> B-Zellen (Marginalzonen B-Zellen) stark expandiert (Hömig-Hölzel et al. 2008). Mäuse mit TRAF2- oder TRAF3-defizienten B-Zellen, in denen auch der nicht-kanonische Signalweg hyperaktiv ist, weisen eine erhöhte Anzahl von Marginalzonen B-Zellen auf (Lin et al. 2015; Gardam et al. 2008). Aktuelle Daten zeigen auch, dass die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen Signalwegs, durch konstitutiv aktives p52, zu deutlich erhöhten Marginalzonen B-Zellzahlen führt (Guo et al. 2007). Auch nach Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen, sind die Marginalzonen B-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen noch immer erhöht. Um die Frage zu klären, ob in den LMP1/CD40 Mäusen die Marginalzonen B-Zellen schon im frühen Stadium expandieren, haben wir die Verteilung von Prä-MZB untersucht und konnten feststellen, dass in LMP1/CD40 Mäusen, unabhängig von RelB, die Expansion schon in den frühen Prä-MZB stattfindet. Unsere Daten deuten somit darauf hin, dass der verstärkt aktive nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen nahezu keine Rolle bei der Marginalzonen B-Zellexpansion spielt. LMP1/CD40 Signale könnten über unterschiedliche Signalwege zur Marginalzonen B-Zellentwicklung beitragen. Es gibt Hinweise in der Literatur darauf, dass neben dem nicht-kanonischen, auch der kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg eine Funktion bei der Entstehung von MZB's hat. Mäuse mit p50 Defizienz weisen kaum noch Marginalzonen B-Zellen auf (Ferguson & Corley 2005; Cariappa et al. 2000). Zusätzlich konnte in Mäusen mit NEMO-defizienten B-Zellen keine Marginalzonen B-Zellen mehr nachgewiesen werden (Sasaki et al. 2006). Des Weiteren zeigte eine *in vivo*

Studie von Moran und seinen Kollegen, dass die Interaktion zwischen Notch2 und p50 während der Entwicklung von MZB-Zellen eine Bedeutung hat (Moran et al. 2007). Das entscheidende Differenzierungssignal für Marginalzonen B-Zellen scheint jedoch Notch2 zu sein. Die B-Zell-spezifische Inaktivierung von Notch2 und seinem Partner RBP-J, führt zu einem gravierenden Verlust von MZB's in Mäusen (Saito et al. 2003; Tanigaki et al. 2002). Zusätzlich konnten wir in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die konstitutive Aktivierung von Notch2 in B-Zellen zu einer Marginalzonen B-Zellexpansion und einer stark vergrößerten Marginalzone in Mäusen führt (Hampel et al. 2011). Ferner ist bekannt, dass allein die Deletion eines Notch2 Allels in Mäusen (Notch2<sup>-/-</sup>) zu einer beeinträchtigten Entwicklung von MZB's führt (Witt et al. 2003). Daher haben wir in den LMP1/CD40 Mäusen mit und ohne RelB die Expression von Notch2 in B-Zellen untersucht und konnten sehen, dass sowohl in den RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen als auch in den LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen, die Notch2 Expression auf der Oberfläche von folliculären B-Zellen erhöht ist. In *in vitro* Experimenten konnten wir zeigen, dass die Stimulation von RelB-defizienten und Kontroll-B-Zellen mit  $\alpha$ -CD40, zur Erhöhung der Notch2 Expression auf der Oberfläche führt. Dies könnte die verstärkte Notch2 Expression in LMP1/CD40 exprimierenden folliculären B-Zellen erklären. Unsere Daten könnten somit darauf hinweisen, dass die LMP1/CD40 Expression zu einer erhöhten Notch2 Expression auf transitionalen B-Zellen führt und dadurch mehr B-Zellen zu MZB's differenzieren. Eventuell werden auch noch folliculäre B-Zellen, die sehr viel Notch2 exprimieren, in Richtung MZB Phänotyp getrieben. Um zu überprüfen, ob der Notch2 Signalweg in LMP1/CD40 exprimierenden FoB's aktiv ist, werden wir in zukünftigen Experimenten die Expression von Notch2-Zielgenen wie HES und DELTEX in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen analysieren.

In LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen war zu beobachten, dass die CD21 Expression neben den Marginalzonen B-Zellen auch auf den folliculären B-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen erhöht war. Nach RelB Deletion in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen war die Expression von CD21 auf den MZB's und FoB's wieder vergleichbar mit denen der Kontrollmäuse. Somit scheint die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen verantwortlich für die erhöhte CD21 Expression auf den B-Zellen zu sein. Dies ist passend zu bereits publizierten Daten, welche zeigen, dass Mäuse mit TRAF2- und TRAF3-defizienten B-Zellen die CD21 Expression durch die verstärkte nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Aktivität auf B-Zellen erhöht ist (Gardam et al. 2008). Marginalzonen B-Zellen exprimieren neben hohem Level von CD21 auch verstärkt CD1d auf der Oberfläche (Cariappa et al. 2001; Sonoda & Stein-Streilein 2002; Pillai et al. 2005). Um zu überprüfen, ob es sich bei der expandierten CD21<sup>hoch</sup>CD23<sup>niedrig</sup> B-Zellpopulation der LMP1/CD40 Mäuse auch um Marginalzonen B-Zellen handelt, wurde die CD1d Expression auf der Oberfläche untersucht. Die CD1d Expression war in LMP1/CD40 Mäusen mit und

ohne RelB im Vergleich zu Kontrollmäusen auf folliculären B-Zellen höher und auf Marginalzonen B-Zellen verringert. Die Tatsache, dass die  $CD21^{\text{hoch}}CD23^{\text{niedrig}}$  B-Zellpopulation verstärkt CD1d im Vergleich zu folliculären ( $CD21^+CD23^+$ ) aufwies, lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich hier auch um Marginalzonen B-Zellen handelt. Wir denken, dass der beobachtete leichte Unterschied in der CD1d Expression auf den folliculären B-Zellen zwischen den LMP1/CD40 Mäusen und Kontrollmäusen daher kommt, dass sich im FACS-Gate der folliculären B-Zellen auch noch Prä-MZB's befinden, welche auch höher in CD1d sind (Srivastava et al. 2005). Des Weiteren könnte die Runterregulation von CD1d auf MZB's der LMP1/CD40 Mäuse daraus resultieren, dass die MZB's ständig durch CD40 aktiviert werden (Allan et al. 2011; Chaudhry & Karadimitris 2014).

#### **4.3.3 Die Bedeutung von RelB für die Lokalisation der B-Zellen der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse in der Milz**

In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen eine starke Akkumulation von B-Zellen in den stark vergrößerten Follikeln auftritt und eine vergleichbar schmale Marginal-B-Zellzone zu detektieren ist, die nicht die massive Expansion der Marginalzonen B-Zellen, die im FACS sichtbar war, widerspiegelt. In  $RelB^{\text{f/f}}//LMP1/CD40//CD19Cre$  Mäusen erscheint die Marginalzone im Vergleich dazu wieder breiter. Die Auswertung der Histologie ergab, dass  $CD1d^+$  Zellen in  $RelB^{\text{f/f}}//LMP1/CD40//CD19Cre$  Mäusen, sich vermehrt in der richtigen Position in der Marginalzone befanden und weniger im Follikel detektierbar waren. Im Gegensatz dazu war in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen die Mehrzahl der  $CD1d^+$  Zellen im Follikel lokalisiert. Dies lässt vermuten, dass die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges verhindert, dass Marginalzonen B-Zellen in die Marginalzone wandern können und diese verstärkt im Follikel zurückgehalten werden. In dem Zusammenhang sollte in zukünftigen Experimenten die Expression von S1PR1 (*sphingosine 1-phosphate receptor*) in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen überprüft werden, ein Rezeptor der eine wichtige Rolle in der Migration und Retention von Marginalzonen B-Zellen spielt (Cinamon et al. 2008; Pillai & Cariappa 2009). Des Weiteren könnte hier spekuliert werden, dass die vermehrt im Follikel gehaltenen Marginalzonen B-Zellen der LMP1/CD40//CD10Cre Mäusen dort ständig und vermehrt in Kontakt mit Notch2 Liganden sind und dies zu einer verstärkten Proliferation der MZB's führt (Thomas et al. 2007). Von Fastnacht und Kollegen wurde durch *in vivo* Studien gezeigt, dass Fibroblasten im Milzfollikel als Nischen für die Expression von DL1 (*delta-like 1*) dienen, der Ligand für den Notch2-Rezeptor (Fastnacht et al. 2014). Diese Daten legen nahe, dass Notch2-exprimierenden B-Zellen im Follikel über DLL-1 stimuliert werden könnten. Die verstärkte Relokalisation der MZB's in der Marginalzone in den  $RelB^{\text{f/f}}//LMP1/CD40//CD10Cre$  Mäusen im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen,

könnte erklären, warum in diesen Mäusen die MZB's weniger stark expandiert sind. Anhand von Transferstudien *in vivo* wurde gezeigt, dass die Prä-Marginalzonen B-Zellen anfänglich im B-Zellfollikel lokalisiert sind (Chung et al. 2002; Fasnacht et al. 2014; Pillai & Cariappa 2009). Diese Daten könnten zusammen mit unseren darauf hindeuten, dass die vermehrten Vorläufer-MZB's der LMP1/CD40 Mäuse unabhängig von RelB in den Follikeln erst vollständig reifen müssen, um sich dann in der Marginalzone lokalisieren zu können und dies aber dann durch die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen verhindert wird. Unterstützt wird unsere Theorie, dass der nicht-kanonische Signalweg für die Positionierung eine Rolle spielt, durch mRNA Expressions-Analysen von NF- $\kappa$ B2-defizienten B-Zellen. So zeigen diese B-Zellen unter anderem eine erniedrigte mRNA Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 (verantwortlich für die Einwanderung der B-Zellen in den Follikel) und des Adhäsionsmoleküls CD62L (vermittelt den Eintritt der Lymphozyten aus dem Blut in sekundäres lymphoides Gewebe) nach BAFF Stimulation (De Silva et al. 2016). Diese Daten weisen darauf hin, dass der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg in B-Zellen ein Genexpressionsprogramm kontrollieren könnte, welches die Einwanderung und Positionierung von B-Zellen innerhalb von B-Zellfollikeln steuert.

#### **4.3.4 Der Einfluss von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen auf das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung *in vitro***

Wir konnten in unserem Labor in früheren Experimenten zeigen, dass LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen *in vitro* unstimuliert besser überlebten als B-Zellen der Kontrolle. In Abwesenheit von RelB überlebten LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen etwas schlechter, jedoch verglichen mit Kontroll-B-Zellen immer noch deutlich besser. Dies deutet darauf hin, dass die verstärkte Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges teilweise eine Rolle für das Überleben der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen spielt. Es gibt Hinweise aus *in vivo* Mausstudien darauf, dass der kanonische und der nicht-kanonische Signalweg über den CD40 Signalweg parallel aktiviert werden, um das verbesserte Überleben der B-Zellen zu gewährleisten (Zarnegar et al. 2004). Auch unsere *in vitro* Daten der RelB-defizienten B-Zellen unterstützen diese Theorie, da auch hier nach exogener  $\alpha$ -CD40 Stimulation das Überleben zwar verbessert werden konnte, aber nicht auf Niveau der Kontroll-B-Zellen. Es zeigte sich des Weiteren auch, dass im Gegensatz zu Kontroll-B-Zellen ein Teil der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen *in vitro* ohne Stimulation proliferierten und dieser Phänotyp durch die Deletion von RelB verstärkt war. Da die RelB-defizienten LMP1/CD40 B-Zellen ein verschlechtertes Überlebenspotenzial zeigen, könnte der erhöhte Anteil von geteilten Zellen daraus resultieren, dass die Zellen, die in der Kultur noch übrig waren, auch die sind, die verstärkt proliferiert haben. Eine weitere Publikation deutet darauf

hin, dass TRAF2-defiziente B-Zellen mit verstärkter Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges verschlechtert nach  $\alpha$ -CD40 Stimulation proliferierten (Grech et al. 2004). Im Gegensatz dazu wurde auch publiziert, dass B-Zellen von NFKB2<sup>-/-</sup> Mäusen leichte proliferative Defekte nach Stimulation mit  $\alpha$ -CD40 besitzen (Jorge H. Caamaño 1998), was jedoch eventuell darauf zurück zu führen ist, dass weder p52 noch RelB in diesen B-Zellen vorhanden sind. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass der kanonische Signalweg für die Proliferation der B-Zellen essentieller ist. C-Rel<sup>-/-</sup> B-Zellen besitzen einen schwerwiegenden Defekt bezüglich der Proliferation nach  $\alpha$ -CD40 Stimulation. Auch p50<sup>-/-</sup> B-Zellen weisen diesen Defekt teilweise auf, wenn auch weniger stark (Kontgen et al. 1995). Unsere Daten deuten darauf hin, dass die verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges einen eher hemmenden Einfluss auf die Proliferation der B-Zellen zu haben scheint.

Der CD40 Signalweg scheint die Differenzierung zu Plasmazellen zu inhibieren (Satpathy et al. 2010). Auch LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen bilden nach Stimulation mit LPS, im Gegensatz zu B-Zellen der Kontrollen, innerhalb von fünf Tagen keine Plasmablasten *in vitro*. Dieser Block in der Plasmablastendifferenzierung konnte durch die Inaktivierung von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen nicht aufgehoben werden. Somit zeigen unsere Daten, dass der konstitutiv aktive CD40 Signalweg unabhängig vom nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg die Plasmablastendifferenzierung *in vitro* inhibiert. Wir konnten jedoch feststellen, dass nach Deletion von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen die CD138 Expression der B-Zellen im Vergleich zu LMP1/CD40 B-Zellen vermehrt hochreguliert ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass frühe Plasmablasten, die schon geringe Antikörper Titer sezernieren, gebildet werden (Jourdan et al. 2009). Um zu überprüfen, ob der Plasmablastendifferenzierungsdefekt, den wir in LMP1/CD40 Mäusen festgestellt haben, einen Effekt auf die basalen zirkulierenden Antikörper im Blut hat, haben wir die Titer für IgM, IgG1 und IgG3 untersucht. Der hyperaktive nicht-kanonische Signalweg in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen scheint teilweise für die reduzierten IgM und IgG3 Titer im Blut verantwortlich zu sein, da nach Deletion von RelB die Titer wieder angestiegen sind, wenn auch nicht auf Kontrollniveau. Die IgG1 Titer hingegen waren in beiden LMP1/CD40 Mäusen unabhängig vom nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg signifikant reduziert, verglichen mit Kontrollmäusen. Marginalzonen B-Zellen tragen zum Pool der basalen Antikörper bei und haben die einzigartige Fähigkeit, in den frühen Stadien der Immunantwort effiziente IgM, IgG1 und IgG3 Antikörper (AK) gegen Antigene zu bilden (Cerutti et al. 2013; Zouali & Richard 2011). Die expandierten MZB's in den LMP1/CD40 Mäusen mit und ohne RelB können jedoch *in vitro* nicht zu Plasmablasten differenzieren. Dieser Differenzierungsdefekt würde die erniedrigten IgG1-Titer *in vivo* im Blut der LMP1/CD40 Mäuse erklären. B1 B-Zellen im Peritoneum spielen eine Rolle bei der frühen Immunantwort und sind in der Lage IgM und IgG3 AK zu sezernieren (Martin & Kearney

2001; Martin & Kearney 2000; Haas et al. 2005; Cerutti et al. 2013). Somit könnte eine mögliche Erklärung für die teilweise angehobenen IgM und IgG3 Titer nach RelB Inaktivierung in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen sein, dass in RelB<sup>f/f</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im Gegensatz zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen wieder B1 B-Zellen im Peritoneum vorhanden sind (Doktorarbeit Stojanovic 2013).

