

Die Tumorgenese in Mlh1 defizienten Mäusen
und
der Einfluss des Immunsystems auf die Abwehr von Tumoren
in Mismatch Reparatur-(MMR-) defizienten Mäusen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Torsten Haneke
aus
Holzminden

Würzburg, 2008-03-09

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. M. J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. M. Scharl

Gutachter: Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink

Tag des Promotionskolloquiums:

Danksagung

Da die Arbeit noch einen Abschluss gefunden hat, verdanke ich vielen Personen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Manfred Scharl für die Unterstützung und die wissenschaftliche Leitung des Projektes.

Prof. Dr. Hans Konrad Müller-Hermelink möchte ich für die Hilfe bei der diagnostischen Befundung der murinen Tumoren, die Möglichkeit zur Nutzung der Einrichtungen des Pathologischen Institutes und nicht zuletzt für die Übernahme des Koreferats danken.

Meinem Betreuer, Dr. Burkhard Kneitz und den Mitarbeitern der Junior-Research-Group, insbesondere Dr. Barbara Zöller, Frau Cora Reiss und Dr. Lev Fedorov danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andreas Zettl, für die vielen Besprechungen und die histologische Diagnostik der Tumoren. Dr. Peter Starostik und Frau Claudia Siehndel standen mir mit Rat und Tat bei den MSI-Analysen zur Seite.

Auch den Mitgliedern des Lehrstuhls Physiologische Chemie I möchte ich danken. Das gute Arbeitsklima und Möglichkeiten des Austausches, sowie die hier geschlossenen Freundschaften bedeuten mir viel.

Essentiell für meine Arbeit war auch eine gute Versorgung und Unterbringung der Mäuse (denen ich eigentlich auch danken sollte), dies gewährleistete Frau Alexandra Claus.

Das Projekt wurde gefördert im Rahmen des Graduiertenkollegs 639 „Genomische Instabilität“.

Meiner Frau danke ich für die Unterstützung, ihre Geduld und ihr Vertrauen.

für Felix und Greta

Die Tumorgenese in Mlh1 defizienten Mäusen
und
der Einfluss des Immunsystems auf die Abwehr von Tumoren
in Mismatch Reparatur-(MMR-) defizienten Mäusen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Torsten Haneke
aus
Holzminden

Würzburg, 2008-03-09

I Einleitung	5
1. Genomische Instabilität und Tumorgenese	5
2. Das Mismatch-Reparatur System	6
2.1. Prokaryotisches MMR-System	6
2.2. Eukaryotisches MMR-System	7
2.3. Komponenten des eukaryotischen MMR-Systems	8
2.4. Funktion des MMR-Systems	8
2.5. Mikrosatelliteninstabilität als Charakteristikum für MMR-Defekte	10
3. Tumorgenese aufgrund von MMR-Defekten	11
3.1. Der Mutationsphänotyp	11
3.2. Erbliche Defekte in MMR-Genen und Tumorgenese	12
3.3. Sporadische Defekte in MMR-Genen und Tumorgenese	13
3.4. Erkrankungen im Zusammenhang mit MMR-Defekten	13
3.5. Mausmodelle mit MMR-Defekten	15
4. Lymphomentstehung aufgrund von MMR-Defekten	17
4.1. MMR-Defekte in humanen Lymphompatienten	17
4.2. Lymphomentwicklung in MMR-defekten Mäusen	19
5. Immunogenität von (MMR-defizienten) Tumoren	21
5.1. Tumorzell-infiltrierende Lymphozyten (TILs)	21
5.2. Ausweichmechanismen mittels cytotoxischer T-Zell-Immunantwort	22
6. Immunzell-vermittelte Tumorabwehr	24
6.1. Adaptives und angeborenes Immunsystem	24
6.2. Die Bedeutung der MHC Klasse I-Expression für die Tumorabwehr	25
6.3. Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung	26
6.4. Mechanismen der CTL-Aktivierung	27
6.5. Mechanismen der Cytotoxizität	28
6.6. Transgene Mausmodelle mit eingeschränkter immunzellvermittelter Tumorabwehr	28
6.6.1. <i>β2m</i> -Mäuse	29
6.6.2. <i>pfp</i> -Mäuse	29
6.6.3. <i>pfp/β2m</i> -Mäuse	30
6.6.5. <i>Tap1/p53</i> -Mäuse	31
6.6.6. <i>Tap1/Msh2</i> - Mäuse	32
7. Zielsetzung der Arbeit	33
II Material und Methoden	35
1. Material	35
1.1. Modellsysteme	35
1.2. Chemikalien	35
1.3. Verbrauchsmaterialien	38
1.4. Geräte	38
1.5. Analyseprogramme und Datenbanken	39
2. Methoden	40
2.1. Tumorkontrolle der Mauslinien (monitoring)	40
2.2. Probengewinnung	40
2.2.1. Tumorgewebe für histologische Befundung	40
2.2.2. Probengewinnung für Immunphänotypisierung und RNA-Isolation	41

2.3. Histologische Methoden	41
2.4. Immunphänotypisierung mittels FACs-Analyse	42
2.5. DNA-Methoden.....	43
2.5.1. Mikrosatelliteninstabilitäts-(MSI-)Assay	47
2.6. RNA-Methoden.....	49
2.6.1. Genexpressionsanalyse (RT-PCR).....	49
III Ergebnisse	51
1. Tumorgenese in Mlh1 defizienten Mäusen	51
1.1. Tumorinzidenz und Überlebenskurven Mlh1 defizienter Mäuse	52
1.2. Lymphomagenese in Mlh1 defizienten Mäusen	54
1.2.1. Charakterisierung der Lymphome.....	55
1.2.1.1. Einteilung neoplastisch veränderter lymphatischer Organe nach Tumorlokalisierung	55
1.2.1.2. Histologische Befundung der lymphoiden Tumoren	56
1.2.1.3. Immunphänotypisierung der Lymphome	59
1.2.1.4. Genexpressionsprofile der Lymphome anhand von Differenzierungsmarkern	62
1.2.1.5. Lokalisation der Lymphome.....	64
1.2.1.6. MHC Klasse I-Molekülexpression der Lymphome.....	65
1.2.1.7. RAE-1- und Mult1-Expression der Lymphome	66
1.2.2. Mikrosatelliteninstabilität der Lymphome von <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Mäusen.....	69
1.3. Gastrointestinaltumorentwicklung in Mlh1 defizienten Mäusen	72
1.3.1. Histologische Charakterisierung der gastrointestinalen Tumoren	72
2. Einfluß des Immunsystems auf die Abwehr von Tumoren in MMR defizienten Mäusen	74
2.1. Tumorgenese in $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$-Mäusen.....	74
2.1.1. Tumorinzidenz und Überlebenskurven von $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen	74
2.1.1.1. Unterteilung nach dem zeitlichen Auftreten der Tumoreignisse....	77
2.1.2. Charakterisierung der Lymphome in $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen	78
2.1.2.1. Immunphänotypisierung der Lymphome.....	78
2.1.2.2. Genexpressionsprofile der Lymphome anhand von Differenzierungsmarkern.....	79
2.1.2.3. Lokalisation der Lymphome	80
2.1.2.4. MHC Klasse I-Moleküle und streßinduzierte NK-Zell-aktivierende Liganden	82
2.1.3. Gastrointestinaltumorentwicklung in $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen.....	83
2.1.4. Tumorgenese in $\beta 2m^{+}/Mlh1^{-}$ -Mäusen.....	83
2.1.4.1. Charakterisierung der Lymphome.....	84
2.1.4.2. MHC Klasse I Moleküle und streßinduzierte NK-Zell-aktivierende Liganden	86
2.1.4.3. Gastrointestinaltumorgenese	87
2.1.5. Vergleich der $\beta 2m/Mlh1$ - und <i>Mlh1</i> -Mauspopulationen	87
2.2. Die Bedeutung der Perforin-vermittelten Zell-Lyse für die Entstehung MLH1 defizienter Tumore (<i>pfp</i>⁻/<i>Mlh1</i>⁻-Tiere).....	90
2.2.1. Tumorinzidenz und Überlebenskurven von <i>pfp</i> ⁻ / <i>Mlh1</i> ⁻ -Tieren.....	90
2.2.2. Lymphomagenese in <i>pfp</i> ⁻ / <i>Mlh1</i> ⁻ -Mäusen	93
2.2.2.1. Charakterisierung der Lymphome von <i>pfp</i> ⁻ / <i>Mlh1</i> ⁻ -Mäusen	93
2.2.2.2. Expression von MHC Klasse I-Molekülen und stressinduzierten Liganden bei Lymphomen der <i>pfp</i> ⁻ / <i>Mlh1</i> ⁻ -Tiere	96