#### **4.3.5 Der hyperaktive nicht-kanonische Signalweg in B-Zellen hat einen Einfluss auf die zirkulierenden B-Zellen im Blut**

Wir konnten in unserem Labor zeigen, dass LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse weniger rezirkulierende B-Zellen im Knochenmark haben und statt dessen weisen sie eine Akkumulation der B-Zellen in den Follikeln der Milz und Lymphknoten auf. Nach der Deletion von RelB in LMP1/CD40 B-Zellen waren wieder vermehrt rezirkulierende B-Zellen im Knochenmark vorhanden, aber weniger B-Zellen im Lymphknoten und in den Follikeln der Milz detektierbar. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen nach Inaktivierung von RelB wieder verstärkt zirkulieren. Diese Hypothese wird durch meine Daten unterstützt, die zeigen, dass im Blut von LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen deutlich weniger B-Zellen als in Kontrollmäusen zu finden sind. Im Gegensatz dazu war in RelB<sup>f/f</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen der prozentuale Anteil von zirkulierenden B-Zellen im Blut wieder auf Kontrollniveau. Unsere Daten zeigen somit, dass die Inaktivierung von RelB zu einer erhöhten Mobilität von B-Zellen führt und lassen daher vermuten, dass eine verstärkte Aktivität des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges zu einer Retention von B-Zellen in den Follikeln der sekundären lymphoiden Organen führt.

#### **4.4 Der verstärkt aktive nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen hat einen Einfluss auf die Entstehung von B-Zelllymphomen in der Milz**

Junge RelB<sup>f/f</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse (< 4 Monate) besitzen im Vergleich zu Kontrollmäusen noch immer eine Splenomegalie und B-Zellexpansion, wobei dieser Phänotyp nach Inaktivierung von RelB weniger stark ausgeprägt ist als in jungen LMP1/CD40 Mäusen mit RelB. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, ist in jungen LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg selektiv verstärkt aktiv. Es wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert, dass gealterte LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse ab einem Alter von über einem Jahr mit einer sehr hohen Inzidenz B-Zelllymphome in der Milz entwickeln (Hömig-Hölzel et al. 2008). Verschiedene Arbeitsgruppen haben weiterhin in den letzten Jahren publiziert, dass dereguliertes RelB

wohl für die Pathogenese verschiedener maligner lymphoider Erkrankungen wie Multiple Myelome oder Hodgkin Lymphome eine Rolle zu spielen scheint. Diese Ergebnisse führten uns zu der Frage, wie sich die Unterschiede im Phänotyp der jungen LMP1/CD40//CD19Cre und RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen auf den B-Zellphänotyp über die Zeit und auf die Entwicklung von Lymphomen in gealterten Mäusen auswirken. Deshalb haben wir im dritten Teil dieser vorliegenden Arbeit in 6-8, 10-12 und > 14 Monate alten Mäusen untersucht: i) ob sich der Phänotyp der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen über die Zeit RelB abhängig verändert ii) welche Bedeutung RelB für die Entstehung von B-Zelltumoren in LMP1/CD40 transgenen Mäusen hat.

#### **4.4.1 Die aberrante CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> B-Zellpopulation in der Milz entwickelt sich nach Deletion von RelB in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen langsamer**

Wir konnten beobachten, dass von jungen LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen bis hin zu Mäusen die älter als 14 Monate waren, die Milzgewichte stetig zugenommen haben und es zu vermehrten B- und/oder T-Zellzahlen kam und dies in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen und Kontrollmäusen nicht auftrat. Zudem hat sich in der Milz der LMP1/CD40 Mäuse mit RelB schon sehr früh, ab 6 Monaten, eine bestimmte B-Zellpopulation entwickelt, die die weiteren B-Zellen wie Marginalzonen B-Zellen und folliculäre B-Zellen über die Zeit kontinuierlich verdrängt hat. Diese aberrante Population war in den Milzen der RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse auch zu detektieren, jedoch mit zwei Unterschieden zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen: i) sie war nicht in allen Mäusen zu beobachten und ii) sie nahm prozentual viel langsamer über die Zeit zu. Demzufolge scheint die ständige Aktivierung des nicht-kanonischen NF-κB Signalweges in B-Zellen die Entwicklung der aberranten Milz-B-Zellpopulation zu beschleunigen. Ferner zeigten unsere FACS-Analysen, dass diese aberrante B-Zellpopulation einen bestimmten Phänotyp annimmt: CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup>B220<sup>niedrig</sup>CD19<sup>hoch</sup>CD43<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>IgM/IgD<sup>variabel</sup>. In der Literatur ist zu finden, dass eine reduzierte CD21 Expression auf der Oberfläche von B-Zellen in Patienten mit systemischen Lupus, Immundefizienz oder Rheuma gefunden wurde (Rakhmanov et al. 2009; Wehr et al. 2004; Isnardi et al. 2010). Bei diesen Patienten findet eine kontinuierliche B-Zellaktivierung statt und dies könnte darauf hinweisen, dass diese B-Zellen diesen aberranten Phänotyp annehmen, weil sie chronisch aktiviert sind. Es wurde auch beschrieben, dass sehr alte Mäuse (zwischen 22-30 Monate) unter anderem eine CD21<sup>niedrig</sup>-CD23<sup>niedrig</sup>-IgM<sup>niedrig</sup> B-Zellpopulation aufweisen, welche zusätzlich aufgrund ihrer Größe, als chronisch aktivierte B-Zellen definiert wurden (Johnson et al. 2002). Dies würde den CD21<sup>niedrig</sup>CD23<sup>-</sup> Phänotyp der aberranten B-Zellpopulation erklären, da LMP1/CD40 exprimierende B-Zellen schon im jungen Alter einen prä-aktivierten Phänotyp aufweisen. Es war uns auch aufgrund der unterschiedlichen IgM/IgD Oberflächenmarkierung nicht möglich,

die aberrante Population eindeutig zu einem bestimmten B-Zellkompartiment zu ordnen. Sie teilt viele Charakteristika mit B1b B-Zellen, wie die  $CD21^{\text{niedrig}}CD23^-$  B220<sup>niedrig</sup>CD19<sup>hoch</sup>CD43<sup>+</sup> Oberflächenmarkierung, jedoch hatten die aberranten B-Zellen nicht in allen Fällen einen IgM<sup>hoch</sup> Phänotyp, ein weiteres Charakteristikum von B1 B-Zellen (Baumgarth 2011; Martin & Kearney 2001; Haas et al. 2005). Der IgM<sup>hoch</sup> Phänotyp war in den meisten Fällen zu beobachten, aber teilweise kam es auch zu einer IgM<sup>int</sup>/IgD<sup>niedrig</sup> Expression. Präblastblasten teilen einige Marker mit B1b B-Zellen, so sind auch sie als B220<sup>niedrig</sup>CD43<sup>+</sup> beschrieben (Tangye 2013).

#### 4.4.2 Die Deletion von RelB in LMP1/CD40 B-Zellen führt zu einer geringeren Tumorzinzidenz *in vivo*

RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse weisen über die Zeit von jungen Mäusen bis hin zu gealterten Mäusen keine Unterschiede in den Milzgewichten und B- oder T-Zellzahlen auf. Anders sieht das Bild, wie bereits beschrieben, bei LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen aus. Hier konnten wir beobachten, dass nach 10-12 Monaten in einigen Mäusen eine Zunahme der Zellzahlen verglichen mit jungen Mäusen zu verzeichnen ist und die aberrante B-Zellpopulation in der Milz prozentual hoch vertreten ist. Meine Southern Blot Analysen gaben Hinweise darauf, dass sowohl LMP1/CD40//CD19Cre als auch RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre in diesem Alter, auch wenn sie positiv für die aberrante B-Zellpopulation in der Milz waren, noch keine detektierbaren mono-oder polyklonale B-Zelllymphome in der Milz entwickelt haben. Im Gegensatz dazu war es uns jedoch möglich in den gealterten, über 14 Monate alten LMP1/CD40 Mäusen mit und ohne RelB durch detektierte Banden im Southern Blot, eine eindeutige Korrelation zwischen Tumorentstehung und Auftreten der aberranten  $CD21^{\text{niedrig}}CD23^-$  B-Zellpopulation in der Milz her zu stellen. Es ist anzunehmen, dass es sich zum Zeitpunkt der 10-12 Monate alten Mäuse, um eine polyklonale Proliferation von Prä-malignen B-Zellen handelte, von denen sich dann ein Klon im Laufe der Zeit durchsetzt und dieser im Southern Blot zu einem späteren Zeitpunkt als monoklonaler Klon detektiert wird. Eine Differenz gab es jedoch bei den gealterten LMP1/CD40 Mäusen (> 14 Monate) bezüglich der Inzidenz von B-Zelllymphomen. So wiesen alle analysierten LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen ab einem Alter von 14 Monaten die aberrante B-Zellpopulation in der Milz und im Blut auf und entwickelten alle monoklonale B-Zelllymphome (100 %). Die RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse im gleichen Alter jedoch, wiesen mit ~50 % zu einem weniger monoklonale B-Zelllymphome auf, wenn sie jedoch welche entwickelten, dann war auch parallel die aberrante B-Zellpopulation in der Milz und im Blut zu detektieren. Demzufolge scheint die  $CD21^{\text{niedrig}}CD23^-$  B-Zellpopulation der LMP1/CD40 Mäuse nicht initial die Tumorzinzidenz zu sein, sich aber im Laufe der Zeit zu der dominanten Tumorzinzidenz zu entwickeln und die verstärkte Translokation von RelB in

den Kern spielt dafür eine treibende Rolle. Diese Hypothese wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass ab 14 Monate alten LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse nur noch diese dominante Population in der Milz im FACS erkennbar ist und keine Marginalzonen und folliculäre B-Zellen mehr, ein Phänomen was auch für eine Tumorphilpopulation spricht. Einen weiteren wichtigen Unterschied gab es noch: so zeigten gealterte RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse, mit und ohne Tumorentstehung, keine weitere Vergrößerung der Milz und keine Veränderung in den Zellzahlen verglichen mit jungen RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und im Gegensatz zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen. Dies könnte darauf hindeuten, dass RelB in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen eine entscheidende Rolle für die Zunahme der Splenomegalie und der Zellzahlen in der Milz spielt. Verschiedene Arbeitsgruppen publizierten in den vergangenen Jahren, dass eine anormale Aktivität von RelB sowohl an der Entwicklung hämatopoetischer Erkrankungen als auch bei der Entstehung solider Tumore beteiligt ist (Baud & Collares 2016). Es wurde gezeigt, dass RelB eine entscheidende Rolle bei der Förderung des Überlebens von multiplen Myelomzellen durch die erhöhte Expression einer Untergruppe von anti-apoptotischen NF-κB-Zielgenen (z. B. cIAP2) spielt (Comier et al. 2013; Roy et al. 2016). Wir konnten auch in unseren Experimenten an jungen LMP1/CD40 Mäusen zeigen, dass B-Zellen nach Deletion von RelB verschlechtert überleben im Vergleich zu den Undeletierten. Somit könnte man spekulieren, dass das längere Überleben der LMP1/CD40 B-Zellen mit RelB ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung von B-Zelllymphomen ist. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Tumorentstehung ist die Tumorumgebung, welche phänotypische und funktionelle Unterschiede an Krebszellen vermittelt (Bissel & Hines 2011; Polyak et al. 2009). Die Tatsache, dass in LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen die Marginalzonen B-Zellen eher an der falschen Stelle im Follikel gehalten werden, könnte für die prä-aktivierten B-Zellen dazu führen, dass sie dort bestimmte Stimuli erhalten, die sie dann zur vermehrten Proliferation anregen. Die weniger starke Expansion der MZB's nach Deletion von RelB in LMP1/CD40 B-Zellen die B-Zellen, liegt wohl an dem Umstand, dass die Marginalzonen B-Zellen auch teilweise wieder an der richtigen Stelle in der Marginalzone sitzen. Unsere Daten sprechen für einen positiven Einfluss des hyperaktiven nicht-kanonischen NF-κB Signalweges für die enorme Milzgewicht- und Zellzahlzunahme in gealterten LMP1/CD40 Mäusen und teilweise für die Entstehung der B-Zelllymphome in der Milz. Dies ist auch im Einklang zu bereits publizierten Daten, welche darauf hin deuten, dass RelB die Pathogenese von malignen Erkrankungen positiv begünstigen kann. In künftigen Experimenten sollte untersucht werden, ob die B-Zellen in der Milz der gealterten (> 14 Monate alten) RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre mit Tumorentwicklung RelB exprimieren. Dies würde bedeuten, dass die in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen detektierten Lymphome, aus LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellklonen ausgewachsen sind, die das RelB-Gen nicht deletiert hatten.

Überraschenderweise führte die B-Zell-spezifische Expression von CD40 unabhängig von RelB neben der B-Zell-expansion auch zu vermehrten T-Zellzahlen ( $CD4^+$  und  $CD8^+$ ) in der Milz der jungen Mäuse. Somit scheint ein konstitutives CD40 Signal in B-Zellen einen indirekten Effekt auf die T-Zell-expansion zu haben. Durch weitere FACS Analysen konnten wir beobachten, dass diese T-Zellen im Vergleich zu Kontroll-T-Zellen einen leicht verstärkt aktivierten Phänotyp aufweisen. LMP1/CD40 B-Zellen exprimieren verstärkt CD80, CD86 und ICOSL auf der Oberfläche, Moleküle die bei der B-Zell-T-Zell Aktivierung beteiligt sind (Mak et al. 2003; Tafuri et al. 2001; Suvas et al. 2002). Demnach könnte es sein, dass die ständige gegenseitige Aktivierung von B- und T-Zellen über die Zeit zur Proliferation und weiteren Aktivierung von B- und T-Zellen führt. Hierfür spricht, dass T-Zellen in gealterten Mäusen hoch aktiviert sind und einen Phänotyp der Effektor T-Zellen / aktivierte T-Zellen annehmen und dadurch keine naiven T-Zellen mehr vorhanden sind. Kearney publizierte 2004, dass Marginalzonen B-Zellen in der Lage sind spezifisch  $CD4^+$  T-Zellen zu aktivieren, damit sie zu Effektor T-Zellen differenzieren (Attanavanich & Kearney 2004). Dies könnte eine Erklärung für die  $CD4^+$  T-Zell-expansion in der Milz der gealterten LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse sein, da die expandierten Marginalzonen B-Zellen im Follikel gehalten werden und somit fortlaufend in Kontakt mit der T-Zellzone stehen.