2.3. Tumorgenese in <i>pfp</i>^{-/-}/<i>β2m</i>^{-/-}/<i>Mlh1</i>^{-/-}-Tieren.....	99
2.3.1. Tumorinzidenz und Überlebenskurven	99
2.3.2. Charakterisierung der Lymphome in <i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} / <i>β2m</i> ^{-/-} -Mäusen	102
2.3.3. Expression von MHC I und streßinduzierten NK-Zell aktivierenden Liganden in <i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} / <i>β2m</i> ^{-/-} -Lymphomen	106
2.4. Tumorgenese in <i>Rag</i>^{-/-}/<i>Mlh1</i>^{-/-}-Tieren	108
2.4.1. Tumorinzidenz und Überlebenskurven	108
2.4.1.1. Unterteilung des Gesamtüberlebens nach dem zeitlichen Auftreten der Tumoreignisse	110
2.4.2. Lymphomagenese in <i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Mäusen	111
2.4.2.1. Charakterisierung der Lymphome	111
2.4.2.1.1. Morphologie und Histologie der lymphatischen Organe	111
2.4.2.1.2. Immunphänotypisierung der Lymphome	111
2.4.2.1.3. Genexpressionsprofile anhand von Differenzierungsmarkern ..	113
2.4.2.1.4. Lokalisation der Lymphome.....	114
2.4.2.2. Mikrosatelliteninstabilität in Lymphomen von <i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Mäusen	114
2.4.2.3. MHC Klasse I-Moleküle und streßinduzierte NK-Zell-aktivierende Liganden	115
2.4.2.3.1. MHC Klasse I-Molekülexpression der Lymphome	115
2.4.2.3.2. RAE-1- und Mult1-Expression der Lymphome	116
2.4.3. Gastrointestinaltumorentwicklung in <i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Mäusen	118
2.4.3.1. Histologische Charakterisierung der gastrointestinalen Tumoren ...	118
2.4.3.2 Mikrosatelliteninstabilität Gastrointestinaltumoren von <i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} - Mäusen	118
IV Diskussion	121
1. MLH1 defiziente Mäuse als <i>in vivo</i> Modell für auf MMR-Defizienz basierende Tumorgenese.....	121
1.1. Tumorgenese in <i>Mlh1</i> defizienten Mäusen.....	121
1.2. HNPPC-ähnliche Gastrointestinaltumorgenese in <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Mäusen.....	122
1.3. Genomische Instabilität in MMR-defekten Lymphomen	123
1.4. Charakterisierung der Lymphome	123
1.5. Der Einfluss der Expression von MHC Klasse I-Molekülen und MHC Klasse I-ähnlichen Molekülen auf die Immunogenität MMR-defizienter Lymphome ...	126
2. Tumorgenese immuninkompetenter Mäuse mit MMR-Defizienz	129
2.2. Reduziertes Auftreten von Lymphomen in <i>β2m</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Mäusen	130
2.3. <i>β2m</i> -Defizienz beschleunigt die Gastrointestinaltumorgenese	132
2.4. Bereits <i>β2m</i> ^{+/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Mäuse zeigen eine reduzierte Lymphomagenese..	133
2.5. Verstärkte Lymphomentstehung in <i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Mäusen.....	135
2.6. Kumulativer Effekt durch gekoppelte <i>pfp</i> - und <i>β2m</i> -Defizienz in <i>Mlh1</i> ^{-/-} - Tieren	136
2.7. Beschleunigte Gastrointestinal- und aggressivere Lymphomagenese in <i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} -Tieren	138
V Zusammenfassung / Summary	140
VI Abkürzungsindex	144
VII Anhang.....	146
1. <i>Mlh1</i>^{-/-}-Mäuse	146
2. <i>β2m</i>^{-/-}/<i>Mlh1</i>^{-/-}-Mäuse.....	148

3. $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse	150
4. $pfp^{-}/\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ - und $pfp^{-}/\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ - Mäuse.....	152
5. $Rag^{-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse	157
VIII Literatur.....	161

I Einleitung

1. Genomische Instabilität und Tumorgenese

Tumoren entstehen durch eine fortschreitende Anhäufung von genetischen und epigenetischen Veränderungen. Bereits Theodor Boveri (1914) wies auf genomische Instabilitäten als ein Merkmal von Tumoren hin. Man unterteilt heute zwei Arten genomischer Instabilitäten, die bei der Tumorgenese von Bedeutung sind: chromosomale Instabilitäten (CIN) und Mikrosatelliteninstabilitäten (Instabilitäten vom MIN-Typ). Zu den CIN zählen Veränderungen in der Chromosomenzahl, chromosomale Translokationen oder Genamplifikationen (Lengauer, Kinzler et al. 1998). Zu den MIN gehören einfache Sequenz-Änderungen, wie Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder Mikrosatelliteninstabilität. Die **Mikrosatelliteninstabilität** (MSI) resultiert aus der Inaktivierung des Mismatch-Reparatur-Systems (MMR) (und steht im Zusammenhang mit Tumorentwicklung. **Chromosomale Instabilität** (CIN) liegt bei der Mehrheit aller Karzinome vor). Sie führt zu einer differentiellen Expression von Tumorsuppressor- oder Onkogenen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind. Ein gemeinsamer genetischer Defekt dieser Tumoren ließ sich bisher nicht nachweisen. Eine mögliche Erklärung für CIN wären die Deregulationen der Checkpoints, die die DNA-Reparatur oder den Aufbau des Spindelapparates überwachen (Grady 2004).

Kolorektale Karzinome weisen entweder Mikrosatelliteninstabilität oder Chromosomale Instabilität auf. Dieser Verlust der genomischen Stabilität scheint frühzeitig aufzutreten und ein bedeutsames molekulares und pathogenes Ereignis während der Tumorgenese darzustellen. Genomische Instabilität kann Veränderungen in Tumorsuppressor- und Onko-Genen nach sich ziehen. Es wird vermutet, dass die genomische Instabilität eine zentrale Ursache für die Entstehung von Tumoren ist. Interessanterweise scheint eine inverse Relation zwischen MIN und CIN vorzuliegen. MSI-Tumoren sind diploid und zeigen normale Raten chromosomale Aberrationen. Dagegen sind CIN-Tumoren MMR-profizient, weisen Aneuploidie und erhöhte Raten chromosomaler Verluste und Zugewinne auf (Grady 2004). Dies lässt vermuten, dass es sich bei den zugrundeliegenden genetischen Defekten um unabhängige Systeme handelt.

2. Das Mismatch-Reparatur System

Das DNA-Mismatch-Reparatur System ist das einzig bekannte postreplikativ arbeitende DNA Reparatur-System. Es ist eines von verschiedenen Replikations-, Reparatur- und Rekombinations-Prozessen. Die MMR-Aktivität ist für den Erhalt der genomischen Stabilität in Prokaryoten und Eukaryoten notwendig. Erstmals in Prokaryoten beschrieben (Wagner and Meselson 1976), zeigte sich bereits früh seine Bedeutung für den Menschen. Defekte im MMR-System wurde als Ursache für die Entstehung des hereditärem nicht-polypösen kolorektalem Karzinom (HNPCC) und anderen Tumorarten beschrieben (Cox, Degnen et al. 1972).

2.1. Prokaryotisches MMR-System

Die Isolation von Escherichia coli-Stämmen (E. coli) mit einer erhöhten Frequenz an spontanen Mutationen (Mutator-Phänotyp) führte zur Identifikation von vier „Mutator-Genen“, die eine zentrale Rolle im Mismatch-Reparatur-System spielen: *mutS*, *mutL*, *mutH* und *mutU*. Die Charakterisierung der Funktionen der *mut*-Gene bei der Korrektur von Replikationsfehlern wurde durch die Aufreinigung von Protein-Produkten und der *in vitro*-Rekonstitution der E.coli MMR-Reaktion herausgefunden (Modrich and Lahue 1996). Die Hauptfunktionen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

MutS ist eine ATPase, die als Homodimer in der Lage ist an Base/Base-Mismatches oder kleine Insertions- oder Deletions-Schleifen (IDLs: insertion/deletion loops) zu binden, welche durch Replikationsfehler der Polymerase hervorgerufen worden sind.

MutH ist für die Unterscheidung des fehlerhaften Tochterstranges und des korrekt zu transkribierenden Elternstranges verantwortlich. Es handelt sich bei *MutH* um eine Endonuklease, die eine Lücke in den Tochterstrang an einer hemi-methylierten GATC-Sequenz einführt (Lahue, Su et al. 1987).

MutL ist auf verschiedene Weise an der Erkennung von MMR-Defekten und damit am Auslösen von MMR downstream-Ereignissen beteiligt:

- (i) Die Komplexbildung eines Homodimeres von *MutL* mit *MutS* verstärkt die ATP-Hydrolyse-abhängige Translokation;
- (ii) *MutL* stimuliert ebenfalls ATP-abhängig die *MutH*-Endonuklease-Aktivität;
- (iii) ist notwendig *MutL* um *MutU* (Helikase II/UvrD) an der Seite der *MutH*-induzierten Lücke zu binden. Hierdurch wird das Entwinden des Tochterstranges und anschließende exonukleolytische Entfernen erleichtert. Für Exzision des MMR-Systems wird hierzu offensichtlich eine der vier DNA-Einzelstrang-spezifischen Exonukleasen (RecJ, ExoVII, ExoI oder ExoX) benötigt.
- (iv) Zur Resynthese und Ligation des korregierten Tochterstranges sind das Einzelstrang-bindende Protein (SSB: single-strand binding protein), das DNA-Polymerase III-Holoenzym und die DNA-Ligase notwendig (Buermeyer, Deschenes et al. 1999).

Die Ergebnisse verschiedener Studien (Grilley, Stock et al. 1998; Robertson, Pattishall et al. 2006) legten die Vermutung nahe, dass die ATP-Bindung und Hydrolyse durch *MutL* wichtig für die MMR-Aktivität sind. Die N-terminale Domäne von *MutL* weist konservierte ATP-Bindungs- und Hydrolyse-Domänen von Hsp90, GyrB und anderen Proteinen auf. Biochemische Analysen zeigten, das *MutL*

tätlich eine schwache ATPase-Bindungs- und Hydrolyse-Aktivität besitzt. Weiter wurde gezeigt, dass die ATP-Bindung konformelle Änderungen hervorruft und die Dimerisation des N-Terminus im *MutL*-Homodimer bewirkt. Diese strukturellen Änderungen scheinen Interaktionen mit anderen –an der MMR beteiligten- Proteinen wie *MutH* zu ermöglichen und so den MMR-Prozess zu koordinieren (Buermeyer, Deschenes et al. 1999).

Ban und Yang beschrieben die Kristallstruktur von LN40, dem konservierten N-terminalen Mut L-Fragmentes aus *Escherichia coli*. Sie zeigten, dass *MutL* an der DNA bindet und *MutH* für die DNA-Reparatur aktiviert (Ban and Yang 1998). Zusätzlich demonstrierten sie, dass es sich bei *MutL* auch um eine ATPase handelt und die ATP-Bindung eine Konformationsänderung im *MutL* bewirkt. Vermutlich sind es eben diese ATP-abhängigen Konformationsänderungen, die die Interaktion des *MutL* mit den anderen Komponenten der DNA-Maschinerie regulieren. Im strukturbasierten Sequenzvergleich von LN40 mit der Gyrase *NgyrB* liegt eine Übereinstimmung von mehr als 30% vor. Dies weist darauf hin, dass sich beide Moleküle aus einem gemeinsamen „Vorfahren“ entwickelt haben könnten (Ban and Yang 1998).

2.2. Eukaryotisches MMR-System

In Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) und Säugetieren sind die verschiedenen vorhandenen MutS- und MutL-Homologen zwischen den Spezies insbesondere in den unterschiedlichen funktionellen Domänen (z.B. der ATPase Domäne) hochkonserviert. Dies spiegelt die Erhaltung des MMR-Prozesses, aber auch eine Spezialisierung und Funktionsüberlappungen der MMR-Genprodukte wider. In Eukaryonten wurden verschiedene MutS-Homologe (MSH1-6) und MutL-Homologe identifiziert. *MutH*-Homologe wurden in *S. cerevisiae* und Säugetieren bisher nicht gefunden (siehe Tabelle 2.2.a).

	<i>E.coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens / M. musculus</i>
MutS		Msh2, Msh6, Msh3 Msh1 Msh4, Msh5	Msh2 ^a , Msh6 ^a , Msh3 `_b Msh4, Msh5
MutL		Mlh1, Pms1 Mlh2, Mlh3	Mlh1 ^a Pms2 ^a Pms1 ^a , Mlh3
MutH		`_b	`_b
MutU (UvrD)		`_b	`_b

Tab. 2.2.a: „Mut“-Homologe

^aMutationen in Krebsfamilien gefunden, ^bnicht identifiziert.
Modifizierte Tabelle (Buermeyer, Deschenes et al. 1999)

2.3. Komponenten des eukaryotischen MMR-Systems

MutS-Homologe:

Msh1 ist für die normale mitochondriale Funktion in *S. cerevisiae* notwendig und schützt vor Basen-Austauschen und Frameshifts im mitochondrialen Genom (Reenan and Kolodner 1992; Chi and Kolodner 1994). In Säugern liessen sich bisher keine Msh1-Homologe nachweisen. Msh4 und Msh5 besitzen spezielle Funktionen in der meiotischen Rekombination (gezeigt in Hefen und „knock-out“-Mäusen), scheinen aber keine Bedeutung im meiotischen MMR System zu besitzen. MSH2, MSH3 und MSH6 bilden zwei Heterodimere, MutS α (MSH2/MSH6) und MutS β (MSH2/MSH3), die Fehlpaarungen in der DNA erkennen. MSH6 ist notwendig für die Korrektur von Einzelbasen-Fehlpaarungen. MSH3 (und MSH6) sind bei der Reparatur von Insertions-/Deletions-Schleifen beteiligt. MSH2 und MSH6 besitzen (wie die bakteriellen MutS) intrinsische ATP-Bindungs- und -Hydrolyse-Aktivität, welche für die Mismatch Reparatur notwendig ist (Buermeyer, Deschenes et al. 1999).

MutL-Homologe:

MLH1, PMS2 (Pms1 in Hefen) und PMS1 (Mlh3 in Hefen (Kondo, Horii et al. 2001) können ebenfalls zwei Heterodimere ausbilden, MutL α (MLH1/PMS2, bei Säugern) und MutL β (MLH1/PMS1, bei Säugern). Im Anschluss an die Erkennung der Fehlpaarung durch die MutS-Homologe vermittelt das MutL α -Homolog die Bildung des Mismatch-Erkennungs-Komplexes. Darauf folgt die Aktivierung anderer, für die DNA-Reparatur notwendiger Proteine. Hierzu gehören die Exonuklease I (EXO1), möglicherweise Helikase(n), das PCNA (proliferating cell nuclear antigen), das RPA (single-stranded DNA-binding protein) sowie die DNA Polymerasen δ und ϵ (Peltomaki 2003). Es gibt Hinweise, dass die MMR-Aktivität scheinbar von der ATP-Bindungs- und/oder -Hydrolyse-Aktivität der hochkonservierten N-Termini von MLH1 und PMS2 abhängig ist (Modrich 1987). Tatsächlich ist ein signifikanter Anteil der HNPCC-missense-Mutationen genau in dem N-Terminus von MLH1 lokalisiert.

Für die Korrektur von Mismatches scheint MutL β (MLH1/PMS1) nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Mlh3 wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. Sein Genprodukt (scMlh3p) bindet scMlh1p und ist an der meiotischen Rekombination beteiligt (Flores-Rozas and Kolodner 1998). Mlh3 Mutanten besitzen einen ähnlichen Mutatorphenotyp wie Msh3-defiziente Stämme. Daher wird vermutet das beide Peptide bei der Reparatur einer Untergruppe von Insertions-/Deletions-Schleifen involviert sind (Cannavo, Marra et al. 2005).

2.4. Funktion des MMR-Systems

Die primäre Funktion des MMR-System ist es Einzelbasen-Fehlpaarungen und Insertions-/Deletions-Schleifen zu eliminieren. Während der Replikation treten solche Fehler durchschnittlich in einer von $1 \cdot 10^7$ - 10^8 replizierten Basen auf. In den Reparaturprozess sind sechs verschiedene MMR-Proteine involviert: MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS1 und PMS2. Während die MutS Komplexe den DNA-Schaden erkennen, erfolgt durch die Rekrutierung des MutL Komplexes die Ausbildung eines multidimeren Komplexes. Dieser Komplex ist in der Lage die eigentliche Reparatur einzuleiten. Die Abb. 2.4.a stellt ein vereinfachtes Modell der Mismatch-Reparatur in

Eukaryoten dar, dass die Ergebnisse genetischer und molekularer Untersuchungen an Prokaryonten und Eukaryonten zusammenfasst. Der Prozess der Mismatch-Reparatur verläuft in drei Hauptschritten:

- (i) Erkennung der Fehlpaarungen durch MutS α (MSH2/MSH6) oder MutS β (MSH2/MSH3). Die verschiedenen MutS-Homologe binden an Fehlpaarungen (Mismatches) in der DNA.
- (ii) Rekrutierung von MutL α (MLH1/PMS2). Vermittelt durch MLH1 wird ein multimerer MMR-Komplex aus MutS- und MutL-Homologen gebildet.
- (iii) Dies führt zu der Aktivierung einer Kaskade von DNA-reparierenden Enzymen (wie Exonukleasen, DNA-Polymerasen und Ligasen), welche die Fehlpaarung (Mismatch) des Tochterstranges entfernen und korrigieren.

Ebenso wie die MutS-Homologe interagieren die verschiedenen MutL-Homologe miteinander und bilden heterodimere Komplexe. Drei dieser Komplexe wurden als MutL α (MLH1/PMS2), MutL β (MLH1/PMS1) und MutL γ (MLH1/MLH3) beschrieben. Für die MMR in mitotischen Zellen ist hauptsächlich der MutL α -Komplex aus MLH1/PMS2 verantwortlich. Dieses Protein interagiert mit MutS α und MutS β , ähnlich, wie dies bei den bakteriellen MutS und MutL. Diese Interaktion ist für die folgenden Schritte der MMR essentiell (Buermeyer, Deschenes et al. 1999).

Die entscheidenden Komponenten des MMR-Systems für die Erkennung von Fehlpaarungen und dem Aktivieren der DNA-reparierenden Enzyme sind bei Eukaryonten also die MutS-Homologe MutS α (MSH2/MSH6) und MutS β (MSH2/MSH3). Darüber hinaus besitzen die MMR-Gene noch weitere Funktionen in anderen Systemen, wie beispielsweise der meiotischen Zellteilung, der Replikation und dem B-Zell-Switching (Schrader, Vardo et al. 2002). Für die vorliegende Arbeit steht die Funktion der MMR-Reparatur im Vordergrund, die oben erwähnten Funktionen werden daher nicht weiter besprochen.

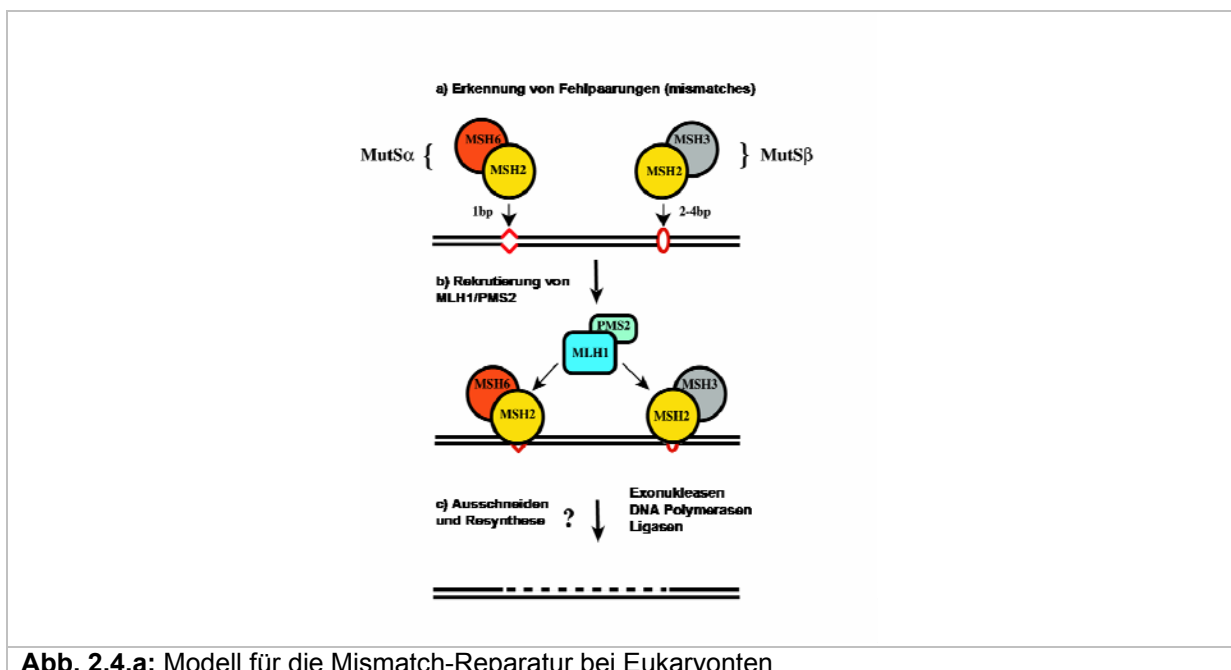


Abb. 2.4.a: Modell für die Mismatch-Reparatur bei Eukaryonten

2.5. Mikrosatelliteninstabilität als Charakteristikum für MMR-Defekte

Mikrosatelliten sind kurze hochrepetitive Nukleotidsequenzen von Mono-, Di-, Tri- oder Tetranukleotiden, beispielsweise (A)_n, (CA)_n oder (GATA)_n, wobei sich n für gewöhnlich in der Größenordnung von 5-30 Basenpaaren bewegt. Die Mikrosatelliten sind über das gesamte Genom verbreitet, ihre Funktion ist bisher noch ungeklärt. Sie sind anfällig für postreplikativ auftretende Insertions- oder Deletions-Mutationen. Normalerweise werden diese durch die vorhandene proofreading-Kapazität der DNA-Polymerase und durch die Mismatch-Reparatur-Aktivität korrigiert. Bei einem defekten MMR-System häufen sich Fehler in den Mikrosatelliten an. Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist ein Merkmal für eine vorliegende Mismatch-Reparatur-Defizienz, die Zellen werden als mikrosatelliteninstabil (MSI) bezeichnet (Claij and te Riele 1999). Diese Tendenz zu Mutationen, welche aufgrund von Lesefehlern der Polymerase entstehen (MMR-Defekte), führt postreplikativ zu nachweisbaren Längenpolymorphismen in repetitiven Sequenzen des Genoms. An MMR defizienten Zellen wurde gezeigt, dass diese mit erhöhter Wahrscheinlichkeit Instabilitäten in Mikrosatelliten aufweisen können (Gu, Cline-Brown et al. 2002). Die Analyse von Mikrosatelliteninstabilität in Tumorproben eignet sich daher Mutationen in MMR-Genen (beispielsweise bei HNPCC) hervorgerufene MMR-Defizienz festzustellen.