Ich habe in Kooperation mit der AG Helmut Blum und Andreas Hauser (Genzentrum München) gegen Ende der Doktorarbeit RNAseq Daten von B-Zellen der jungen RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre und LMP1/CD40//CD19Cre (10 Wochen alten Mäusen) generiert. Diese befinden sich aktuell noch in der Auswertung und Beurteilung. Diese Analysen könnten uns Hinweise auf die differentielle Genexpression in den B-Zellen zwischen den beiden transgenen Mauslinien liefern, speziell bezüglich der unterschiedlichen B-Zell-expansion, B-Zellmigration und B-Zellpositionierung im Follikel, welche uns dann natürlich indirekt Erklärungen für die unterschiedliche Entwicklung von B-Zelllymphomen im gealterten Mäusen in der Milz bieten werden.

## 5 Zusammenfassung

Die spezifische Funktion des Transkriptionsfaktors RelB für die Reifung, Differenzierung und das Überleben der B-Zellen war zu Beginn meiner Doktorarbeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Um die Rolle von RelB spezifisch in B-Zellen untersuchen zu können, wurden RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit CD19Cre Mäusen gekreuzt, was zu einem Verlust eines funktionsfähigen RelB-Proteins in B-Zellen führte. Meine Vorgängerin Kristina Stojanovic konnte in ihrer Doktorarbeit im Jahr 2013 zeigen, dass die Deletion von RelB in B-Zellen keinen Einfluss auf die B-Zellentstehung im Knochenmark hat und dass RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse ein tendenziell reduziertes Milzgewicht und weniger B-Zellen in der Milz und Lymphknoten aufweisen. Im ersten Teil meiner Arbeit habe ich untersucht, ob die Reduktion des Milzgewichtes und der B-Zellzahlen in der Milz der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse signifikant ist und welche B-Zellpopulationen genau in den RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu CD19Cre Kontrollmäusen *in vivo* reduziert sind. Ich konnte zeigen, dass in RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäusen verglichen mit CD19Cre Kontrollmäusen, die Milzgewichte und B-Zellzahlen der Milz signifikant reduziert sind. Es waren hauptsächlich die folliculären B-Zellen und zu einem geringeren Maße die Marginalzonen B-Zellen signifikant reduziert. Außerdem waren die unreifen T3 B-Zellen vermindert, was darauf hinwies, dass die Weiterdifferenzierung von unreifen B-Zellen in der Milz nach RelB Deletion beeinträchtigt ist. Dieser Phänotyp der RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre Mäuse könnte durch einen nicht voll funktionsfähigen BAFF-Rezeptor Signalweg ausgelöst sein, da dieser bekannterweise, für die Reifung der B-Zellen und deren Überleben in der Milz eine bedeutende Rolle spielt. Hinweise darauf liefern meine *in vitro* Ergebnisse, welche zeigen, dass das Überleben von RelB-defizienten B-Zellen durch die Stimulation mit BAFF, im Gegensatz zu Kontroll-B-Zellen, nicht verbessert werden kann. Des Weiteren habe ich untersucht, welchen Einfluss die B-Zell-spezifische Deletion von RelB auf die B-Zelldifferenzierung, die B-Zellaktivierung sowie das Überleben von B-Zellen *in vitro* hat. Meine Daten belegen, dass RelB in B-Zellen keine wichtige Funktion für den Klassenwechsel zu IgG1<sup>+</sup> B-Zellen hat, keine Rolle für die Plasmablastendifferenzierung spielt und RelB-defiziente B-Zellen nach  $\alpha$ -CD40 Stimulation vergleichbar wie Kontroll-B-Zellen aktivierbar sind. Ferner konnte das Überleben der deletierten B-Zellen nach  $\alpha$ -CD40 Stimulation verbessert werden, wenn auch nicht so gut wie bei B-Zellen der Kontrolle. Im zweiten Teil meiner Arbeit habe ich analysiert, welche Auswirkungen die Inaktivierung von RelB auf B-Zellen hat, die über ein LMP1/CD40 Fusionsprotein ein chronisch konstitutiv aktives CD40 Signal bekommen. Die Deletion von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen führte dazu, dass die Milzgröße und die Marginalzonen B-Zellexpansion in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen im Vergleich zu LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen signifikant reduziert waren, jedoch im Vergleich zu Kontrollmäusen immer noch signifikant

erhöht waren. Zudem konnte ich zeigen, dass die Marginalzonen B-Zellexpansion der LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne RelB bereits im Prä-Marginalzonen B-Zellstadium beginnt. Obwohl RelB für die Differenzierung und Expansion von Marginalzonen B-Zellen keine Rolle zu spielen scheint, könnte RelB eine wichtige Funktion für die Lokalisierung der MZB's besitzen, da nach dessen Deletion in LMP1/CD40 B-Zellen, die CD1d<sup>+</sup> B-Zellen nicht mehr nahezu nur im Follikel, sondern wieder vermehrt an der richtigen Stelle in der Marginalzone lokalisiert waren. Die CD40 exprimierenden B-Zellen wiesen unabhängig von RelB eine Hochregulation von Notch2 auf der Oberfläche auf. Diese Daten implizieren einen möglichen Zusammenhang zwischen dem CD40 Signalweg und der Notch2 Hochregulation auf der Oberfläche der B-Zellen. Ich konnte des Weiteren durch *in vitro* Experimente zeigen, dass die Deletion von RelB in LMP1/CD40 B-Zellen zu einem tendenziell verschlechterten Überleben der B-Zellen führt. Im dritten Teil meiner Arbeit habe ich untersucht, ob sich der Phänotyp der LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen RelB abhängig über die Zeit verändert und welche Bedeutung RelB für die Entstehung von B-Zelltumoren in der Milz im LMP1/CD40 transgenen Mausmodell hat. In der Milz der LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse hat sich, im Gegensatz zu RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen, schon sehr früh, ab 6 Monaten, eine aberrante B-Zellpopulation entwickelt, welche stetig über die Zeit bis zu gealterten Mäusen (> 14 Monate) prozentual deutlich expandiert ist. In RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen war der Phänotyp verglichen mit LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse im gleichen Alter, generell eher heterogener. Demnach war die dominante aberrante B-Zellpopulation zwar auch in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen detektierbar, jedoch war deren prozentualer Anteil nach Deletion von RelB in LMP1/CD40 exprimierenden B-Zellen geringer und deren Zunahme über die Zeit allgemein viel langsamer. In einem Alter zwischen 10-12 Monaten korrelierte das Auftreten der aberranten B-Zellpopulation in der Milz von LMP1/CD40//CD19Cre und RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen noch nicht mit der Entwicklung von B-Zelllymphomen. Meine Analysen der gealterten, über 14 Monate alten LMP1/CD40 Mäuse mit und ohne RelB ergaben dagegen eine eindeutige Korrelation zwischen Tumorentstehung und dem Auftreten der aberranten B-Zellpopulation in der Milz, was aufweist, dass diese sich zur dominanten Tumorphilpopulation über die Zeit entwickelt. Es gab jedoch einen wichtigen Unterschied, der zeigt, dass RelB zumindest teilweise in die Tumorentstehung der LMP1/CD40 Mäuse involviert zu sein scheint: die Tumorzinzidenz von 100 % bei LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen konnte auf 50 % bei RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäusen reduziert werden und die Tumorexpansion war deutlich erniedrigt.

## 6 Summary

At the beginning of my thesis, the specific function of the transcription factor RelB for the maturation, differentiation and the survival of B cells had not yet been fully clarified. In order to analyze the role of RelB specifically in B cells, RelB<sup>fl/fl</sup> mice were cross-bred with CD19Cre mice to achieve a loss of functional RelB protein in B cells. My predecessor Kristina Stojanovic demonstrated in her doctoral thesis in 2013, that the deletion of RelB in B cells had no effect on B cell development in the bone marrow and RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre mice tend to display reduced splenic weight and have fewer B cells in the spleen and lymphnodes. In the first part of my thesis, I analyzed whether the reduction of the splenic weight and B cell numbers detected in the spleen of RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre mice is significant and which B cell populations were mainly affected *in vivo*. I was able to show, that in RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre mice both the splenic weight and the B cell numbers were reduced significantly compared to CD19Cre mice. Predominantly, the follicular B cells and to a lesser extent the marginal zone B cells were reduced in RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre mice. Furthermore, the immature T3 B cells decreased, which indicated an impairment of the further development of immature B cells in the spleen after deletion of RelB. The phenotype of the RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre mice may be caused by a not fully functional BAFF receptor signaling pathway in B cells, as it is known to play an important role for the maturation and survival of B cells in the spleen. My *in vitro* experiments provide first indications for this assumption, due to the fact that the survival of RelB deficient B cells in contrast to control B cells could not be improved upon BAFF stimulation. Furthermore, I investigated the effect of the B-cell-specific deletion of RelB on B cell differentiation, B cell activation and the survival of B cells *in vitro*. My data show, that RelB has no essential function in B cells for class switching, differentiation to plasmablasts and upon  $\alpha$ -CD40 stimulation RelB deficient B cells could be activated comparable to control B cells. Besides, the survival of the RelB deleted B cells after  $\alpha$ -CD40 stimulation could be improved, but not as well as in control B cells. In the second part of my work, I analyzed the effects of the inactivation of RelB on B cells, which are given a chronic constitutive CD40 signal via a LMP1/CD40 fusion protein. In comparison to LMP1/CD40//CD19Cre mice, the deletion of RelB in LMP1/CD40 expressing B cells led in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre mice to a significant reduction of the splenic weight and marginal zone B cell expansion but compared to control mice both was still significantly increased. In addition, I was able to demonstrate, that the marginal zone B cell expansion of LMP1/CD40 mice with and without RelB already started at the pre-marginal zone B cell stage. While RelB did not appear to play a role in the differentiation and expansion of marginal zone B cells, it might have an important function for the localization of B cells, since after its deletion in LMP1/CD40 expressing B cells most of the CD1d<sup>+</sup> B cells were correctly located within the marginal zone.

Independently of RelB, the CD40 expressing B cells display an upregulation of Notch2 on the surface. These data imply a possible correlation in B cells between the CD40 signaling pathway and Notch2 upregulation on the surface. By *in vitro* experiments I could point out, RelB deletion in LMP1/CD40 expressing B cells has tended to deteriorate the survival of B cells. In the third part of my thesis, I observed whether the phenotype of LMP1/CD40 expressing B cells changed over time depending on RelB and what significance RelB had for the development of B cell lymphomas in the spleen of the LMP1/CD40 transgenic mouse model. In the spleen of the LMP1/CD40//CD19Cre mice in contrast to RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre mice, an aberrant B cell population had developed early, starting from 6 months, which steadily expanded over time. Generally, the phenotype of RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre mice in comparison to LMP1/CD40//CD19Cre mice at the same age was rather more heterogeneous. Therefore, the dominant aberrant B cell population was also detectable in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre mice, but the percentage was lower and their increase was generally much slower over time. At the age of 10-12 months, the occurrence of the aberrant B cell population in the spleen of RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre and LMP1/CD40//CD19Cre mice did not yet correlate with the development of B cell lymphomas in the spleen. My analysis of 14 months old LMP1/CD40 mice with and without RelB resulted in a clear correlation between tumor formation and the occurrence of the aberrant B cell population in the spleen, which indicated, that it develops into the dominant tumor population over time. However, there was an important difference showing that RelB seems to be partly involved in the tumor development of LMP1/CD40//CD19Cre mice: the tumor incidence of 100 % in LMP1/CD40//CD19Cre mice could be reduced up to 50 % in RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre mice and the lymphomas expanded less.

## 7 Material

### 7.1 Mausstämme (BALB/c Hintergrund)

**A) CD19Cre:** Übertragung des P1 Phagen-abgeleiteten Cre/loxP Systems auf Mäuse, um bestimmte Gene zu deletieren. Um selektiv Gene in B-Lymphozyten modifizieren zu können, wurden Mäuse generiert, bei denen die Cre-Rekombinase unter der Transkriptionskontrolle des B-Zell-spezifischen CD19-Promotors steht. Durch die Kreuzung der CD19Cre Mäuse mit Mäusen, welche ein loxP-flankiertes Gen tragen, kommt es zu einer 75-80 %-igen Deletion des flankierten Gens im Knochenmark und das Maximum von 90-95 % wird in der Peripherie erreicht (Rickert et al. 1997).

**B) RelB<sup>fl/fl</sup>:** Der Mausstamm wurde uns von Falk Weih zur Verfügung gestellt (Fritz-Lippmann Institut, Jena). Bei diesen Mäusen wurde das Exon 4 des RelB Gens 3' und 5' mit loxP-Stellen flankiert. Das Exon 4 codiert den Beginn der Rel homologen Domäne (Weih et al. 1995). In Anwesenheit der Cre-Rekombinase kommt es zur Exzision von Exon 4, dies führt zu einer Leserasterverschiebung und schlussendlich zum Verlust eines funktionsfähigen RelB-Proteins.

**C) LMP1/CD40<sup>fl/stop</sup>:** Bei diesem Mausstamm wurde das Transgen, das aus der Transmembrandomäne von LMP1 und des intrazellulären Teil des CD40-Rezeptors besteht, in den *rosa26*-Lokus eingebracht. Eine durch loxP-Stellen flankierte Stopp-Kassette wurde vor das Transgen inseriert. Durch die Verpaarung mit CD19Cre Mäusen, wird die Stopp-Kassette entfernt und ein ligandenunabhängiges CD40 Signal spezifisch in B-Zellen exprimiert (Hömig-Hölzel et al. 2008).

**D) RelB<sup>fl/fl</sup>// LMP1/CD40<sup>fl/stop</sup>:** Für diesen Mausstamm wurden die RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit den LMP1/CD40<sup>fl/stop</sup> Mäusen gekreuzt, um nach Verpaarung mit CD19Cre Mäusen ein ligandenunabhängiges CD40 Signal und den Knockout von RelB spezifisch in B-Zellen zu erhalten.

**E) BALB/c (Charles River Laboratories):** Diese Mäuse wurden für die Erhaltungszuchten verwendet.

### 7.2 Genotypisierung der Mäuse

Die für die Genotypisierungs-PCR's benötigte Taq (*Thermus aquaticus*) DNS-Polymerase (inklusive Taq-Puffer) und Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) wurde von New England Biolabs, die

dNTP's (Desoxyribonukleosidtriphosphate) von Invitrogen, die Oligonukleotide von Metabion (Martinsried) und DMSO von Sigma-Aldrich bezogen.

**Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für die Genotypisierung der transgenen Mäuse.**

Oligonukleotid	5' -> 3' Sequenz
RELB-GT1	AGG TTG ATG GTA ACT TTG
RELB-B8	GTT TTC CCT GCT TGG TTC
RELB-B1	TCC AAA ACC AAA CCA
Cre7	TCA GCT ACA CCA GAG ACG G
CD19c	AAC CAG TCA ACA CCC TTC C
CD19d	CCA GAC TAG ATA CAG ACC AG
LMP1	AGG AGC CCT CCT TGT CCT CTA
CD40	CTG AGA TGC GAC TCT CTT TGC CAT
Rosa60	CTC TCC CAA AGT CGC TCT G
Rosa62	TAC TCC GAG GCG GAT CAC AAG C

## 7.3 Antikörper

### 7.3.2 Primäre Antikörper für die Western Blot Analysen

**Tabelle 5: Eingesetzte primäre Antikörper für die Western Blot Analysen.**

Antigen	Hersteller	Quelle	Verdünnung	Lösung (4 ml)
RelB	#4954S Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
p100/p52	#4882S Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
GAPDH	#CB1001 Calbiochem	Maus	1:10000	TBST, 5 % (w/v) BSA
Tubulin	#2148S Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA

Das Epitop des RelB Antikörpers von Cell Signaling liegt im Bereich des Serin 424 des RelB Proteins (C-terminales Ende: RelB Transaktivierungsdomäne).

Der Notch2 Antikörper (C651.6DbHN aus der Ratte) wurde von Dr. Artavanis-Tsakonas entwickelt und von der *Developmental Studies Hybridoma Bank* (Universität von Iowa) bezogen. Er wurde in einem 1:2 Verhältnis eingesetzt und in TBS mit 5 % Milchpulver verdünnt.

### 7.3.2 Sekundäre Antikörper für die Western Blot Analysen

Alle eingesetzten sekundären Antikörper waren an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt.

**Tabelle 6: Eingesetzte sekundäre Antikörper für die Western Blot Analysen.**

Antigen	Hersteller	Quelle	Verdünnung
α-Maus-IgG	#7076S Cell Signaling	Pferd	1:2000
α-Kaninchen-IgG	#7074S Cell Signaling	Ziege	1:2000
α-Ratte-IgG	#SC-2006 Santa Cruz	Ziege	1:2000

Die sekundären Antikörper wurden in TBST mit 5 % (w/v) Milchpulver verdünnt. Ausnahme der  $\alpha$ -Ratte-IgG Antikörper, er wurde in TBS und 5 % (w/v) Milchpulver verdünnt.

### 7.3.3 Antikörper für die FACS-Analysen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden folgende Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (FITC, PE, APC oder PerCP) von BD Bioscience verwendet: B220, CD1d, CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD21, CD23, CD43, CD44, CD62L, CD69, CD80, CD95, CD138, IgM, IgD, IgG1, ICAM und eBioscience: AA4.1, ICOS-L und BioLegend: Notch2.

### 7.3.4 Antikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Histologie.

Antigen	Hersteller	Quelle	Kopplung	Verdünnung
Maus-MOMA-1	#T-2011 BMA	Ratte	-	1:1000
Maus-CD3	E. Kremmer	Ratte	-	1:2
Anti-Ratte IgG2	#212060168 Jackson	Maus	Biotin	1:250
Maus-IgM	#A8786 Sigma-Aldrich	Ziege	Peroxidase	1:1000
Streptavidin	#S2890 Sigma-Aldrich	-	Alkaline-Phosphatase	1:400
Maus-CD1d	#553844 BD	Ratte	Biotin	1:50
Streptavidin	#S11227 Invitrogen	-	Alexa Fluor 594	1:200
Anti-Ratte	#112545167 Jackson	Ziege	Alexa Fluor 488	1:100

Die Antikörper wurden in PBS mit 1 % BSA verdünnt.

### 7.3.5 Antikörper für ELISA

- IgM, IgG1, IgG3: BD Bioscience
- Biotinylierte (Bio) sekundäre Antikörper: IgM-Bio, IgG1-Bio, IgG3-Bio: BD Bioscience
- Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase: Fa. Vector (#A2004)

## 7.4 *in vitro* Stimulationen

Tabelle 8: Genutzte Reagenzien für die *in vitro* Stimulation der B-Zellen.

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
CD40L HM40-3	#16040285 eBioscience	2,5 $\mu$ g/ml
BAFF	#2106-BF R&D Systems	50 $\mu$ g/ml
LPS	#L1887 Sigma-Aldrich	50 $\mu$ g/ml
IL4	#I1020 Sigma-Aldrich	15 ng/ml

Für die Herstellung des Zell-Mediums für die Präparation von Zellen und *in vitro* Kulturen wurde folgendes benötigt: RPMI-Medium 1640 (PAA Laboratories); 1 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (Fötales Kälberserum; PAA Laboratories Lot No: A10106-1406) für Präparation von Zellen (= 1 % Zell-Medium) und 10 % (v/v) für die *in vitro* Kulturen (= 10 % Zell-Medium); 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 50 µM β-Mercaptoethanol und 1 x nicht-essentielle Aminosäuren (alles von Gibco).

## 7.5 Materialien für die Southern Blot Analyse

Die 1,6 kB große IgH Sonde besteht aus einem komplementären Stück zu der Sequenz zwischen den J4 und E $\mu$ -Segmenten des IgH-Genlokus. Mit Hilfe der Enzyme NaeI und EcoRI wurde die Sequenz aus dem Lokus isoliert und in einen *Bluescript* Vektor kloniert. Durch den Einsatz von EcoRI und HindIII (Fermentas) war es möglich die Sonde aus dem Vektor heraus zu schneiden (Gao et al. 2000). Für den EcoRI Verdau der genomischen DNS wurden folgende Materialien verwendet.

**Tabelle 9: Materialien für den EcoRI Verdau der genomischen DNS.**

Produkt	Hersteller
100 x BSA	NEB BioLabs (B9001S)
0,1 M Spermidin	Sigma-Aldrich (05292)
100 mM DTT	Promega (P117A)
10 mg/ml RNase	Thermo Scientific (EN0531)
100 U/µl EcoRI	Thermo Scientific (ER0273)
Puffer	Thermo Scientific
H <sub>2</sub> O	steril

Für die Markierung der Sonde wurde das Amersham<sup>TM</sup> Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare; RPN1633) und die Amersham<sup>TM</sup> Ready-to-go DNA Labeling Beads (GE Healthcare; 27-9240-01) unter Einsatz von radioaktivem <sup>32</sup>P dCTP verwendet. Zur Aufreinigung der hoch radioaktiven Sonde, wurden Sephadex<sup>TM</sup> G-50 Säulen eingesetzt (GE Healthcare; 17-0855-02).

Bei der Membran handelt es sich um eine positiv geladene Nylon Membran (Millipore, Immobilon-Ny+, INYC00010), speziell für DNS-Blotting-Verfahren. Zur Hybridisierung der Membran wurde sonifizierte Lachssperma-DNS (10mg/ml; Endkonzentration 250 µg/ml) von Sigma-Aldrich (D9156-5ML) verwendet.

## 7.6 Verbrauchsmaterial

Wenn im Methodenteil nicht anders vermerkt, wurden die eingesetzten Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen: Becton-Dickinson, BioRad, Eppendorf, GE-Healthcare, Nunc und Sigma-Aldrich bezogen.

## 7.7 Geräte

FACS Calibur (Becton-Dickinson), Zentrifugen (Eppendorf, Hettich), Vortexer Genie (Bender&Hobein), Lichtmikroskop (Axioskop mit AxioCam, Zeiss), Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, mit AxioCam, Zeiss), Brutschrank (Binder), Falcon Roller (Coulter Electronics Limited), Gefrierschrank -20°C (Liebherr), Gefrierschrank -80°C (Colera), Kühlschranks +4°C (Liebherr), Sterilbank (Bio Flow Technik), Western Blot Apparatur (BioRad), Spektrometer (Eppendorf), Elektrophoresekammer (Biometra, BioRad), PCR-Thermocycler (Biometra), Netzgerät (BioRad), ElisaReader (Tecan-Sunrise), Cryostat (Leica), Millipore-Anlage (Millipore), pH-Meßgerät (Knick), Nanodrop (PeqLab), Neubauer Zählkammer (GLW), Pipetten (Eppendorf), Pipettierhilfe (Integra), Wärmeofen (Thermo Scientific), Thermometer (Carl Roth), Schüttler (Eppendorf).

## 7.8 Software

FlowJo (FACS-Analysen), GraphPad Prism 6 (Statistik und Graphiken), Microsoft Office 1997-2003 (Schreiben der Arbeit), Adobe Illustrator CS6 (Abbildungen), Adobe Photoshop CS6 (Mikroskopie Bilder aufbereiten), Axio Vision Zeiss (Mikroskopie Bilder anfertigen), Epson Scanner Programm (Western und Southern Blot einscannen), Mendeley (Literaturverzeichnis).

# 8 Methoden

## 8.1 Die Analyse der transgenen Mäuse

### 8.1.1 Die Mauszuchten

RelB<sup>fl/fl</sup> beziehungsweise LMP1/CD40<sup>fl/stop</sup> Mäuse wurden mit CD19Cre Mäusen verpaart um RelB<sup>fl/fl</sup>//CD19Cre oder LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse zu erhalten. Die LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse wurden mit RelB<sup>fl/fl</sup> Mäusen verpaart um RelB<sup>fl/fl</sup>//LMP1/CD40//CD19Cre Mäuse zu bekommen. Die CD19Cre Mäuse dienten als

Kontrollmäuse. Die Mäuse wurden je nach Experiment in einem Alter von 8-16 Wochen, 6-8 Monate, 10-12 Monate oder 14-17 Monate analysiert. Die Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen in offenen Käfigen gehalten. Alle Experimente wurden unter der Aufsicht der Regierung von Oberbayern und unter strengster Einhaltung der aktuellen deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt.

### **8.1.2 Präparation primärer Lymphozyten aus der Maus**

Die Analysemäuse wurden unter Einsatz von CO<sub>2</sub> euthanasiert, gleich anschließend die benötigten Organe präpariert und diese bis zur anschließenden Aufbereitung in 1 % Zell-Medium auf Eis gehalten. Falls für die Untersuchung Blut benötigt wurde, so wurde dies zuerst entnommen. Dies wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette direkt aus dem Herzen entnommen und entweder für die Gewinnung von Serum auf Eis inkubiert oder für die FACS-Analyse direkt in ein 10 x Volumen aus PBS/ 1 % 0,5 mM EDTA gegeben. Milz und Lymphknoten wurden als Ganzes entnommen und durch ein feines Sieb (70 µm, Becton Dickinson) gedrückt, um die Zellen aus dem Gewebeverbund zu lösen. Bei Blut und blutreichem Gewebe wie der Milz führte man anschließend eine Erythrozyten-Lyse durch. Dafür wurden die Zellsuspensionen für 10 Minuten, bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert (Rotanta 460R, Hettich-Zentrifuge) und das Pellet in 1 ml Lyse-Puffer (1 x RBC Lysis Buffer, eBioscience) aufgenommen. Nachdem das Ganze für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurde die Lyse durch Zugabe von Medium gestoppt, erneut wie beschrieben zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1 % Zell-Medium vorsichtig aufgenommen. Auch die Zellen wurden während der gesamten Analyse, bis auf die Erythrozyten-Lyse, auf Eis gehalten.

### **8.1.3 Bestimmung der Zellzahlen**

Für die Bestimmung der Zellzahlen wurden 10 µl der Zellsuspensionen der verschiedenen Organe entnommen und 1:10 oder 1:100 Verdünnungen hergestellt. 10 µl der Verdünnung wurde dann auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zählung unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axio mit Phasenkontrast) durchgeführt. Es wurden in zwei bis vier Großquadranten die hellen, großen Zellen ausgezählt. Der Mittelwert der gezählten Zellen aus den Großquadranten wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem Zählkammerfaktor von 10<sup>4</sup> multipliziert.

#### **8.1.4 Isolierung von B-Zellen aus der Milz**

Die Isolierung der B-Zellen aus der Milz erfolgte durch CD43<sup>-</sup> Depletion und magnetische Separation. Dafür wurde das *Mouse CD43 (Ly-48) MicroBeads Set* (Milteny Biotec) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurden pro 10<sup>7</sup> Milzzellen 10 µl des Antikörpercocktails dazugegeben. Die CD43 Antikörper, welche an magnetische Beads gekoppelt waren, binden nur an CD43<sup>+</sup> Zellen. Nach 20 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit MACS-Puffer (Milteny Biotec) gewaschen und nach Zentrifugation in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen und anschließend im Magnetfeld über Separationssäulen gegeben. Somit konnten die CD43<sup>-</sup> B-Zellen die Separationssäulen passieren und alle gelabelten „nicht-B-Zellen“ verblieben in der Säule. Die Reinheit der B-Zellisolation lag bei 95-98 %.

#### **8.1.5 Präparation von Blutserum**

Den getöteten Mäusen wurde aus dem Herzen Blut entnommen und dieses für die Gewinnung der Seren für mindestens 3 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurde es bei 4°C für 15 Minuten und 15.000 x g (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde entnommen und der Zentrifugationsschritt zweimal wiederholt um die Überreste aus dem Serum gründlich zu entfernen. Bis zur Verwendung wurde das Serum bei -80°C gelagert.

#### **8.1.6 Der ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

Die Konzentration sezernierter Antikörper eines bestimmten Immunglobulin-Isotyps kann mit Hilfe des ELISA's im Serum bestimmt werden. Dazu wurden die bei -80°C gelagerten Seren kurz vor der Durchführung auf Eis aufgetaut. Am Vortag wurden Maxisorb 96-Loch Platten (Nunc) mit 5 µg/ml der Ig-Isotyp-spezifischen Ratte-anti-Maus Antikörper (IgM, IgG1 oder IgG3, von BD Bioscience) in 0,1 N NaHCO<sub>3</sub> Puffer (pH 9,2) beschichtet und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 3 mal mit PBS gewaschen und danach mit Blockingpuffer (1 % Milchpulver in Phosphat-gepufferte Salzlösung) für 30 Minuten inkubiert um unspezifische Bindungsstellen ab zu sättigen. Die Seren wurden mit Blockingpuffer verdünnt und in die Platten pipettiert und zusätzlich ein Ig-spezifischer Standard mit bekannter Konzentration auf jede Platte gegeben. Nach einer Stunde erfolgten drei Waschschrte mit PBS und danach die Zugabe des, je nach Isotyp, biotinylierten sekundären Antikörpers (IgM-Bio, IgG1-Bio, IgG3-Bio). Es kam nach einer Stunde wieder zu drei Waschschrten und anschließend wurde die Streptavidin-gekoppelte alkalische

Phosphatase zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten und dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion der gebundenen Phosphatase durch die Zugabe von o-Phenyldimine in 0,1 M Zitronensäure-Puffer mit 0,015 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches als Substrat für die Reaktion agiert. Die erfolgte Farbreaktion wurde mit dem Mikrotiterplatten-Leser (Tecan) bei 450 nm gemessen.