3. Tumorgenese aufgrund von MMR-Defekten

Die Beobachtung von Mikrosatelliteninstabilitäten in Tumorgewebe verglichen mit „Normalgewebe“ desselben Patienten war der erste Hinweis, dass eine mögliche Verbindung zwischen Defekten in DNA-Reparatur-Mechanismen und humanen Krebserkrankungen besteht. So wurden bei der erblichen Form des nicht-polypösen Kolorektalem Karzinoms, dem HNPCC (hereditäres nicht polypöses Kolorektales Karzinom) Mikrosatelliteninstabilitäten in der Tumor-DNA im Vergleich mit Nicht-Tumor-DNA derselben Patienten festgestellt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust der MMR-Funktion der Grund für die mikrosatelliteninstabilen Tumoren sein könnte (Strand, Prolla et al. 1993). Bereits 1997 wurden erstmals Keimbahnmutationen in den MMR-Genen von HNPCC-Patienten nachgewiesen (Peltomaki and de la Chapelle 1997). Inzwischen gilt als gesichert, dass Mutationen in MMR-Genen und die daraus resultierenden MMR-Defekte die Ursache des HNPCC darstellen. In den letzten Jahren wurden auch in sporadischen Tumoren verschiedener Entitäten Mikrosatelliteninstabilitäten und/oder Defekte in MMR-Genen nachgewiesen.

Dies verdeutlicht, dass MMR-Defekte nicht nur bei erblichen Tumorerkrankungen bedeutsam sind. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass ein fehlendes oder defektes MMR-System eine Ursache für die Tumorentwicklung ist.

3.1. Der Mutationsphänotyp

Die in normalen Zellen auftretende spontane Mutationsrate erklärt kaum die gehäufte Anzahl an Mutationen, die in humanen Tumorzellen nachweisbar sind. Dieser Phänotyp resultiert aus Mutationen in Genen, deren Funktion u.a. in der Gewährleistung der genomischen Stabilität liegt. Er manifestiert sich durch eine erhöhte Mutationsrate und der genetischen Evolution speziell von Krebszellen mit gesteigerter Tumorprogressionsneigung (Loeb 2001). Dieses Akkumulieren von Mutationen in verschiedenen (nicht zuletzt für die Tumorgenese relevanten) Genen wird als Mutationsphänotyp bezeichnet. Durch diese Alterationen erlangen Tumorzellen einen Wachstumsvorteil, welcher die klonale Vermehrung der veränderten Zellen ermöglicht. Veränderungen mit klonalen Expansionen treten als Folge weiterer neoplastischer Differenzierungsschritte auf.

Die komplex erscheinenden Karyotypen von Kolon-, Brust-, Lungen- und Prostata-Tumoren implizieren, dass eine grössere Anzahl von genetischen Veränderungen für die solche Tumorerkrankungen auftreten müssen (geschätzt etwa 6-10 Mutationen). Theoretisch müssten sich im Laufe eines Menschenlebens für die Tumorentstehung viele genetische Alterationen akkumulieren, um genetisch instabile Tumorzellen hervorbringen zu können. Für eine sich entwickelnde Tumor-Zelle, im Vergleich zu den nicht-malignen Zelltypen, wäre eine wesentlich höhere Mutationsrate (aufgrund eines MMR-Defektes) von Vorteil (Jallepalli and Lengauer 2001). Diese „**Mutator-Hypothese**“ liess sich im Fall der kolorektalen Karzinome weitestgehend bestätigen (Loeb 1991).

Sowohl klassische Chromosomen-Bindungsstudien, als auch neuere molekulare cytogenetische Techniken (beispielsweise Comparative Genomic Hybridization, CGH; Multiplex Fluorescence in situ Hybridization, M-FISH und Spektral Karyotyping, SKY) zeigen, dass die meisten Krebsarten hochgradige Aneuploidie, d.h. veränderte

Chromosomenzahlen besitzen und häufig strukturelle Alterationen (wie Translokationen, Deletionen und Amplifikationen), aufweisen.

Die mikrosatelliteninstabilen Tumoren von HNPCC-Patienten sind in der Regel diploid und weisen keine erhöhten Raten an Chromosom-Verlusten und -Zugewinnen gegenüber normalen humanen Zellen auf. Demgegenüber MSI-stabile Darmtumorarten in der Regel hochgradig aneuploid. Aus Tumoren isolierte Einzelzellklone zeigen *in vitro* häufig hohe Raten an Chromosom-Verlusten und -Zugewinnen (mit starken Variabilitäten in den Karyotypen von Zelle zu Zelle). Diese als chromosomale Instabilität (CIN) bezeichnete Form genetischer Instabilität wurde auch in anderen soliden Tumoren, wie Brust-, Prostata-, Oropharyngeal- und Lungentumoren nachgewiesen. CIN-Darmtumoren sind -im Gegensatz zu den MIN-Tumoren- im Allgemeinen nicht mikrosatelliteninstabil, d.h. sie zeigen auf Nukleotid-Sequenzebene keine erhöhten Instabilitäten.

Zumindest bei den Darmtumoren sprechen die Ergebnisse dafür, dass MIN und CIN für die Tumorgenese notwendige, äquivalente Mechanismen sind um genetische Alterationen zu erlangen. CIN erscheint für die meisten sporadisch vorkommenden soliden Tumoren als der bedeutsamere Funktionsmechanismus (Pathway). Dagegen wird offensichtlich bei erblichen Mutationen, die zu einem MIN-Phänotyp führen, die Notwendigkeit einer chromosomalen Instabilität während der kolorektalen Tumorgenese umgangen (Jallepalli and Lengauer 2001).

3.2. Erbliche Defekte in MMR-Genen und Tumorgenese

Das durch MMR-Defizienz hervorgerufene hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) ist eine der am besten untersuchte erbliche Tumorerkrankung. Erstmals von Aldred Warthin 1913 beschrieben, gelang es Watson und Lynch das Tumorspektrum sowie das autosomal-dominante Vererbungsmuster dieser Erkrankung aufzuzeigen. Der Anteil der HNPCC-Fälle macht etwa 1-3% aller kolorektalen Tumoren aus (Chung and Rustgi 2003). Die Gegenwart, beziehungsweise das Fehlen, extrakolonischer Tumoren erlaubt eine Unterteilung des HNPCC in das Lynch I-Syndrom (nur kolorektale Karzinome) und das Lynch II-Syndrom (kolorektale und extrakolonische Tumoren).

Eine molekulare Definition des HNPCC-Syndroms bedarf des Nachweises vererbter Defekte im Mismatch-Reparatur-System. Keimbahnmutationen in einem von vier hauptsächlich mit HNPCC-verbundenen MMR-Genen (MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2) werden in ca 90% der –nach den Amsterdamkriterien eingeteilten- Familien gefunden. Die mit der MMR-Defizienz einhergehende Mikrosatelliteninstabilität (MSI), dient als diagnostisches Mittel zur Erkennung von HNPCC-Fällen.

Bisher ließen sich mehr als 400 verschiedene Mutationen in den verschiedenen MMR-Genen nachweisen. Ca. 50% betreffen das MLH1-Gen, ~40% MSH2 und ~10% MSH6. Der Anteil von Mutationen im PMS2-Gen liegt unter 5% (Peltomaki 2003). Das erst kürzlich identifizierte MLH3-Gen könnte ebenfalls zu einem kleinen Prozentsatz in HNPCC- oder HNPCC-ähnlichen Familien mutiert sein (Hienonen, Laiho et al. 2003). In weiteren, bei der MMR beteiligten Genen, wie dem PMS1, der Exonuklease I (EXO1) und der DNA Polymerase δ wurden ebenfalls Mutationen in HNPCC-Patienten beschrieben. Um eine sichere Aussage über die Relevanz

solcher Mutationen für die HNPCC-Prädisposition zu treffen, reichen die bisher verfügbaren Daten nicht (Peltomaki 2003).

3.3. Sporadische Defekte in MMR-Genen und Tumorgenese

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) tritt in ungefähr 10-15% der sporadischen Tumoren im Kolon/Rektum auf. Kolorektale Karzinome mit hoher Mikrosatelliteninstabilität sind häufig im proximalen Teil des Kolons lokalisiert und weisen einen diploiden DNA-Gehalt auf. Patienten mit diesen Tumoren haben eine bessere Überlebensprognose (Peltomaki 2003). Mögliche Gründe für die bessere Prognose für Patienten mit mikrosatelliteninstabilen Tumoren sind u.a. die geringen Metastasierungstendenzen und eine höhere Immunogenität.

Als eine Ursache der MMR-Defekte in den sporadischen Tumoren wurde die Hypermethylierung des *hMLH1*-Promoters beschrieben (Ahuja, Mohan et al. 1997). Dies führt zu einer Reduktion an synthetisiertem hMLH1-Protein (Chung and Rustgi 2003). Diese Art der Inaktivierung der MLH1-Expression erfolgt bei sporadischen Tumoren öfter als beispielsweise somatische Mutationen oder LOH (loss of heterozygosity) des *MLH1*-Genes. Letztere stellen die hauptsächlichen Mechanismen bei der Inaktivierung der wildtypischen Kopie des MMR-Genes in HNPCC-Tumoren dar (Chung and Rustgi 2003). MLH1-Promotor-Hypermethylierung und/oder MLH1-Proteinverlust ließ sich bereits in nicht-neoplastisch veränderter kolorektaler Mucosa und kolorektalen Adenomen nachweisen, welche als Vorläuferläsionen von Kolonkarzinomen gelten. Desweiteren finden sie sich in atypischen endometrialen Hyperplasien, dem Vorläuferstadium des endometrialen Karzinoms. Die MLH1-Promotor-Hypermethylierung stellt anscheinend ein frühes Ereignis in der Krebsentstehung dar (Peltomaki 2003).

Inzwischen wurden auch MMR Defekte in einer Vielzahl verschiedener Tumorarten beobachtet, d.h. dass MMR-Defekte in verschiedenen Geweben zur Entstehung von Tumoren führen kann. Die Mikrosatelliteninstabilität, die erstmals mit Mismatch Reparatur-Defekten bei Tumoren von HNPCC-Patienten gebracht wurde, zeigte sich auch bei einer Vielzahl von Nicht-HNPCC- und Kolon-Tumoren. Dies sind endometriale, ovariale, gastrische, cervicale, Brust-, Haut-, Lungen-, Prostata- und Blasen-tumoren, sowie Gliome, Leukämien und Lymphome (Review: (Li 2008)). Biochemische Studien bestätigen, dass mikrosatelliteninstabile Zelllinien sporadischer Leukämien, endometrialer, ovarialer, Prostata- und Blasen-tumoren ebenfalls Defekte im strangspezifischen MMR-System besitzen (Drummond, Li et al. 1995; Gu, Cline-Brown et al. 2002; Gu, Wu et al. 2002).

3.4. Erkrankungen im Zusammenhang mit MMR-Defekten

Weitere Krebs-Prädispositionssyndrome mit ähnlichen genetischen und klinischen Charakteristika wie HNPCC sind das Muir-Torre-Syndrom und das Turcot-Syndrom. Am Muir-Torre-Syndrom leidende Patienten entwickeln HNPCC-ähnliche (HNPCC-like cancers), z.B. im Kolon lokalisierte Tumoren, Talgdrüsentumoren oder Lymphome (Cohen 1992; Kruse and Ruzicka 2004). Patienten mit dem Turcot-Syndrom sind durch ein häufiges Auftreten kolorektaler Tumore und Glioblastomen charakterisiert (Paraf, Jothy et al. 1997).

Ein ähnlich frühes Auftreten von Tumoren (wie in jungen Turcot's Syndrom-Patienten), sind auf homozygote Mlh1-Keimbahnmutationen zurückzuführenden schwerwiegenden hämatologischen Tumorerkrankungen und Neurofibromatose (NF1) bei Kindern im Alter zwischen 2 und 7 Jahren (Ricciardone, Ozcelik et al. 1999; Wang, Lasset et al. 1999).

Das Muir-Torre-Syndrom (MTS): Das autosomal-dominant vererbte Auftreten von Talgdrüsen-Neoplasien mit gleichzeitigen inneren Tumorerkrankungen wurde erstmals 1967 beschrieben. Häufig treten die MTS-Talgdrüsentumoren vereinzelt und unregelmäßig angeordnet im Gesicht der Patienten auf. Bei etwa $\frac{1}{4}$ der MTS-Patienten entstehen die Talgdrüsentumoren lange vor dem Auftreten innerer Tumorerkrankungen, dessen Spektrum identisch mit dem von HNPCC-Patienten ist. Neben kolorektalen Karzinomen (an denen etwa die Hälfte aller MTS-Patienten leiden) finden sich hauptsächlich noch Tumoren im restlichen Gastrointestinal-Trakt, dem Urogenital-Trakt und (bei Frauen) dem Endometrium. Es wurde postuliert, das MTS eine phänotypische Variante von HNPCC darstellt, da MTS-Fälle gehäuft in Familien mit HNPCC vorkommen (Kruse and Ruzicka 2004). Verschiedene genetische Hinweise sprechen ebenfalls dafür:

- (i) Talgdrüsen- und innere Tumoren von MTS-Patienten wiesen einen hohen Grad an Mikrosatelliteninstabilität (H-MSI) auf (Honchel, Halling et al. 1994);
- (ii) es ließen sich Keimbahnmutationen in dem MMR-Gen *MSH2* bei zwei – am MTS leidenden - Familien aufzeigen.
- (iii) Auch in „knock-out“-Mäusen (*Msh2*^{-/-} und *Mlh1*^{-/-}-Tiere) treten Talgdrüsentumoren neben den inneren Tumorerkrankungen auf (Wei, Kucherlapati et al. 2002).

Turcot's Syndrom: Das Turcot Syndrom ist durch ein familiär gehäuft gemeinsames Auftreten von Primärtumoren des Kolons und des zentralen Nervensystems definiert, wird molekulargenetisch in 2 Gruppen unterteilt: (i) das familiäre Adenomatosis-Polyposis-Syndrom (FAP) und (ii) das hereditäre Nonpolyposis-Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC). Die Turcot-assoziierten zerebralen Tumore sind zu 61% Gliome jeglicher Dignität, zu 25% Medulloblastome. Es wurden aber auch Lymphome, Meningiome, Hypophysenadenome und Kraniopharyngeome beschrieben (Grips, Wentzensen et al. 2002). Untersuchungen von 151 Fällen von BTP- (Brain Tumor-Poyposis) Syndromen zeigten, dass bei einigen Fällen (hauptsächlich bei HNPCC-eingestufteten Patienten) Lymphome auftraten und diese Patienten häufig auch Café-au-lait-Flecken aufwiesen (Paraf, Jothy et al. 1997).

Neurofibromatose I (NF1): Einige Nachkommen von HNPCC-erkrankten Eltern (mit heterozygoten Mutationen in Mlh1-Gen) entwickeln *de novo* Neurofibromatose und extrakolonische Tumoren. NF1 ist eine dominant vererbte Erkrankung, die etwa 1 von 3500 Individuen betrifft und durch die Vererbung eines mutierten Allels, des NF1-Gens, verursacht wird. Klinische Merkmale sind sog. „Café au lait“ Flecken (gesprenkelte Hautpartien), Neurofibrome, Augenglyome, Hämatome der Iris und Knochenläsionen. Die verringerte Fähigkeit genetische Veränderungen reparieren zu können, erhöht die Wahrscheinlichkeit von Mutationen in (Proto-) Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Die Inaktivierung des zweiten Allels des NF1-Gens könnte ein entscheidender Schritt für die Tumorprogression sein. Junge Patienten mit Neurofibromatose tragen ein erhöhtes relatives Risiko für maligne Erkrankungen, wie beispielsweise juvenile myelogene Leukämie und akute myelotische Leukämie.

Diese Beobachtungen zeigen, dass MMR-Defizienz die menschliche Entwicklung nicht unterbricht, jedoch zu Mutationen während der Embryogenese führen kann. Übereinstimmend mit Knudson's „two hit“-Modell für Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen, weisen Tumoren dieser Patienten einen Verlust der Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity) für NF1 auf. In *hMLH1*-defizienten Kindern ist das Risiko eines solchen zweiten Ereignisses durch die konstitutive genetische Instabilität dramatisch erhöht, was das zeitlich frühe Auftreten und die Art der Tumoren erklärt (Wang, Lasset et al. 1999).

Auch andere Gruppen beschreiben die Verbindung von früher Entwicklung von multiplen Kolonkarzinomen, Lymphomen und klinischen Merkmalen einer *de novo* NF1 (Pratt, Parham et al. 1988). Anhand von Tiermodellen wiesen Gutmann et al. eine beschleunigte Erkrankungsrate in *Mlh1^{-/-}/Nf1^{+/-}*-Mäusen gegenüber den *Nf1^{-/-}*- oder *Mlh1^{-/-}*-Tieren nach (Gutmann, Winkler et al. 2003).

3.5. Mausmodelle mit MMR-Defekten

Um den Zusammenhang zwischen MMR-Defizienz und Tumorgenese funktionell zu untersuchen wurden transgene Mäuse mit Mutationen in MutS- und MutL-Homologen generiert. Bei den MutS-Homologen sind dies MSH2-, MSH6- und MSH3-defiziente Mauslinien, bei den MutL-Homologen MLH1-, MLH3- PMS2- und PMS1-defiziente Mauslinien (Baker, Bronner et al. 1995; Edelmann, Cohen et al. 1996; Reitmair, Redston et al. 1996; de Wind, Dekker et al. 1998; Edelmann, Umar et al. 2000; Wei, Kucherlapati et al. 2002).

Die *Msh2^{-/-}*-Maus: Die Embryonalentwicklung *Msh2* defizienter Mäuse verläuft normal; sowohl die *Msh2^{-/-}*-Weibchen als auch die Männchen sind fertil. Die Überlebensspanne in den *Msh2^{-/-}*-Tieren gegenüber wildtypischen Tieren ist jedoch signifikant verkürzt (de Wind, Dekker et al. 1998). Innerhalb von 12 Monaten verstarben alle *Msh2^{-/-}*-Tiere, 50% der Tiere wurden nicht älter als 6 Monate. Die Letalität ist auf den starken Tumor-Prädispositions-Phänotyp der *Msh2^{-/-}*-Mäuse zurückzuführen. Etwa 80-90% der Mäuse entwickelten lymphoide Tumore. In einem Teil der Tiere die älter als 6 Monate wurden, manifestierten sich Adenome und Adenokarzinome im Dünndarm. Vereinzelt wurden auch Talgdrüsen-Tumoren nachgewiesen, die ähnliche Charakteristika der Tumoren von Muir-Torre-Patienten aufweisen (Reitmair, Redston et al. 1996; de Wind, Dekker et al. 1998).

Zellen von *Msh2^{-/-}*-Mäusen sind Mismatch-Reparatur-Defizient, sie zeigen erhöhte Mutationsraten mit einer hohen Mikrosatelliteninstabilität in den Tumoren. Phänotypisch ähneln insbesondere die gastrointestinalen Tumoren und die Talgdrüsentumoren den bei HNPCC-Patienten vorkommenden Tumoren (Wei, Kucherlapati et al. 2002).

***Msh6^{-/-}*- und *Msh3^{-/-}*-Mäuse:** Die *Msh3*- und auch die *Msh6* defizienten Tiere zeigen wie die *Msh2* defizienten Mäuse eine normale Fertilität. *Msh6^{-/-}*-Mäuse entwickeln eine Vielzahl von Tumoren (gastrointestinale Neoplasien eingeschlossen), allerdings zu einem späteren Zeitpunkt als *Msh2* defiziente Tiere. Dagegen zeigen *Msh3* Mäuse keinen eigentlichen Tumor-Phänotyp (Edelmann, Umar et al. 2000). Der drastischere Phänotyp in den *Msh6*-Mäusen (gegenüber den *Msh3*-Tieren) spricht dafür, dass der MutS α -Komplex eine wichtigere Rolle in der Tumervermeidung spielt. Mäuse, mit Defizienz in beiden Genen (*MSH6* und *MSH3*), ähneln hinsichtlich ihres Tumorphänotypes den *Msh2* defizienten Tieren. Diese Resultate spiegeln wiederum

die Redundanz von MSH3 und MSH6 in Bezug auf ihre Funktion bei der Mismatch-Reparatur wider (Edelmann, Umar et al. 2000).