### **8.1.7 Die Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)**

Alle FACS-Analysen wurden mit dem FACS Calibur (BD-Bioscience) durchgeführt und die Ergebnisse mit Hilfe der FlowJo Software ausgewertet. Für die Auswertung wurde entweder auf TOPRO-3 negative Zellen (lebende Zellen) oder lebende Lymphozyten (Lymphozytengate) vorgegattet. Für die FACS-Analysen wurden  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen (Milz-Lymphknoten- oder auch Knochenmarkszellen) pro Loch in eine FACS-Platte gegeben und mit MACS-Puffer gewaschen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Danach wurden die Zellen mit den jeweiligen Antikörpern (verdünnt in MACS-Puffer) für 20 Minuten bei 4°C gefärbt und anschließend noch weitere 2 Mal mit MACS-Puffer gewaschen. Je nach Experiment wurden die Zellen zusätzlich für wenige Minuten vor der Messung mit TOPRO-3 (Endverdünnung 1:40.000, Molecular Probes) gefärbt, um tote Zellen anzufärben und diese in der Auswertung ausschließen zu können.

#### **8.1.7.1 Durchflusszytometrie von Blutzellen**

Ist es für die Analyse erforderlich Blutzellen durchflusszytometrisch zu untersuchen, sollte dies als erster Schritt, noch vor der Präparation der anderen Organe durchgeführt werden. Dafür entnimmt man mit Hilfe einer Pipette ungefähr 100-300 µl Blut (für 3-4 Färbungen) aus dem Herzen der euthanasierten Mäuse und pipettiert diese in ein vorbereitetes Gefäß mit dem 10x Volumen eines PBS/EDTA Gemisches (PBS, 5 µM EDTA). Kurz schwenken und bis zum weiteren Verfahren auf Eis inkubieren. Es erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 4°C für 6 min: i) für 15 ml Falkons 1200 rpm in der großen Zentrifuge ii) für Eppendorf-Gefäße 2000 rpm in der Tischzentrifuge. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird für die Erythrozyten-Lyse in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 3 min bei RT inkubiert. Sollte bei der Analyse mehr als 300 µl Blut entnommen worden sein, sollten die Zellen besser mit 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer lysiert werden. Dieser Lyse-Schritt wird mindestens einmal wiederholt, bis das Pellet weißlich gefärbt ist. Anschließend wird die Lysereaktion mit 10 ml MACS-Puffer abgestoppt und das Falcon erneut bei 1200 rpm, bei 4°C für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wird abermals verworfen und das Pellet mit den Blutzellen in 500 µl 1 % B-Zell-Medium aufgenommen und die Zellen für die FACS-Analyse ausplattiert und wie unter Punkt 8.1.7 beschrieben, gefärbt und analysiert.

## 8.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilwerkbank und mit sterilen Pipetten und Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Für die Kultivierung wurden  $3 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen/100  $\mu$ l von den B-Zellen aus der Milz in je ein Loch einer 96-Loch Platten (Rundboden, Nunc) pipettiert und mit Deckel im Brutschrank (Binder) bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 10 % Zell-Medium und je nach Experiment wurden diesem noch zusätzliche Stimuli oder Reagenzien zugegeben. Die Zellen wurden, falls nicht anders beschrieben, bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich Zentrifugen) und die für die Waschschrte wurde steriles PBS verwendet.

### 8.2.1 Überlebensexperimente und Stimulation der B-Zellen *in vitro*

Zur Langzeituntersuchung des Überlebens oder zur Untersuchung des Aktivierungspotentials, wurden  $5 \times 10^5$  B-Zellen in 100  $\mu$ l 10 % Zellmedium plus 100  $\mu$ l Stimulus (verdünnt in 10 % Zell-Medium) in je ein Loch der 96-Loch Platte ausplattiert. Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von  $\alpha$ -CD40 (2,5  $\mu$ g/ml; HM40-3; eBioscience) oder BAFF (50  $\mu$ g/ml; R&D). Um die Plasmazelldifferenzierung der B-Zellen zu untersuchen, wurde dem 10 % Zell-Medium Medium LPS (Lipopolysaccharid, Stock: 20 mg/ml; Endkonzentration: 50  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) zugegeben. Für die Analyse des Klassenwechsels der B-Zellen, wurde dem 10 % Zell-Medium LPS und IL4 (Interleukin 4; Stock: 10  $\mu$ g/ml; Endkonzentration: 15 ng/ml, Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Die Platten wurden je nach Experiment für 3 oder 5 Tage kultiviert. Zur Kontrolle wurden parallel  $5 \times 10^5$  B-Zellen pro Loch in 200  $\mu$ l 10 % Zell-Medium ohne Stimulation mit kultiviert.

### 8.2.2 Proliferationsassay der B-Zellen *in vitro*

Durch die Markierung der Milz-B-Zellen mit CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate N-Succinimidyl Ester; 5  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) war es möglich, die Proliferationsrate nach 5 Tagen in Kultur zu bestimmen. Nach dem Zelleintritt, wird CFSE durch intrazelluläre Esterasen in die fluoreszierende Verbindung gespalten und nach jeder Teilung wird die Fluoreszenzintensität jeder Tochterzelle halbiert. Für die Markierung mit CFSE, wurden die B-Zellen zuerst zweimal mit reinem RPMI-Medium (ohne Zusätze) gewaschen und anschließend für 5 Minuten bei 37°C mit 5  $\mu$ M CFSE (verdünnt in reinem RPMI-Medium) inkubiert. Danach wurde eiskaltes 10 %-iges Zell-Medium auf die Zellen gegeben, um die Reaktion zu stoppen und anschließend wurden die Zellen zentrifugiert. Der Waschschrte

wurde 2 Mal wiederholt um CFSE Reste gründlich weg zu waschen. Die gefärbten B-Zellen wurden in 10 % Zell-Medium aufgenommen,  $5 \times 10^5$  B-Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte ausplattiert und für 5 Tage bei 37°C kultiviert.

### **8.3 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Stücke der Milz wurden direkt nach der Präparation in Tissue Tek (Sakura) eingebettet, auf Trockeneis durchgefroren und dann bei -80°C gelagert. Die 7-8 µm dicken Milzschnitte wurden mit Hilfe eines Cryotoms (Leica) angefertigt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am folgenden Tag wurden die Schnitte für 10 Minuten in reinem Aceton fixiert und erneut für 5 Minuten getrocknet. Die Schnitte wurden dann nach einer 5-minütigen Rehydrierung durch PBS mit einem Blocking-Kit (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories) nach Angaben des Herstellers behandelt, um unspezifische Bindungsstellen ab zu decken. Für die enzymatische Färbung der Schnitte wurden diese nach dem Blocking Schritt mit den verschiedenen Antikörpern für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Färbeschritt wurden die Schnitte jeweils 3 Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nach dem 3. und letzten Waschschrift erfolgte die Entwicklung der Antikörper. Streptavidin gekoppelte Antikörper (SA-AP) entwickelten mit Hilfe des Alkalische Phosphatase Substrat Kit III (Vector Laboratories) eine blaue Färbung. Dieses Prinzip beruht darauf, dass bei dem SA-AP Antikörper Streptavidin an das Enzym Alkaline Phosphatase gekoppelt wurde und durch Zugabe des Substrats (Kit) setzt das Enzym das Substrat um und die Reaktion resultiert in einer Blaufärbung. Peroxidase gekoppelte Antikörper jedoch, entwickeln unter Einsatz des Peroxidase Substrat Kit (Vector Laboratories) eine rote Färbung. Die Peroxidase ist ein Enzym, welches die Umsetzung von Peroxiden (Wasserstoffperoxid) katalysiert. Die Farbreaktion wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und dann mit PBS abgestoppt. Die gefärbten Schnitte wurden getrocknet, mit Kaiser's Gelantine von Merck eingebettet und kann bei Raumtemperatur gelagert werden. Die angefertigten Präparate können dann unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert werden. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte für jeweils 60 Minuten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern im Dunkeln inkubiert und zwischen jedem Färbeschritt 3 Mal für 5 Minuten im Dunkeln mit PBS gewaschen. Die Einbettung der Schnitte erfolgte mit ProLong Gold (Life Technologies) und diese wurden direkt nach der Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

## 8.4 Molekularbiologische Methoden

### 8.4.1 Genotypisierung der Mäuse

#### 8.4.1.1 DNS Isolierung aus Mäuseohren

Für die DNS Isolierung wurde ein kleines Stück des Öhrchens der Mäuse über Nacht in 500 µl Lysepuffer (100 mM Tris/HCL pH = 8; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 200 mM NaCl; 100 µg/ml Proteinase K) bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag gab man 170 µl einer gesättigten NaCl-Lösung dazu um die Proteine zu fällen und nach kurzem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde bei 4°C für 10 Minuten bei 15.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 500 µl 100 %-igem Isopropanol gefülltes neues Reaktionsgefäß gegossen zur Fällung der DNS. Nach mehrmaligem, gutem Invertieren des Gefäßes wurde wieder zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet, bestehend aus der DNS, wurde für 30 Minuten bei 37°C getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris pH = 7,9; 1 mM EDTA) aufgenommen und für 1-2 Stunden bei 37°C unter Schütteln gelöst.

#### 8.1.1.2 Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die isolierte, genomische DNS aus Schritt 8.1.1.1 wurde für die Genotypisierung der transgenen Mäuse mit Hilfe der PCR eingesetzt. Für jede Genotypisierung wurde ein spezielles Primerpaar generiert (Punkt 7.2), mit einer finalen Konzentration von 0,1-0,5 µM. Die finale Konzentration von Magnesium (und falls nötig DMSO) betrug zwischen 1,5 und 2 mM. Für die dNTP's wurde eine finale Konzentration von 200 µM angesetzt. Das PCR Programm wurde an das gewählte Primerpaar angepasst.

**Tabelle 10: PCR Ansatz für jeweils eine Reaktion. WT = Wildtyp.**

PCR Ansätze (50 µl)				
	RelB	LMP1/CD40	CD19Cre	Rosa WT
DNS: 5-10 ng	1 µl	1 µl	1 µl	1,5 µl
Primer (100 µM)	0,5 µl	0,1 µl	0,25 µl	0,1 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl	1 µl	1 µl	1,5 µl
DMSO (100 %)	1 µl	-	-	0,25 µl
Taq-Puffer (10x)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µL)	0,15 µl	0,15 µl	0,15 µl	0,15 µl
Wasser (dH <sub>2</sub> O)	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl

**Tabelle 11: PCR-Programme.** WT = Wildtyp.

PCR Programme								
	RelB		LMP1/CD40		CD19Cre		Rosa WT	
Initialisierung	4'	95°	5'	95°	2'30''	95°	3'	95°
Denaturierung	45''	94°	45''	95°	45''	94°	45''	95°
Hybridisierung	45''	58°	45''	55°	45''	59°	45''	58°
Elongation	45''	72°	75''	72°	2'	72°	1'	72°
Finale Elongation	10'	72°	10'	72°	10'	72°	10'	72°
Zyklen	35		31		29		33	
PCR-Produkt (Basenpaare)	Gefloxt: 270 WT: 230		650		WT: 500 und Spezial: 700		200	

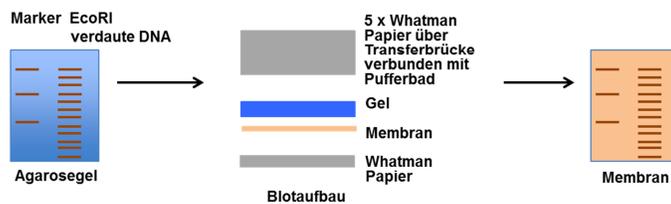
### 8.1.1.3 Die Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese war es möglich die PCR Produkte ihrer Größe nach aufzutrennen und sichtbar zu machen. Zur Herstellung der 1-2 %-igen Agarosegele, wurde die benötigte Menge an Agarose (Biozym) in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris/HCL; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA pH = 8,5) unter Erhitzen gelöst und nach Zugabe von 5 µg/ml Ethidiumbromid (Carl Roth) in eine spezielle Kammer zur Erkaltung gegossen. Für die Elektrophorese wurden die Agarose-Gele in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese-Kammer (PeqLab) gegeben und die Proben mit 6 x Auftragspuffer (50 mM Tris/HCL pH = 7,5; 50 mM EDTA; 0,25 % Bromphenolblau; 40 % Glycerol; ad 50 ml dH<sub>2</sub>O) in die Taschen des Gels pipettiert. Je nach Größe des PCR-Produktes lief die Elektrophorese für 30-60 Minuten bei 90-110 Volt. Als Größenmarker wurde ein 1 kB Marker (Invitrogen) verwendet.

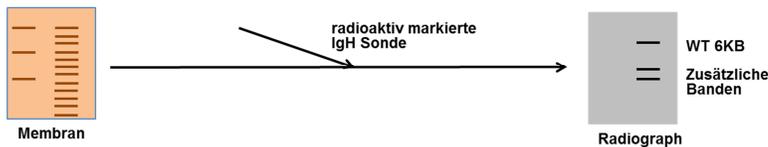
### 8.4.2 Die Southern Blot Methode (Southern 1975)

Im Jahre 1975 entwickelte Edwin M. Southern die Southern Blot Methode, eine molekularbiologische Untersuchungsmethode für die DNS. Durch sie ist es möglich eine bestimmte Gensequenz in einem komplexen DNS-Gemisch nach zu weisen. Dafür wird zuerst die DNS der Größe nach elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und diese dann auf eine Membran transferiert. Durch das anschließende Hybridisieren der fixierten DNS auf der Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde, kann man spezifische DNS-Fragmente durch Radiographie als Banden sichtbar machen.

## 1. Transfer der DNS aus dem Gel auf die Membran



## 2. Hybridisierung



**Abbildung 53: Prinzip der Southern Blot Methode nach E. M. Southern.** Ablauf und Aufbau eines Southern Blots. Dabei wird EcoRI verdaute genomische DNS auf eine Nylon-Membran transferiert und mögliche klonale B-Zellexpansionen werden als zusätzliche Banden mittels Radiographie erkennbar. WT = Wildtyp.

### 8.4.2.1 Aufbereitung der IgH-Sonde

Für die Isolierung der IgH Sonde aus dem *Bluescript* Vektor, wurden 10 µg (ca. 10 µl) der Plasmid DNS mit 2 µl HindIII, 1 µl EcoRI und 32 µl Wasser und 5 µl 10 x Puffer für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur verdaut. Anschließend wurde der Ansatz und ein 1 kB Marker auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen und das 1,6 kB große Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Aufreinigung der DNS aus dem Gel wurde das Quiax II Gel Extraction Kit (Quiagen) verwendet.

### 8.4.2.2 Isolierung und Verdau genomischer DNS

Die Isolierung der genomischen DNS erfolgte nach dem beschriebenen Protokoll der DNS Isolierung aus Mäuseohren (8.4.1.1). Das Pellet wurde nach Trocknung in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Davon wurden 25 µl zu 10 µl des Verdau-Ansatzes pipettiert und der Verdau über Nacht für 16 Stunden bei 37°C im Heizblock inkubiert. Für den Verdau der DNS wurde ein hoch konzentriertes EcoRI Restriktionsenzym (50 U/µl Fermentas) eingesetzt. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Verdau bei -20°C über Nacht eingefroren oder direkt auf ein Gel aufgetragen.