Die *Mlh1*^{-/-}-Maus: *Mlh1* defiziente Mäuse tragen eine Nullmutation in dem *Mlh1*-Gen. Die Tiere weisen normales Wachstum und Entwicklung auf. Ihre Zellen sind hinsichtlich ihrer Mismatch-Reparatur-Aktivität defizient (Edelmann, Cohen et al. 1996). *Mlh1* mutante Mäuse haben eine reduzierte Lebensspanne gegenüber wildtypischen Tieren. 50% der *Mlh1*^{-/-}-Tiere starben innerhalb der ersten 7 Monate. Todesursache war bei 72% der *Mlh1*^{-/-}-Mäuse die Ausbildung von Tumoren. Da hier die verstorbenen Tiere nicht näher untersucht wurden, ist es möglich, dass die angegebene Tumorfrequenz in dieser Studie als zu niedrig bemessen wurde. Tumoren außerhalb des lymphatischen Systems kamen in gleicher Anzahl vor wie lymphoide Tumoren. Innerhalb der Gruppe der nicht-lymphoiden Tumoren dominierte das Auftreten von gastrointestinalen Tumoren. *Mlh1* defiziente Tiere entwickeln HNPCC-ähnliche Adenome und Adenokarzinome, Lymphome vom B- und T-Zelltyp und andere Tumoren. Sie ähneln bezüglich des Tumorauftritts und der Lebensdauer den *Msh2* defizienten Mäusen (Wei, Kucherlapati et al. 2002). Die *Mlh1*^{+/-}-Mäuse besitzen ebenfalls einen Tumorphänotyp: 50% der *Mlh1*^{+/-}-Mäuse verstarben innerhalb von 18 Monaten, 32% der *Mlh1*^{+/-}-Tiere entwickelten Tumoren. Eine weitere Arbeitsgruppe generierte ebenfalls *Mlh1* defiziente Mäuse. Auch hier wurde unter anderem das Auftreten lymphoider Tumoren festgestellt (Baker, Plug et al. 1996).

Homozygote Männchen zeigen ein normales Paarungsverhalten, entwickeln aber keine reifen Spermien. Meiotische Zellen dieser Tiere weisen einen Meiose I-Arrest auf. Die homozygoten Weibchen besitzen einen normalen Östrogen-Zyklus und ein normales Reproduktions- und Paarungsverhalten, sind allerdings ebenfalls unfruchtbar. Die produzierten Oozyten entwickeln sich nicht über das Einzell-Stadium hinaus. Auch hier kommt es zu einem apoptotischen Absterben im Pachynema der Meiose I. In diesem Phänotyp unterscheiden sich die *Mlh1*-mutanten Mäuse von *Msh2*- und *Pms2*-defizienten Tieren (Edelmann, Cohen et al. 1996).

***Pms2*^{-/-}-Maus:** Auch die *Pms2*^{-/-}-Mäuse zeigen einen Tumorphänotyp. Hauptsächlich entwickeln sie Lymphome, seltener Sarkome. Dagegen wurden keine Tumoren im Gastrointestinaltrakt oder den Talgdrüsen nachgewiesen. Die Tumoren traten innerhalb der ersten 6 Monate auf und waren zudem mikrosatelliteninstabil (Baker, Bronner et al. 1995).

***Pms1*^{-/-}-Maus:** *Pms1*^{-/-}-Mäuse sind bis zu einem Alter von 15 Monaten tumorfrei und weisen eine normale Lebensspanne auf. Beide Geschlechter entwickeln sich normal und sind fertil.

Aus den Untersuchungen an den verschiedenen Mausmodellen wird deutlich, dass das Ausfallen von *Mlh1* oder *Msh2* die MMR-vermittelte Tumervermeidung komplett inaktivieren kann. Der Tumorphänotyp der *Pms2*-Mäuse belegt, dass der funktionelle MutL α -Komplex für die Tumervermeidung durch das MMR-System notwendig ist. *Pms1* (bzw. dem MutL β -Komplex) scheint dagegen nur eine untergeordnete (oder gar keine) Rolle zu spielen (Wei, Kucherlapati et al. 2002).

4. Lymphomentstehung aufgrund von MMR-Defekten

4.1. MMR-Defekte in humanen Lymphompatienten

Mitotische Zellen benötigen ein intaktes Mismatch-Reparatur-System. Im Rahmen der kolorektalen Tumorgenese spielen MMR-Defekte eine wesentliche Rolle. MMR-Defizienz als Ursache einer Lymphomentwicklung wurde dagegen nur selten beschrieben. Trotzdem liegen einige Daten vor, die für eine Kausalität von Defekten im MMR-System und einer daraus resultierenden Lymphomagenese sprechen.

1. Lymphome in HNPCC-Patienten: Bei HNPCC-Patienten kommen Lymphomkrankungen nur selten vor und zählen zwar nicht zum klassischen HNPCC-Tumorspektrum, die bisher beschriebenen Fälle weisen jedoch starke Ähnlichkeiten zu den in Mlh1 defizienten Mäusen gefundenen Lymphomen auf. Bisher sind drei Fälle aus HNPCC-Familien mit Lymphomentwicklungen beschrieben (Ricciardone, Ozcelik et al. 1999; Wang, Lasset et al. 1999; Vilkki, Tsao et al. 2001). Die Lymphomentstehung scheint eher durch homozygote Mutationen in MMR-Genen zurückzuführen zu sein, da drei voneinander unabhängige Fallbeschreibungen zeigten, dass jeweils beide Elternteile der an lymphoiden Tumoren erkrankten Kinder Heterozygotie in MMR-Genen besaßen (Ricciardone, Ozcelik et al. 1999; Wang, Lasset et al. 1999; Whiteside, McLeod et al. 2002).

In den Varianten des HNPCC, dem Muir-Torre-Syndrom und dem Turcot's-Syndrom, bei denen ebenfalls lymphozytäre Erkrankungen auftreten, werden ebenfalls MMR-Mutationen beschrieben (Cohen 1992; Hamilton, Liu et al. 1995).

Aus welchem Grund bei HNPCC Patienten, welche durch die Entwicklung von Tumoren in mitotisch aktiven Geweben charakterisiert sind, nur eine sehr geringe Inzidenz von Lymphomen auftritt, ist zurzeit unklar. Da onkogene Mutationen in MMR-defizienten Zellen stärker in Geweben mit hoher Teilungsrate auftreten, wäre aufgrund der hohen mitotischen Aktivität des Immunsystems ein häufiges von Lymphomen/Leukämien zu erwarten.

2. Sporadisch auftretende humane Lymphome: In 15-20% sporadisch auftretender humaner Tumorarten wurden Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) oder Defekte in Mismatch-Reparatur-Genen nachgewiesen (Aaltonen, Peltomaki et al. 1993; Ionov, Peinado et al. 1993).

Die MSI-Analyse unterschiedlicher Lymphomentitäten zeigte eine vergleichsweise geringe Frequenz mikrosatelliteninstabiler Lymphome bei immunprofizienten Patienten. Dagegen wurde in Lymphomen immundefizienter Patienten (IDRLs und HIV-RL) Mikrosatelliteninstabilitäten detektiert, was auf Defekte im Mismatch-Reparatursystem hindeutet (Bedi, Westra et al. 1995; Larson, Scott et al. 1996; Gamberi, Gaidano et al. 1997; Larson, Manning et al. 1997).

Aufgrund des Tumorspektrums in HNPCC Patienten und der Häufung von mikrosatelliteninstabilen sporadisch auftretenden Tumoren in bestimmten Geweben (z.B. Darm und Endometrium) kann eine Gewebsspezifität der durch MMR-Defizienz hervorgerufenen Tumorgenese vermutet werden. Die Ursache dieser Präferenz von Mikrosatelliteninstabilität in einigen Tumorarten ist bisher weitestgehend ungeklärt (Chao and Lipkin 2006).

3. Lymphomagenese in immunsuppremierten Patienten: Eine Vermutung ist, dass dem wirtseigenen Immunsystem in der Abwehr MMR defekter Lymphome eine wesentliche Rolle zukommt. Hierfür sprechen die Untersuchungen an insgesamt 603 humaner Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sowie sog. „immunodeficiency-related lymphomas“ (ID-RL) (Duval, Raphael et al. 2004). Bei den ID-RL handelt es sich um Lymphome von Patienten mit funktionell beeinträchtigtem Immunsystem. Untersucht wurden also folgende zwei Hauptgruppen:

- (i) Lymphome in Posttransplantationspatienten und
- (ii) Lymphome HIV infizierter Patienten.

Bei beiden Gruppen entstehen häufig Non Hodgkin Lymphome (NHL), was als Indiz für die Bedeutsamkeit eines funktionell intakten Immunsystems in der Abwehr MMR defekter Lymphome gewertet werden kann. Neben den 364 NHL immunprofizienter Patienten wurden 239 der von immundefizienten Patienten stammenden Lymphome auf Mikrosatelliteninstabilität getestet. Mikrosatelliteninstabilität fand sich bei keinem der untersuchten immunprofizienten Patienten. Dagegen liessen sich bei 8,1% der Posttransplantationspatienten und 2,3% der HIV-Patienten hochgradig mikrosatelliteninstabile (H-MSI) Lymphome nachweisen. Dass dieser H-MSI-Phänotyp in ID-RL-Patienten auftritt, deutet darauf hin, dass der stark immunogene Mutator-Pathway einen neuen onkogenen Mechanismus darstellt und bevorzugt bei einer beeinträchtigten Immunabwehr vorkommt (Duval, Raphael et al. 2004).

Zu (i): Immunsuppression nach Organtransplantationen erhöht nachweislich das Risiko für Hautkrebs und Lymphomereignisse. Beispielsweise gehen Organtransplantationen mit einem signifikant erhöhten Risiko für akute myelotische Leukämien (AML) einher. 7/7 Organtransplantationspatienten mit AML, bzw. sog. Myelodysplastischem Syndrom (MDS) waren mikrosatelliteninstabil. Dies deutet darauf hin, dass in Organtransplantationspatienten Defekte im Mismatch Reparatur-System für ein erhöhtes Lymphomentstehungsrisiko verantwortlich sein könnte (Offman, Opelz et al. 2004).

Zu (ii): Das Non Hodgkin Lymphom (NHL) ist die zweithäufigste Tumorerkrankung die mit einer HIV-Infektion einhergeht. Etwa 3-5% aller HIV-Patienten entwickeln Non Hodgkin Lymphome, die meisten davon wurden als immunoblastische Lymphome vom B-Zelltyp charakterisiert (Wool 1998). Die HIV-Erkrankung bringt immunologische Alterationen mit sich, wie z.B. eine verringerte Immunabwehr, chronische Antigen-Stimulation und Cytokin-Dysregulationen. Es zeigte sich, dass diese Vorgänge eine Rolle in der Lymphomentstehung von HIV-infizierten Menschen spielen. Diese Veränderungen resultieren in einer polyklonalen B-Zellvermehrung und treten für gewöhnlich in einer frühen Phase der HIV-Infektion auf (Carbone and Gaidano 2001).

Auch in Patienten mit Autoimmunerkrankungen treten gehäuft Lymphome auf. Der Zusammenhang zwischen Dysregulation des Immunsystems und Lymphomen wurde erstmals durch die Beobachtung bei immunsupprimierten Transplantationspatienten deutlich, die an Lymphomen erkrankten. Menschen mit vererbten oder erworbenen Fehlfunktionen des Immunsystems tragen ebenfalls ein erhöhtes Lymphom-Risiko. Dies zeigte sich bei Patienten mit rheumatischer Arthritis (RA), Sjogren`s Syndrom und „systemic lupus erythematosus“ (SLE) (Ehrenfeld, Abu-Shakra et al. 2001). Die Kausalität zwischen Lymphomentstehung und MMR-Defizienz liess sich aber bisher nicht eindeutig nachweisen.

4. MMR-Defizienz in hämatopoetischen Tumorzelllinien: In hämatopoetischen Tumorzelllinien wurde MMR-Defizienz und Apoptose-Resistenz nachgewiesen. *In vitro*-Studien an humanen Tumorzelllinien deuten auf einen möglichen Einfluß des MMR-Systems bei der Entstehung hämatopoetischen Tumorzellen hin. Die Tumorzelllinien waren mikrosatelliteninstabil (Hangaishi, Ogawa et al. 1997) und wiesen eine Resistenz gegenüber DNA damage auf (Brimmell, Mendiola et al. 1998).

Gu et al. untersuchten Zelllinien von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen; in den mikrosatelliteninstabilen Krebszelllinien (sechs von sieben) lag nachweislich eine defekte strangspezifische Mismatchreparatur vor. Die meisten der hämatologischen Erkrankungen trugen Alterationen in den Genen *hMSH2* und *hMLH1* (Gu, Cline-Brown et al. 2002). Auch diese Resultate sprechen für den möglichen Einfluss der Mismatch Reparatur Gene auf die Lymphomagenese beim Menschen.

Zusammenfassend lässt sich aus den beschriebenen Untersuchungen schliessen, dass die Bedeutung von MMR-Defekten in der Lymphomentstehung in immunprofizienten Patienten bisher noch nicht geklärt ist. Sie scheint eher eine untergeordnete Bedeutung zu haben. Dagegen ist bei Patienten mit Defekten im Immunsystem ein verstärktes Auftreten MMR-defizienter Lymphome offensichtlich.

4.2. Lymphomentwicklung in MMR-defekten Mäusen

MMR-defiziente Mauslinien dienen in erster Linie als *in vivo* Modelle zur Untersuchung der Entstehung gastrointestinaler Tumoren (HNPPC). Ein zusätzliches und unerwartetes Merkmal einiger dieser Mauslinien ist die sehr stark ausgeprägte Entwicklung lymphoider Tumoren. Im Folgenden wird die Lymphomagenese der *Mlh1*- und der *Msh2*-defizienten Mauslinien zusammenfassend erläutert. Neben diesen beiden Mausmodellen wurde auch in der Mehrzahl der *Pms2*- und *Msh6*-defizienten Mäuse ein vermehrtes Auftreten lymphoider Tumoren nachgewiesen (Edelmann, Yang et al. 1997; Prolla 1998)

***Msh2*-defiziente Mäuse:** Anhand immunhistochemischer Färbungen und Immunphänotypisierungen liessen sich 80-90% der Lymphome von *Msh2*^{-/-}-Mäusen als lymphoblastische Lymphome vom T-Zell-Typ charakterisieren (de Wind, Dekker et al. 1998). Die Lymphome bildeten sich ausschliesslich im Thymus der Mäuse. Mikrosatelliteninstabilitäts-Analysen der Tumoren *Msh2* defizienter Mäuse zeigten, dass sich die Lymphome (im Vergleich zu den Gastrointestinaltumoren) durch eine moderate Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichnet sind (Wei, Kucherlapati et al. 2002).

Thymische Lymphome, die auch in den *Msh2*^{-/-}-Mäusen von Zhang et al. analysiert wurden, zeigten einen starken Anstieg in der Mutationsfrequenz. Ausserdem war ein signifikanter Unterschied im Mutationsspektrum feststellbar. Dieser wurde charakterisiert durch einen Anstieg von Mutationen an A:T Basenpaaren, multiplen Mutationen und sog. -1 frameshifts. Es wurde zudem eine gewisse Heterogenität der mutationellen Hotspots innerhalb verschiedener Bereiche der untersuchten Tumoren festgestellt. Dies lässt auf eine zufällige Verteilung von Mutationsereignissen während der Tumorentwicklung schliessen (Zhang, Lloyd et al. 2002).

Mlh1 defiziente Mäuse: *Mlh1* heterozygote und homozygote Mäuse sind anfällig für die Ausprägung lymphoider Tumoren. Bei den Lymphomen von Mlh1 defizienten Mäusen handelte es sich um T- oder B-Zell Lymphome. Ein Auftreten von B-Zell Lymphomen wurde in den Msh2 defizienten Mäusen nicht beschrieben (Reitmair, Schmits et al. 1995). Sieben von acht untersuchten Lymphomen waren Non Hodgkin Lymphome (NHL), ein Lymphom wurde als Hodgkin-Lymphom klassifiziert; alle waren mikrosatelliteninstabil. Im Vordergrund der Untersuchung stand die Gastrointestinaltumorgenese als *in vivo*-Modell für HNPCC, daher war die Zahl der hier untersuchten Lymphomtiere gering (n=8). Eine Untersuchung der Tumorinzidenz, ihre Initiation sowie die Charakterisierung der Lymphomentitäten (wie beispielweise bei Msh2-defizienten Mäusen) wurde bei den Mlh1 defizienten Tiere bisher nicht vorgenommen (Zhang, Lloyd et al. 2002).

5. Immunogenität von (MMR-defizienten) Tumoren

Da das Immunsystem offensichtlich bei der Abwehr von MMR defekten Lymphomen keine Rolle zu spielen scheint, sollen im Folgenden die generelle Bedeutung des Immunsystems für die Abwehr von Tumoren beschrieben werden.

5.1. Tumorzell-infiltrierende Lymphozyten (TILs)

Die Anwesenheit von Lymphozyten in der direkten Umgebung solider Tumoren wurde häufig beobachtet. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass Tumor-Wirts-Interaktionen offensichtlich eine herausragende Rolle bei verschiedenen humanen Neoplasien spielen. Es wurde daher vermutet, dass Krebspatienten mit Tumoren, die viele infiltrierende Lymphozyten (TILs, tumor infiltrating lymphocytes) aufweisen, gegenüber solchen mit wenigen TILs eine bessere Überlebensprognose besitzen (Ropponen, Eskelinen et al. 1997). Bei stark proliferierenden Brusttumoren etwa lässt die Bewertung der vorhandenen Lymphozyten-Infiltration signifikante Vorhersagen über die Wahrscheinlichkeit der Patienten über weitere Tumorerkrankungen („recurrence-free survival“) und hinsichtlich des krebisbezogenen Überlebens („cancer-related survival“) zu (Aaltomaa, Lipponen et al. 1992).

Die Anwesenheit von Histeozyten um Lungentumoren und Magentumoren korreliert ebenfalls mit einem weniger aggressiven Verhaltensmuster dieser Neoplasien (Furukawa, Watanabe et al. 1985; Tsujitani, Furukawa et al. 1987). Auch in malignen Melanomen scheint das rasche Auftreten lymphozytärer Infiltrationen mit einer besseren Prognose einherzugehen (Clark, Elder et al. 1989; Clemente, Mihm et al. 1996).

In der Arbeit von Ropponen et al. wurde an einer Gruppe von kolorektalen Tumorproben der Grad der lymphozytären Infiltrationen mit Hilfe von multivariaten Überlebens-Analysen mit anderen herkömmlichen Variablen (wie klinischen oder histologischen Merkmalen) verglichen. Neben der prognostischen Relevanz der TILs könnten diese ebenfalls für die Evaluierung adjuvanter Therapien bedeutsam sein (Ropponen, Eskelinen et al. 1997).

Naito et al. zeigten, dass humane kolorektale Karzinome mit starker T-Lymphozyten-Infiltration (mit cytotoxischem Phänotyp), einen geringen Metastasierungsgrad aufwiesen; die Patienten besaßen zudem eine bessere Überlebensprognose (Naito, Saito et al. 1998).

Andere Arbeitsgruppen untersuchten, ob ein Zusammenhang zwischen der Gegenwart von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) und Mismatch Reparatur Defizienz besteht. Neben immunhistochemischen Färbungen repräsentativer MMR-Enzyme wurde auch die Mikrosatelliteninstabilität als Kriterium für Mismatch Reparatur Defizienz herangezogen. Smyrk et al. zeigten, dass TILs-Infiltrationen in hochgradig mikrosatelliteninstabilen Kolorektalen Karzinomen (MSI-H CRC) eine vermehrte Anzahl an aktivierten cytotoxischen T Lymphozyten, sowie einen erhöhten Prozentsatz apoptotischer Tumorzellen aufwiesen (verglichen zu MSS Karzinomen) (Smyrk, Watson et al. 2001). Shia et al. wiesen bei CRC-Patienten, deren Tumoren durch eine hohe Anzahl an TILs und hohe Mikrosatelliteninstabilität charakterisiert sind, eine signifikant bessere Prognose als die entsprechenden Kontrollgruppen nach (Shia, Black et al. 2008). Prall et al. zeigten, dass Patienten mit MSI-

H/CD8+high stage III CRCs (nach Resektion des Primärtumors) eine bessere Überlebensprognose aufwiesen, als MSS/MSI-L/CD8+low Patienten (Prall, Duhrkop et al. 2004).