**Tabelle 12: Ansatz für den Verdau genomischer DNS.**

<b>Verdau Ansatz</b>	
DNS: 25 µl	
10 x Puffer	3,5 µl
100 x BSA	0,35 µl
0,1 M Spermidin	0,35 µl
10 mg/ml RNAse	0,15 µl
100 U EcoRI	2 µl
Wasser	3,65 µl

#### 8.4.2.3 Herstellung der Southern Blot Membran

Die EcoRI verdaute DNS wurde nach Zugabe von 10 µl 6 x Auftagspuffer auf ein 0,8 % Agarosegel (siehe 8.1.3.3) geladen. Als Größenmarker wurde ebenfalls ein 1 kB Marker verwendet, um später die Größe der spezifischen Banden bestimmen zu können. Die Auftrennung der DNS erfolgte über Nacht bei 50 V (ca. 15 cm Lauflänge). Anschließend wurde das Gel zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal unter UV-Licht (kurzwelliges Licht) fotografiert. Anschließend wurde das Gel zurechtgeschnitten (ca. 17 cm Länge) und in 0,25 N HCL (frisch zubereitet) für 20 Minuten unter vorsichtigem Schwenken inkubiert, um die DNS zu denaturieren. Danach wurde es mit Millipore Wasser gewaschen und für 40 Minuten in Transferpuffer (0,4 M NaOH; 0,6 M NaCL) wieder unter vorsichtigem Schwenken gelegt, um die DNS zu neutralisieren. Darauffolgend wurde der Blot aufgebaut (Abbildung 53) und über Nacht (mindestens 4 Stunden) die DNS aus dem Gel auf die Membran geblotet. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Position der Geltaschen auf der Membran mit Bleistift markiert und die Membran bis zum neutralen pH-Bereich (pH Papier) in 2 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCL; 0,3 M NaCitrat; ad 1 Liter mit sterilem Wasser) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran, um die DNS zu fixieren, bei 80°C für 2 Stunden gebacken. Die Membran kann bei Raumtemperatur zwischen zwei Whatman Papierstücken gelagert werden oder direkt für die Hybridisierung eingesetzt werden. Das Gel wurde zur Überprüfung des DNS-Transfers erneut unter UV-Licht fotografiert.

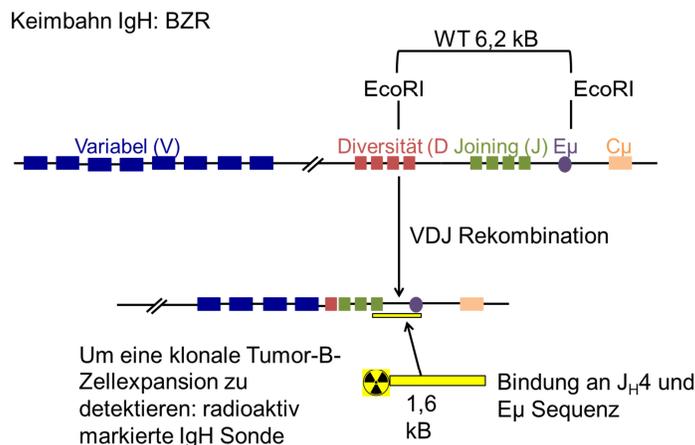
#### 8.4.2.4 Hybridisierung der Southern Blot Membran

Zuerst wurde die Membran über Nacht bei 65°C (oder tagsüber für mindestens 7 Stunden) mit Prähybridisierungspuffer unter Zugabe von Lachssperma-DNS prähybridisiert um unspezifische Bindungen zu blocken. Der Prähybridisierungspuffer (1 M NaCl; 50 mM Tris pH = 7,5; 10 % Dextransulfat; 1 % SDS) wurde bei 70°C auf der Heizplatte gerührt und

anschließend im Wasserbad bei 65°C inkubiert, bis eine klare Lösung entsteht. Die Lachssperma-DNS, welche zuerst bei 100°C für 10 Minuten inkubiert (um sie einzelsträngig zu machen) und anschließend für 1 Minute auf Eis abgeschreckt wurde, wurde den 30 ml Prähybridisierungspuffer hinzugefügt. Die Membran wurde mit 2 x SSC angefeuchtet, in die vorgewärmte Glasröhre an die Wand gebracht und mit dem Prähybridisierungspuffers im Wärmeofen bei 65°C inkubiert.

#### 8.4.2.5 Markierung, Inkubation und Entfernen der IgH Sonde

Für die Markierung der Sonde wurden mindestens 100-200 ng Sonden-DNS mit sterilem Wasser bei 95°C für 3 Minuten denaturiert und dann auf Eis für 2 Minuten abgeschreckt. Der Ansatz wurde in ein Reaktionsgefäß des Random Prime Kits pipettiert und 5 µl von <sup>32</sup>P dCTP dazugegeben und die Reaktion für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die markierte Sonde mit Hilfe einer Sephadex™ Säule gereinigt. Dazu wurde die Säule zuerst mit 2 ml TE äquilibriert, anschließend die Sonde geladen und darauffolgend 3 x à 400 µl TE eluiert. Dadurch werden einzelne, freie radioaktive Nukleotide abgetrennt. Die hoch radioaktive Sonde wurde für 5 Minuten bei 100°C denaturiert, auf Eis kurz abgeschreckt und der Hybridisierungslösung (gleich wie Prähybridisierungslösung) beigefügt. So wurde die Membran für mindestens 16 Stunden bei 65°C im Wärmeofen gerollert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran mit vorgewärmten Waschpuffer (2 x SSC; 0,1 % SDS) bei 58-60°C gewaschen und in eine Biomax Filmkassette gelegt. Im Dunkelraum (dunkel, kein Rotlicht) wurde ein fotosensitiver Biomax Film (Kodak Film) in die Kassette eingelegt und das Ganze über Nacht bei -80°C inkubiert. Nach Entwicklung des Films waren die Banden auf dem Film sichtbar (Abbildung 54). Die radioaktiv markierte Sonde konnte im Kühlschrank aufgehoben werden und nach zehnmütigem Kochen im Wasserbad (mit Spitze im Deckel) wieder eingesetzt werden.



**Abbildung 54: Bindung der IgH Sonde.** Die radioaktiv markierte Sonde bindet an die homologe Sequenz zwischen J<sub>H</sub>4 und Eµ des IgH Locus. WT = Wildtyp; kB = Kilobasenpaare.

### 8.4.3 Die Western Blot Methode

#### 8.4.3.1 Proteingewinnung aus B-Zellen der Milz

Von den aufgereinigten B-Zellen der Milz wurden  $2-5 \times 10^6$  Zellen mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen und das Pellet in 15-20  $\mu$ l 2-fachem NP40 Lysepuffer (100 mM Tris pH = 7,4; 300 mM NaCl; 4 mM EDTA; 2 % (v/v) NP40) resuspendiert. Zu dem Lysepuffer wurden außerdem Protease- (1/7; Mini Complete Tabletten Roche) und Phosphatase-Inhibitoren (1/100; Halt Phosphatase-Inhibitor Cocktail Pierce) hinzugegeben, um die Degradation durch Proteasen und die Dephosphorylierung durch Phosphatasen der Proteine zu minimieren. Um eine effiziente Lyse der Zellen zu erreichen, wurde der Ansatz für 30 Minuten abwechselnd für je 5 Minuten auf Eis inkubiert und für 20 Sekunden auf der höchsten Stufe gevortext. Die freigesetzten Proteine wurden durch Zentrifugation (15.000 rpm; 15 min; 4°C, Eppendorf Tischzentrifuge) von der DNS und den Zellresten getrennt. Der Überstand enthält die Proteine und wurde bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

#### 8.4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinproben wurden zuerst auf Eis aufgetaut. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 799  $\mu$ l Wasser und 200  $\mu$ l BioRad-Reagenz (DC Protein Assay; 500-0006) und 1  $\mu$ l der Proteinprobe gemischt und für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Absorption bei 600 nm messen zu können, wurden die Proben in Küvetten (Plastibrand, 759015) pipettiert und parallel dazu, wurde zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Proben eine Eichgerade mit BSA angefertigt.

#### 8.4.3.3 Auftrennung der Proteine und das Blotting-Verfahren

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Ulrich K. Laemmli (Laemmli 1970), können Proteine im denaturierten Zustand nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. SDS (*sodium dodecyl sulfate*) ist ein Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen und durch Bindung der denaturierten Proteine an SDS, weisen die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung auf. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die großen Proteine langsam und die Kleinen schneller durch die vernetzten Strukturen des Polyacrylamidgels zur Anode. Zuerst wird ein SDS-Gel gegossen, welches aus einem großporigen Sammelgel (5 % (v/v) Acrylamid (Carl Roth); 0,625 mM Tris pH = 6,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS (Applichem); 0,006 % (w/v) TEMED (Carl Roth)) besteht, bei dem Proteine gleich schnell durch das Gel laufen und sich vor der Auftrennung im Trenngel sammeln. Im Trenngel (10 bis 12 % (v/v) Acrylamid; 3,75 mM Tris pH = 6,8; 0,1

% (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,004 % (w/v) TEMED) werden Proteine nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Nach dem Gießen sollten die Gele für mindestens 30 Minuten polymerisieren. Von den Proteinextrakten wurden 15-20 µg mit 5 x Laemmli-Puffer (300 mM Tris pH = 6,8; 7,5 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycin; 0,01 % (v/v) Bromphenolblau; 1 % β-Mercaptoethanol) und 1-2 µl 1 M DTT (Fermentas, R0861) versetzt und für 10 Minuten bei 70°C gekocht und dadurch denaturiert. Die ganze Probe wurde aufs Gel aufgetragen und als Größenmarker wurde ein Proteinstandard (Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, 26616) mitgeführt. Die Elektrophoresekammern (BioRad) wurden mit Laufpuffer (25 mM Tris-Base; 0,2 M Glycin; 0,1 % (v/v) SDS) gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 30 V für das Sammelgel und konstant 100 V für das Trenngel. Anschließend wurden die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine mittels des Nassblot-Verfahrens im elektrischen Feld bei konstant 80 mA in einer Blotting-Aparatur (BioRad) über Nacht auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (*Immobilon™ P membrane*, Millipore, IPVH00010) transferiert. Dazu wurde ein spezieller Transferpuffer (25 mM Tris-Base; 0,2 M Glycin; 20 % (v/v) Methanol) eingesetzt und der Vorgang bei 4°C im Kühlraum inkubiert, um Proteine vor einer möglichen Zerstörung zu schützen.

#### 8.4.3.4 Nachweis der Proteine

Die bestimmten Proteine können mittels spezifischer Antikörper auf der PVDF Membran sichtbar gemacht werden. Für diesen Nachweis werden zwei Antikörper benötigt. Zuerst jedoch, wurde die Membran in TBST (0,1 M Tris/HCL pH = 7,5; 0,1 M NaCl; 0,02 % (v/v) Tween (Carl Roth)) mit 5 % BSA (Rinderserumalbumin) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Durch die Inkubation mit dem Erstantikörper, welcher in TBST mit 5 % BSA verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C im Kühlraum, werden die bestimmten Proteine detektiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper, welcher in TBST mit 5 % Milchpulver verdünnt wurde, inkubiert und wieder 3 Mal für 5 Minuten gewaschen. Der Zweitantikörper, der spezifisch an den Erstantikörper bindet, ist an Meerrettich-*horseradish*-Peroxidase (HRP) gekoppelt und durch Einsatz von ECL (Enhanced Chemiluminescence ECL™ von GE Healthcare, RPN2106), können mit Hilfe eines lichtsensitiven Films (CAE RP new) die gewünschten Proteine sichtbar gemacht werden. Eine Western Blot Membran kann mehrmals auf verschiedene Proteine untersucht werden, nachdem man die vorigen Antikörper entfernt. Dazu wird die Membran in einem 56°C Wärmeofen für 30 Minuten mit einer Waschlösung (62,5 mM Tris/HCL pH = 6,8; 2 % (w/v) SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol) inkubiert. Darauf folgend wird die Membran 3 Mal für mindestens 10 Minuten mit TBST gewaschen und kann erneut mit einem Erstantikörper über Nacht gerollert werden.

## 9 Literaturverzeichnis

- Agrawal, S. et al., 2013. Transitional B cell subsets in human bone marrow. *Clinical and Experimental Immunology*, 174, pp.53–59.
- Allan, L.L. et al., 2011. CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signaling. *Journal of Immunology*, 186, pp.5261–72.
- Allen, C.D.C., Okada, T. & Cyster, J.G., 2007. Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity*, 27, pp.190–202.
- Allman, D. et al., 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *Journal of Immunology*, 167(12), pp.6834–6840.
- Allman, D. & Pillai, S., 2008. Peripheral B Cell Subsets. *Current Opinion in Immunology*, 20(2), pp.149–157.
- Almaden, J. V. et al., 2016. B-cell survival and development controlled by the coordination of NF- $\kappa$ B family members RelB and cRel. *Blood*, 127, pp.1276–1286.
- Amir, R.E. et al., 2004. Mechanism of processing of the NF- $\kappa$ B p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene*, 23(14), pp.2540–7.
- Attanavanich, K. & Kearney, J.F., 2004. Marginal Zone, but Not Follicular B Cells, Are Potent Activators of Naive CD4 T Cells. *The Journal of Immunology*, 172(2), pp.803–811.
- Attar, R.M. et al., 1997. Genetic approaches to study Rel/NF- $\kappa$ B function in mice. *Seminars in cancer biology*, 8(2), pp.93–101.
- Banchereau, J. et al., 1989. Long-Term Human B cell Lines dependent on Interleukin-4 and Antibody to CD40. *Science*, 251, pp.7–10.
- Basak, S., Shih, V.F.-S. & Hoffmann, A., 2008. Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF- $\kappa$ B signaling system. *Molecular and cellular biology*, 28(10), pp.3139–3150.
- Batten, M. et al., 2000. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 192(10), pp.1453–1465.
- Baud, V. & Collares, D., 2016. Post-Translational Modifications of RelB NF- $\kappa$ B Subunit and Associated Functions. *Cells*, 5(2), pp.1–11.
- Baumgarth, N., 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Publishing Group*, 11(1), pp.34–46.
- Baxendale, A.J. et al., 2005. Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth. *Oncogene*, 24(53), pp.7913–7923.
- Berberich, I., Shu, G.L. & Clark, E.A., 1994. Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor- $\kappa$ B. *Journal of Immunology*, 153, pp.4357–4366.

- von Bergwelt-Baildon, M. et al., 2004. CD40 activation: Potential for specific immunotherapy in B-CLL. *Annals of Oncology*, 15(6), pp.853–857.
- Bissel, M.J. & Hines, W.C., 2011. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine*, 17(3), pp.320–329.
- Ten Boekel, E., Melchers, F. & Rolink, A.G., 1998. Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity*, 8(2), pp.199–207.
- Bossen, C. & Schneider, P., 2006. BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. *Seminars in Immunology*, 18(5), pp.263–275.
- Bren, G.D. et al., 2001. Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. *Oncogene*, 20(53), pp.7722–7733.
- Brown, K.D., Hostager, B.S. & Bishop, G.A., 2001. Differential Signaling and Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor (TRAF) Degradation Mediated by CD40 and the Epstein-Barr Virus Oncoprotein Latent Membrane Protein 1 (LMP1). *Journal of Experimental Medicine*, 193(8), pp.943–954.
- Cambier, J.C. et al., 2007. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature reviews. Immunology*, 7(8), pp.633–43.
- Carbone, A. et al., 1995. Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood*, 85(3), pp.780–9.
- Cariappa, A. et al., 2000. Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 192(8), pp.1175–82.
- Cariappa, A. et al., 2001. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity*, 14(5), pp.603–615.
- Carrasco, D., Ryseck, R. & Bravo, R., 1993. Expression of rel B transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development*, 118, pp.1221–1231.
- Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I., 2013. Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), pp.118–132.
- Chaudhry, M.S. & Karadimitris, A., 2014. Role and regulation of CD1d in normal and pathological B cells. *Journal of Immunology*, 193(10), pp.4761–4768.
- Chen, Z.J., 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature cell biology*, 7(8), pp.758–765.
- Chung, J.B. et al., 2002. CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *International Immunology*, 14(2), pp.157–166.
- Chung, J.B., Silverman, M. & Monroe, J.G., 2003. Transitional B cells: Step by step towards immune competence. *Trends in Immunology*, 24(6), pp.342–348.
- Cildir, G., Low, K.C. & Tergaonkar, V., 2016. Noncanonical NF-kB Signaling in Health and

- Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 22(5), pp.414–429.
- Cinamon, G. et al., 2008. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature Immunology*, 9(1), pp.54–62.
- Claudio, E. et al., 2002. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nature Immunology*, 3(10), pp.958–965.
- Compagno, M. et al., 2009. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 459(7247), pp.717–721.
- Cormier, F. et al., 2013. Frequent Engagement of RelB Activation Is Critical for Cell Survival in Multiple Myeloma. *PLoS ONE*, 8(3).
- Craxton, A. et al., 1998. p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *Journal of Immunology*, 161(7), pp.3225–3236.
- Crotty, S., 2014. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*, 41(4), pp.529–542.
- Deng, L. et al., 2000. Activation of the Ikb Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell*, 103(2), pp.351–361.
- Derudder, E. et al., 2003. RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *The Journal of biological chemistry*, 278(26), pp.23278–23284.
- Dobrzanski, P., Ryseck, R.-P. & Bravo, R., 1993. Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif. *Molecular and cellular biology*, 13(3), pp.1572–1582.
- Edry, E. & Melamed, D., 2004. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *Journal of Immunology*, 173(7), pp.4265–71.
- Fabre, C. et al., 2012. Dual inhibition of canonical and non-canonical NF-kB pathways demonstrates significant anti-tumor activities in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 18(3), pp.4669–4681.
- Fasnacht, N. et al., 2014. Specific fibroblastic niches in secondary lymphoid organs orchestrate distinct Notch-regulated immune responses. *The Journal of experimental medicine*, 211(11), pp.2265–2279.
- Ferguson, A.R. & Corley, R.B., 2005. Accumulation of marginal zone B cells and accelerated loss of follicular dendritic cells in NF-kappaB p50-deficient mice. *BMC immunology*, 6, p.8.
- Franzoso, G. et al., 1998. Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *The Journal of experimental medicine*, 187(2), pp.147–159.
- Fusco, A.J. et al., 2008. Stabilization of RelB requires multidomain interactions with p100/p52. *Journal of Biological Chemistry*, 283(18), pp.12324–12332.

- Fusco, A.J. et al., 2016. The NF- $\kappa$ B subunit RelB controls p100 processing by competing with the kinases NIK and IKK1 for binding to p100. *Science Signaling*, 9(447), pp.1–10.
- Gao, Y. et al., 2000. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis , genomic stability and development. *Nature*, 404, pp.897–900.
- Gardam, S. et al., 2008. TRAF2 and TRAF3 Signal Adapters Act Cooperatively to Control the Maturation and Survival Signals Delivered to B Cells by the BAFF Receptor. *Immunity*, 28(3), pp.391–401.
- Gardam, S. & Brink, R., 2014. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling initiated by BAFF influences B cell biology at multiple junctures. *Frontiers in Immunology*, 4, pp.1–12.
- Gasparini, C. et al., 2014. NF- $\kappa$ B pathways in hematological malignancies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(11), pp.2083–2102.
- Geier, J.K. & Schlissel, M.S., 2006. Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Seminars in Immunology*, 18(1), pp.31–39.
- Geraldes, P. et al., 2006. Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: An ER $\alpha$ -mediated pathway. *Cardiovascular Research*, 71(3), pp.566–573.
- Ghosh, S. & Karin, M., 2002. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell*, 109, pp.81–96.
- Ghosh, S., May, M.J. & Kopp, E.B., 1998. NF-  $\kappa$ B AND REL PROTEINS : Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual review of Immunology*, 16, pp.225–260.
- Gires, O. et al., 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein – Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *The EMBO Journal*, 16(20), pp.6131–6140.
- Graham, B. & Gibson, S.B., 2005. The two faces of NFkappaB in cell survival responses. *Cell cycle*, 4(10), pp.1342–1345.
- Grech, A.P. et al., 2004. TRAF2 differentially regulates the canonical and noncanonical pathways of NF- $\kappa$ B activation in mature B cells. *Immunity*, 21(5), pp.629–642.
- Guan, H., Hou, S. & Ricciardi, R.P., 2005. DNA binding of repressor nuclear factor- $\kappa$ B p50/50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), pp.9957–9962.
- Guo, F. et al., 2007. Constitutive alternative NF- $\kappa$ B signaling promotes marginal zone B-cell development but disrupts the marginal sinus and induces HEV-like structures in the spleen. *Blood*, 110(7), pp.2381–2389.
- den Haan, J.M.M., Arens, R. & van Zelm, M.C., 2014. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*, 162(2), pp.103–112.
- Haas, K.M. et al., 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*, 23(1), pp.7–18.

- Hampel, F. et al., 2011. CD19-independent instruction of murine marginal zone B-cell development by constitutive Notch2 signaling. *Blood*, 118(24), pp.6321–6332.
- Harnett, M.M., 2004. CD40: a growing cytoplasmic tale. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 237, pp.1–4.
- Hasbold, J. et al., 1998. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *European Journal of Immunology*, 28(3), pp.1040–1051.
- Hatzivassiliou, E. et al., 1998. A Fusion of the EBV Latent Membrane Protein-1 (LMP1) Transmembrane Domains to the CD40 Cytoplasmic Domain Is Similar to LMP1 in Constitutive Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression, Nuclear Factor- $\kappa$ B, and Stress-Activated Protein Kinase. *The Journal of Immunology*, 160, pp.1116–1121.
- Hayden, M.S. & Ghosh, S., 2008. Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, 132(3), pp.344–362.
- Hendriks, R.W. & Middendorp, S., 2004. The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends in Immunology*, 25(5), pp.249–256.
- Hömig-Hölzel, C. et al., 2008. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway and promotes lymphomagenesis. *The Journal of experimental medicine*, 205(6), pp.1317–1329.
- Hostager, B.S. & Bishop, G.A., 2013. CD40-mediated activation of the NF- $\kappa$ B2 pathway. *Frontiers in Immunology*, 4, pp.1–4.
- Inoue, J.I. et al., 2007. NF- $\kappa$ B activation in development and progression of cancer. *Cancer Science*, 98(3), pp.268–274.
- Isnardi, I. et al., 2010. Complement receptor 2 / CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood*, 115(24), pp.5026–5036.
- Jacobson, C. et al., 2016. HSP90 inhibition overcomes ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Blood*.
- Jacque, E. et al., 2005. RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp.14635–40.
- Janeway, C. et al., 2014. *Janeway's Immunobiology*,
- Johnson, S.A., Rozzo, S.J. & Cambier, J.C., 2002. Aging-Dependent Exclusion of Antigen-Inexperienced Cells from the Peripheral B Cell Repertoire. *The Journal of Immunology*, 168(10), pp.5014–5023.
- Jorge H. Caamaño, et al., 1998. Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B2 (p100/p52) Is Required for Normal Splenic Microarchitecture and B Cell-mediated Immune Responses. *Journal of Experimental Medicine*, 187(2), pp.185–196.
- Jourdan, M. et al., 2009. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular

- characterization. *Blood*, 114(25), pp.5173–5181.
- Karmann, K. et al., 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), pp.4342–4346.
- Karras, J.G. et al., 1997. Induction of STAT protein signaling through the CD40 receptor in B lymphocytes: distinct STAT activation following surface Ig and CD40 receptor engagement. *Journal of Immunology*, 159(9), pp.4350–4355.
- Katakai, T. et al., 2004. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: An immunopatform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *International Immunology*, 16(8), pp.1133–1142.
- Kawabe, T. et al., 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 1(3), pp.167–178.
- Kayagaki, N. et al., 2002. BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF- $\kappa$ B2. *Immunity*, 10, pp.515–524.
- Kehry, M.R., 1996. CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156, pp.2345–2348.
- Kim, J.R. et al., 2005. Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination. *BMC immunology*, 6, p.3.
- Kontgen, F. et al., 1995. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes and Development*, 9(16), pp.1965–1977.
- Krappmann, D. & Vincendeau, M., 2016. Mechanisms of NF- $\kappa$ B deregulation in lymphoid malignancies. *Seminars in Cancer Biology*, 39, pp.3–14.
- Kraus, M. et al., 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Iga/ $\beta$  Heterodimer. *Cell*, 117(6), pp.787–800.
- Kurosaki, T., 2000. Functional dissection of BCR signaling pathways. *Current Opinion in Immunology*, 12(3), pp.276–281.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, pp.563–564.
- Lahiri, A. et al., 2012. The complexity of the BAFF TNF-family members: Implications for autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 39(3), pp.189–198.
- Lam, N. & Sugden, B., 2002. CD40 and its viral mimic, LMP1: Similar means to different ends. *Cellular Signalling*, 15(1), pp.9–16.
- Lesley, R. et al., 2004. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*, 20(4), pp.441–453.
- Li, Y.Y. et al., 1996. CD40 ligation results in protein kinase C-independent activation of ERK

- and JNK in resting murine splenic B cells. *Journal of Immunology*, 157(4), pp.1440–7.
- Liang, C., Zhang, M. & Sun, S.C., 2006.  $\beta$ -TrCP binding and processing of NF- $\kappa$ B/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cellular Signalling*, 18(8), pp.1309–1317.
- Liao, G. et al., 2004. Regulation of the NF- $\kappa$ B-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), pp.26243–26250.
- Lin, L. & Ghosh, S., 1996. A glycine-rich region in NF- $\kappa$ B p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Molecular and cellular biology*, 16(5), pp.2248–2254.
- Lin, W.W., Hostager, B.S. & Bishop, G.A., 2015. TRAF3, ubiquitination, and B-lymphocyte regulation. *Immunological reviews*, 266(1), pp.46–55.
- Ling, L., Cao, Z. & Goeddel, D. V., 1998. NF- $\kappa$ B-inducing kinase activates IKK- $\alpha$  by phosphorylation of Ser-176. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), pp.3792–3797.
- Lortan, J.E. et al., 1987. Newly produced virgin B cells migrate to secondary lymphoid organs but their capacity to enter follicles is restricted. *European Journal of Immunology*, 17(9), pp.1311–1316.
- Mackay, F. et al., 2003. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annual review of immunology*, 21, pp.231–264.
- Mackay, F. et al., 1999. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *The Journal of experimental medicine*, 190(11), pp.1697–1710.
- Mackay, F. & Browning, J.L., 2002. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(7), pp.465–475.
- Mackay, F. & Schneider, P., 2009. Cracking the BAFF code. *Nature Reviews Immunology*, 9(7), pp.491–502.
- MacLennan, I.C. et al., 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews*, 194, pp.8–18.
- Madonna, G. et al., 2012. NF- $\kappa$ B as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of translational medicine*, 10, pp.1–8.
- Maier, H.J. et al., 2003. Critical role of RelB serine 368 for dimerization and p100 stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), pp.39242–39250.
- Mak, T.W. et al., 2003. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nature Immunology*, 4(8), pp.765–772.
- Malek, S. et al., 2003. X-ray crystal structure of an I $\kappa$ B $\beta$  NF- $\kappa$ B p65 homodimer complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), pp.23094–23100.

- Marienfeld, R. et al., 2003. RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pp.19852–19860.
- Mårtensson, I.L. et al., 2010. The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Letters*, 584(12), pp.2572–2579.
- Martin, F. & Kearney, J.F., 2000. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a “natural immune memory”. *Immunological Reviews*, 175(5), pp.70–79.
- Martin, F. & Kearney, J.F., 2001. B1 cells: Similarities and differences with other B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, 13(2), pp.195–201.
- Matsuuchi, L. & Gold, M.R., 2001. New views of BCR structure and organization. *Current Opinion in Immunology*, 13(3), pp.270–277.
- May, M.J., Marienfeld, R.B. & Ghosh, S., 2002. Characterization of the I $\kappa$ B-kinase NEMO binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), pp.45992–46000.
- Mebius, R.E. & Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), pp.606–16.
- Medzhitov, R. & Janeway, C., 2000. Innate Immunity. *The New England journal of biology and medicine*, 343, pp.338–344.
- Meffre, E., Casellas, R. & Nussenzweig, M.C., 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nature Immunology*, 1(5), pp.379–385.
- Meffre, E. & Wardemann, H., 2008. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(6), pp.632–638.
- Meyer-Bahlburg, A. et al., 2008. Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. *The Journal of experimental medicine*, 205(1), pp.155–168.
- Mineva, N.D. et al., 2007. CD40 ligand-mediated activation of the de novo RelB NF- $\kappa$ B synthesis pathway in transformed B cells promotes rescue from apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), pp.17475–17485.
- Mitchell, S., Vargas, J. & Hoffmann, A., 2016. Signaling via the NF $\kappa$ B system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 10.
- Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K., 2012. B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult Encarnacion. *Immunity*, 36(1), pp.13–21.
- Moore, C.R. et al., 2012. Specific deletion of TRAF3 in B lymphocytes leads to B-lymphoma development in mice. *Leukemia*, 26(5), pp.1122–1127.
- Moran, S.T. et al., 2007. Synergism between NF- $\kappa$ B/p50 and Notch2 during the Development of Marginal Zone B Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 179, pp.195–200.
- Morrison, M.D. et al., 2005. An atypical Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor-associated factor-binding motif of B cell-activating factor belonging to the TNF Family (BAFF)

- receptor mediates induction of the noncanonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), pp.10018–10024.
- Mukundan, L. et al., 2005. TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages. *Journal of immunology*, 174(2), pp.1081–1090.
- Nagel, D. et al., 2014. Mechanisms and consequences of constitutive NF- $\kappa$ B activation in B-cell lymphoid malignancies. *Oncogene*, 33, pp.5655–5665.
- Nguyen, L.T. et al., 1999. TRAF2 deficiency results in hyperactivity of certain TNFR1 signals and impairment of CD40-mediated responses. *Immunity*, 11, pp.379–389.
- Nuaez, C. et al., 1996. B cells are generated throughout life in humans. *The Journal of Immunology*, 156, pp.866–872.
- Oeckinghaus, A. & Ghosh, S., 2009. The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(4), pp.1–14.
- Parker, D.C., 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annual Review of Immunology*, 11, pp.331–360.
- Pasare, C. & Medzhitov, R., 2003. Toll Pathway–Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell–Mediated Suppression by Dendritic Cells. *Science*, 299, pp.1033–1036.
- Perrigoue, J.G. et al., 2009. MHC class II–dependent basophil–CD4+ T cell interactions promote TH2 cytokine–dependent immunity. *Nature Immunology*, 10(7), pp.697–705.
- Pillai, S. & Cariappa, A., 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), pp.767–777.
- Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S.T., 2005. Marginal Zone B Cells. *Annual Review of Immunology*, 23(1), pp.161–196.
- Polyak, K., Haviv, I. & Campbell, I.G., 2009. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends in Genetics*, 25(1), pp.30–38.
- Qian, Y. et al., 2004. Act1, a negative regulator in CD40- and BAFF-mediated B cell survival. *Immunity*, 21(4), pp.575–587.
- Qing, G., Qu, Z. & Xiao, G., 2005. Regulation of NF- $\kappa$ B p100 processing by its cis-acting domain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), pp.18–27.
- Rahal, R. et al., 2014. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- $\kappa$ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nature medicine*, 20(1), pp.87–92.
- Rahman, Z.S.M. et al., 2003. Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, 198(8), pp.1157–1169.
- Rajewsky, K., 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381, pp.751–758.
- Rakhmanov, M. et al., 2009. Circulating CD21low B cells in common variable

- immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), pp.13451–13456.
- Ranuncolo, S.M. et al., 2012. Hodgkin lymphoma requires stabilized NIK and constitutive RelB expression for survival. *Blood*, 120(18), pp.3756–3763.
- Razani, B., Reichardt, A.D. & Cheng, G., 2011. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling activation and regulation: Principles and perspectives. *Immunological Reviews*, 244(1), pp.44–54.
- Rice, N.R., MacKichan, M.L. & Israël, A., 1992. The precursor of NF- $\kappa$ B p50 has I  $\kappa$ B-like functions. *Cell*, 71(2), pp.243–53.
- Richardson, P.G. et al., 2014. A phase 2 trial of lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and relapsed / refractory myeloma. *Blood*, 123(10), pp.1461–1469.
- Rickert, R.C., Roes, J. & Rajewsky, K., 1997. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Research*, 25(6), pp.1317–1318.
- Rolink, A.G. & Melchers, F., 2002. BAFFed B cells survive and thrive: Roles of BAFF in B-cell development. *Current Opinion in Immunology*, 14, pp.266–275.
- Rousset, F., Garcia, E. & Banchereau, J., 1991. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *The Journal of experimental medicine*, 173(3), pp.705–10.
- Rowland, S.L. et al., 2010. BAFF Receptor Signaling Aids the Differentiation of Immature B Cells into Transitional B Cells following Tonic BCR Signaling. *Journal of immunology*, 185, pp.4570–4581.
- Roy, P. et al., 2016. Non-canonical NF $\kappa$ B mutations reinforce pro-survival TNF response in multiple myeloma through an autoregulatory RelB:p50 NF $\kappa$ B pathway. *Oncogene*, pp.1–13.
- Ruddle, N.H. & Akirav, E.M., 2009. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *Journal of Immunology*, 183(4), pp.2205–2212.
- Ryseck, R.P. et al., 1992. RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF- $\kappa$ B. *Molecular and cellular biology*, 12(2), pp.674–684.
- Saito, T. et al., 2003. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*, 18(5), pp.675–685.
- Sasaki, Y. et al., 2006. Canonical NF- $\kappa$ B Activity, Dispensable for B Cell Development, Replaces BAFF-Receptor Signals and Promotes B Cell Proliferation upon Activation. *Immunity*, 24(6), pp.729–739.
- Sasaki, Y. et al., 2004. TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *Journal of Immunology*, 173(4), pp.2245–2252.
- Satpathy, S. et al., 2010. Inhibition of terminal differentiation of B cells mediated by CD27

- and CD40 involves signaling through JNK. *Journal of Immunology*, 185(11), pp.6499–6507.
- Schenkel, J.M. & Masopust, D., 2014. Tissue-resident memory T cells. *Immunity*, 41(6), pp.886–897.
- Schiemann, B. et al., 2001. An Essential Role for BAFF in the Normal Development of B Cells Through a BCMA-Independent Pathway. *Science*, 293, pp.2111–2114.
- Schneider, P. & Tschopp, J., 2003. BAFF and the regulation of B cell survival. *Immunology Letters*, 88(1), pp.57–62.
- Schweighoffer, E. et al., 2013. The BAFF Receptor Transduces Survival Signals by Co-opting the B Cell Receptor Signaling Pathway. *Immunity*, 38(3), pp.475–488.
- Senftleben, U. et al., 2001. Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science*, 293, pp.1495–1499.
- De Silva, N.S. et al., 2016. Impairment of Mature B Cell Maintenance upon Combined Deletion of the Alternative NF- $\kappa$ B Transcription Factors RELB and NF- $\kappa$ B2 in B Cells. *Journal of Immunology*, 196(6), pp.2591–601.
- Snapper, C. et al., 1996. B cells lacking RelB are defective in Proliferative Responses, but Undergo Normal B cell maturation to Ig Secretion and Ig Class switching. *The Journal of Experimental Medicine*, 184, pp.1537–1541.
- Solan, N.J. et al., 2002. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), pp.1405–1418.
- Sonoda, K.H. & Stein-Streilein, J., 2002. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *European Journal of Immunology*, 32(3), pp.848–857.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), pp.503–517.
- Srivastava, B. et al., 2005. Characterization of marginal zone B cell precursors. *Journal of Experimental Medicine*, 202(9), pp.1225–1234.
- Stojanovic, K., 2013. Die Rolle des NF- $\kappa$ B Signalwegs in LMP1/CD40--exprimierenden B-Zellen in vivo. *Dissertation*.
- Sun, S., 2010. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Nature Publishing Group*, 21(1), pp.71–85.
- Sun, S., 2012. The noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. *Immunological reviews*, 246, pp.125–140.
- Sutherland, C.L. et al., 1996. Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *Journal of Immunology*, 157(8), pp.3381–3390.
- Suvas, S. et al., 2002. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), pp.7766–7775.

- Tafari, a et al., 2001. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature*, 409, pp.105–109.
- Tangye, S.G., 2013. To B1 or not to B1: that really is still the question! *Blood*, 121(26), pp.5109–5111.
- Tanigaki, K. et al., 2002. Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nature Immunology*, 3(5), pp.443–450.
- Tao, Z. & Ghosh, G., 2012. Understanding NIK regulation from its structure. *Structure*, 20, pp.1615–1617.
- Tarlinton, D.M. & Smith, K.G.C., 2000. Dissecting affinity maturation: A model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunology Today*, 21(9), pp.436–441.
- Teague, B.N. et al., 2007. Cutting Edge: Transitional T3 B Cells Do Not Give Rise to Mature B Cells, Have Undergone Selection, and Are Reduced in Murine Lupus. *The Journal of Immunology*, 178(12), pp.7511–7515.
- Thomas, M. et al., 2007. Notch activity synergizes with B-cell-receptor and CD40 signaling to enhance B-cell activation. *Blood*, 109(8), pp.3342–3350.
- Thompson, J.S. et al., 2001. BAFF-R, a Newly Identified TNF Receptor That Specifically Interacts with BAFF. *Science*, 293, pp.2108–2111.
- Tripathi, P. & Aggarwal, A., 2006. NF- $\kappa$ B transcription factor: A key player in the generation of immune response. *Current Science*, 90(4), pp.519–531.
- Udalova, I. a et al., 2000. Functional Consequences of a Polymorphism Affecting NF- $\kappa$ B p50-p50 Binding to the TNF Promoter Region Functional Consequences of a Polymorphism Affecting NF- $\kappa$ B p50-p50 Binding to the TNF Promoter Region. *Molecular and cellular biology*, 20(24), pp.9113–9119.
- Vallabhapurapu, S. et al., 2008. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- $\kappa$ B signaling. *Nature Immunology*, 9(12), pp.1364–70.
- Vallabhapurapu, S. & Karin, M., 2009. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, 27, pp.693–733.
- Varfolomeev, E. et al., 2007. IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B Activation, and TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis. *Cell*, 131(4), pp.669–681.
- Vince, J.E. et al., 2009. TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (TNF) to efficiently activate NF- $\kappa$ B and to prevent TNF-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(51), pp.35906–35915.
- Wehr, C. et al., 2004. A new CD21 low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clinical Immunology*, 113(2), pp.161–171.
- Weih, D.S., Yilmaz, Z.B. & Weih, F., 2001. Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *Journal of Immunology*, 167(4), pp.1909–1919.

- Weih, F. et al., 1997. Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *The Journal of Immunology*, 158(11), pp.5211–5218.
- Weih, F. et al., 1995. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- $\kappa$ B/Rel family. *Cell*, 80(2), pp.331–340.
- Witt, C.M. et al., 2003. Notch2 haploinsufficiency results in diminished B1 B cells and a severe reduction in marginal zone B cells. *Journal of Immunology*, 171(6), pp.2783–2788.
- Xiao, G., Harhaj, E.W. & Sun, S.C., 2001. NF- $\kappa$ B-inducing kinase regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100. *Molecular Cell*, 7(2), pp.401–409.
- Xie, P. et al., 2007. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 3 Is a Critical Regulator of B Cell Homeostasis in Secondary Lymphoid Organs. *Immunity*, 27(2), pp.253–267.
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R.B., 2004. I $\kappa$ B kinases: Key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(2), pp.72–79.
- Yang, S., Li, J.Y. & Xu, W., 2014. Role of BAFF/BAFF-R axis in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 91(2), pp.113–122.
- Zandi, E. et al., 1997. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell*, 91(2), pp.243–252.
- Zarnegar, B. et al., 2004. Unique CD40-mediated biological program in B cell activation requires both type 1 and type 2 NF- $\kappa$ B activation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), pp.8108–8113.
- Zarnegar, B.J. et al., 2008. Noncanonical NF- $\kappa$ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nature Immunology*, 9(12), pp.1371–1378.
- Zhan, Y. et al., 2016. Expression, purification and biological characterization of the extracellular domain of CD40 from *Pichia pastoris*. *BMC biotechnology*, 16(8), pp.1–10.
- Zhang, B. et al., 2015. An Oncogenic Role for Alternative NF- $\kappa$ B Signaling in DLBCL Revealed upon Deregulated BCL6 Expression. *Cell Reports*, 11(5), pp.715–726.
- Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W.E., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.*, 28(1), pp.445–489.
- Zouali, M. & Richard, Y., 2011. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 2(63), pp.1–10.

## 10 Publikationen

- The role of the non-canonical NF- $\kappa$ B transcription factor RelB in B cells and B cell lymphomas: **Stefanie Zapf**, Kristina Stojanovic, Ursula Zimmer-Strobl (*manuscript in preparation*)
- HSP90 inhibition overcomes ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma: Nadja K., Caron J., Robert A. R., Sebastian T., Sarah H., Diederik van B., Liat B., Amanda L. C., Alexandra C., Amy S., Trevor T., **Stefanie Zapf**, Deepak B., Ursula Zimmer-Strobl, Scott J. R., Oliver W., David M. Weinstock, Blood 2016
- Die anthropologische Untersuchung: George McGlynn und Franziska Immler und **Stefanie Zapf**, Steppenkrieger: Reiternomaden des 7.-14. Jahrhunderts aus der Mongolei, 2012

## 11 Danksagung

Zu Allererst möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit an zu fertigen. Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine Doktormutter PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl für das interessante Thema, die Möglichkeit diese Arbeit in ihrem Labor zu bearbeiten, für die fachliche Unterstützung und natürlich, dass sie immer für Probleme und Fragen ein offenes Ohr hatte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Olivier Gires für die Anfertigung des Zweitgutachtens bedanken. Und auch bei allen weiteren Gutachtern, dass sie sich die Zeit genommen haben, sich meiner Arbeit zu widmen.

Ferner gilt hier noch mein besonderer Dank auch Herrn Prof. Dr. Marc Schmidt-Supprian und Frau Prof. Dr. Imela Jeremias, dafür, dass sie ein tolles Thesis-Committee Team waren und mich in jeglicher Hinsicht in fachlichen Fragen unterstützt habt.

Liebe Laborkollegen und –kolleginnen, ein ganz besonderes Danke geht an Euch!!!! An Anna und Samantha für eine super Zusammenarbeit, die unendliche Hilfsbereitschaft, die lustigen Kaffeepausen und dass ihr immer für mich da wart!! An Steffi E. für die gute Einarbeitung und die Labortipps. An Fräulein Sperling dafür, dass du das Laborleben etwas fröhlicher und bunter gemacht hast und immer mit einem offenen Ohr bereit standest! Laura und Markus, danke euch, dass ihr so tolle Laborkollegen geworden seid und mich in der etwas stressigen letzten Zeit immer tatkräftig unterstützt habt und auch mal zurück gesteckt habt. Auch ein herzliches Danke an Lothar Strobl, für die vielen Anregungen und für die Hilfe bei Auswertungen von Daten und Unterstützung bei PC Fragen.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an dieser Stelle auch an alle Mitarbeiter des Tierstalls, Jasmin Teutsch (Helmholtz Zentrum), Manfred Felbermeier, Bianca Fesl und Andreas Kühn (Biozentrum): danke, dass ihr euch so toll um meine Mäuse gekümmert habt und mir auch mal bei der ein oder anderen Analyse zur Seite standet!!!!!!

Ein ganz großes Danke aus tiefstem Herzen geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat und immer für mich da war! Ohne euch wäre das nicht möglich gewesen!! Und das letzte und wichtigste Danke ist für dich Robert, dafür, dass du mir immer wieder Mut zugesprochen hast und an mich geglaubt hast! Die Zeit war bestimmt nicht einfach für dich und dass du mich so unendlich unterstützt hast werde ich dir nie vergessen.

Diese Dissertation wurde von März 2013 bis Dezember 2016 in der Abteilung für Genvektoren des Helmholtz Zentrum München in der Arbeitsgruppe für B-Zellentstehung und -Aktivierung von Frau PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl angefertigt.

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegt Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

München, den 20.7.2017

\_\_\_\_\_  
Stefanie Sarah Zapf

## 13 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 20.7.2017

\_\_\_\_\_  
Stefanie Sarah Zapf