Für Baker et al. stellt die Präsenz intraepithelialer TILs einen wichtigen Parameter und damit wichtiges Vorhersagekriterium für eine günstige Prognose bei MMR profizienten CRCs dar. Selbst die Gegenwart von nur wenigen intraepithelialen TILs ist als günstig zu bewerten. Bei Tumoren mit MMR-Defizienz und hoher intraepithelialen TILs-Anzahl zeigte sich dagegen keine günstigere Prognose. Ein fehlender Zusammenhang zwischen TILs und Outcome bei Patienten mit MMR defizienten CRCs erlaubt Spekulationen für mehrere Szenarios: (i) eine mögliche Verteilung von TILs innerhalb des Tumors bei nur einer Stanzung (Bewertung eines relativ kleinen Tumoreales) könnte das wahre Ausmass der TIL-Infiltration falsch widerspiegeln (die kleine Anzahl an MMR defizienten Tumoren würde eine eine drastische Vergrößerung in dieser Gruppe zur Folge haben). Zudem wurde der Aktivierungsstatus der TILs in dieser Studie nicht berücksichtigt, u.U. war die Anzahl cytotoxisch aktiver TILs unterestimiert. (ii) Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Funktionen der TILs in diesen zwei Krebs-Unterarten unterschiedlich sind. Die normalerweise hohe Anzahl TILs in MMR defizienten Tumoren deutet auf Besonderheiten in der Tumorbilogie der MMR defizienten Tumoren hin. Dies entspräche der Theorie des „tumor immuno-editing“. Danach können Tumoren durch die initiale Immunantwort antigenisch geformt und so stabilisiert werden, dass sie durch das Immunsystem nicht länger als fremd erkannt werden. MMR profiziente Tumoren wachsen häufig in einer -immunologisch gesehen- karger Umgebung aus. Demzufolge sind solche Tumoren vermutlich viel weniger antigenisch angepasst und reagieren daher viel sensitiver auf Angriffe des Immunsystems (Baker, Zlobec et al. 2007).

5.2. Ausweichmechanismen mittels cytotoxischer T-Zell-Immunantwort

Onkogene Transformationen beim Menschen und Versuchstieren müssen nicht zwingend mit dem Auftreten von Tumoren einhergehen. Das Immunsystem des Wirtes ist in der Lage, Tumorantigene über kleine antigene Peptide den Rezeptoren cytotoxischer T-Lymphozyten zu präsentieren und diese zur Abwehr des entstehenden Tumors zu veranlassen.

Um einer Abwehr durch cytotoxische T-Zellen zu entgehen, haben einige Tumoren Ausweichmechanismen entwickelt. Veränderungen in der Expression von MHC-Klasse I-Molekülen („major histocompatibility complex“) ist ein hierzu notwendiger Schritt in der Tumorentstehung. Hierdurch weichen die Tumorzellen einer Antigenpräsentation für cytotoxische T-Zellen aus. Somatische Evolution genetisch instabiler Tumorzellen führt zum Entstehen von Varianten der primären Tumorzelle, da ein permanenter Selektionsdruck durch eine T-Lymphozyten-Antwort vorliegt. Es resultieren daraus verschiedenste Tumor-Phänotypen (Marincola, Jaffee et al. 2000; Garrido and Algarra 2001; Seliger, Cabrera et al. 2002). Diese alterierenden Tumorphänotypen beeinträchtigen die Erkennung von Tumorantigenen und treten als Ausweich-Varianten in den Primärtumoren und später in den Metastasen auf (Garrido and Algarra 2001).

Es scheint, dass sämtliche Änderungen in den MHC Klasse I-Untereinheiten die normale MHC-Zelloberflächenexpression verändert und damit sowohl die T-Zell- als auch die NK-Zell-vermittelte Immunität beeinflusst wird (Garrido and Algarra 2001).

Die Herunterregulation von MHC Klasse I-Molekülen ist jedoch nicht der einzige mögliche Mechanismus, durch den Tumoren einer T-Zell-Antwort ausweichen können. Weitere beschriebene Mechanismen sind eine verringerte Expression von Tumorantigenen (Jager, Ringhoffer et al. 1997), Veränderungen im apoptotischen Programm (Hahne, Rimoldi et al. 1996), Expression von inhibierenden Cytokinen (Chouaib, Asselin-Paturel et al. 1997) oder immunologische Ignoranz (Garcia-Lora, Algarra et al. 2003). Die Identifikation dieser Immunausweich-Mechanismen in humanen Tumoren oder Maustumoren impliziert gleichermaßen die Existenz einer wirksamen Überwachung durch das Immunsystem.

6. Immunzell-vermittelte Tumorabwehr

Da es Hinweise gibt, dass MMR-defekte Tumoren in besonderer Weise durch das Immunsystem kontrolliert und selektioniert werden, sollen im Folgenden für die Arbeit relevante Grundlagen der Immunzell-vermittelten Tumorabwehr kurz erläutert werden.

6.1. Adaptives und angeborenes Immunsystem

Eine zentrale Komponente in der Interaktion zwischen Wirtsorganismus und sich entwickelnden Tumoren stellt das Immunsystem dar. Das Immunsystem ist in der Lage auf eindringende Krankheitserreger, körperfremde Stoffe oder entartete körpereigene Zellen (Tumorzellen) zu reagieren und diese zu bekämpfen. Innerhalb der immunologischen Abwehr wird zwischen dem unspezifischen und dem spezifischen Immunsystem unterschieden. Zu beiden Systemen gehören sowohl Zellen (zelluläre Abwehr) als auch lösliche Faktoren (humorale Abwehr).

Das **unspezifische Immunsystem** bildet die erste Verteidigungslinie der Immunantwort. Es wird auch als nicht adaptives Immunsystem bezeichnet, da die Zellen unspezifisch aktiviert werden. Zu diesem System gehören die Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, welche in der Lage sind körperfremdes Material zu phagozytieren und inaktivieren. Monozyten und Makrophagen produzieren darüber hinaus eine Vielzahl löslicher Faktoren (Cytokine), die wiederum die Einwanderung und Aktivierung anderer Abwehrzellen des Körpers bewirken.

Eine weitere wichtige Komponente des unspezifischen Immunsystems sind die natürlichen Killerzellen. Diese lymphozytenähnlichen Zellen gehen aus derselben Vorläuferzelle hervor wie die B- und T-Lymphozyten, besitzen jedoch keine Antigen-spezifität. NK-Zellen gehören zur Gruppe der Nicht-MHC Klasse I beschränkten Zellen und sind in der Lage an Zellen mit veränderten Oberflächenstrukturen zu binden und abzutöten. Aufgrund ihrer fehlenden Antigen-spezifität erfolgt die Fremdzellerkennung und Aktivierung durch eine veränderte Oberflächenmolekülexpression auf der als körperfremd eingestuft Zelle (u.a. herunterregulierte MHC Klasse I-Moleküle). Es wurde gezeigt, dass dies durch Virusinfektionen induziert sein kann; auch bei der Abwehr einiger Tumorarten wurden diese Vorgänge beschrieben.

Das **spezifische (adaptive) Immunsystem** besteht in erster Linie aus den B- und T-Lymphozyten (zelluläre Abwehr), sowie den –von den B-Lymphozyten synthetisierten löslichen Antikörpern (humorale Abwehr). Über spezifische Rezeptoren werden körperfremde Antigene und antigen-präsentierende Zellen erkannt und eliminiert. Ein einzelner Lymphozyt erkennt und bindet hierbei jeweils nur ein bestimmtes Antigen. Die Bindung des Antigens an den Lymphozyten bewirkt seine Aktivierung und klonale Vermehrung, so dass eine Vielzahl an Lymphozyten mit gleicher Antigen-spezifität entsteht. Nach abgelaufener Reaktion sterben diese aktivierten Zellen durch Apoptose.

Die Antigen-spezifität ist gleichermassen für B- als auch T-Lymphozyten charakteristisch. B-Lymphozyten reifen nach Antigenkontakt zu Plasmazellen (antikörperproduzierenden Zellen) heran. Die Plasmazellen geben die Antikörper in

das Blutplasma ab (humorale Reaktion). Bei den T-Lymphozyten dagegen verbleibt der synthetisierte T zellspezifische Rezeptor an der Oberfläche des Lymphozyten (zelluläre Reaktion). Ein Teil der durch Antigene stimulierten Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen. Bei wiederholt auftretenden Kontakt mit dem gleichen Antigen kann der Organismus (aufgrund der Anwesenheit der Gedächtniszellen) schneller und effektiver (als beim Erstkontakt) reagieren. Aufgrund von Selektionsvorgängen während der Reifung und Differenzierung von B- und T-Zellen verfügen die Zellen des spezifischen Immunsystems über die Fähigkeit, körpereigene Substanzen von körperfremden Substanzen zu unterscheiden (immunologische Toleranz).

Die cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) haben u.a. bei der Abwehr einiger Tumorarten eine herausragende Bedeutung. Die Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem basiert auf der Erkennung tumorspezifischer Antigene, die durch MHC Klasse I Moleküle auf den Tumorzellen präsentiert und von den CTLs als körperfremd erkannt werden. Als Konsequenz hieraus erklärt sich die Beobachtung verschiedenster Ausweichmechanismen, durch welche Tumorzellen versuchen sich einer Erkennung durch cytotoxische T-Zellen zu entziehen.

6.2. Die Bedeutung der MHC Klasse I-Expression für die Tumorabwehr

Eine beeinträchtigte Tumorantigenpräsentation würde es einer Tumorzelle theoretisch ermöglichen, sich der Erkennung und Eliminierung durch CTLs zu entziehen. Tatsächlich wurde bei verschiedensten Tumorarten die Herunterregulation oder ein vollständiges Fehlen der tumorantigenpräsentierender MHC Klasse I-Moleküle gezeigt. Eine Möglichkeit ist z.B. die Mutation im β 2Mikroglobulin-Gen, welche zu einem vollständigen Verlust der MHC Klasse I-Molekülexpression führen kann.

Ein Fehlen, bzw. eine herunterregulierte MHC Klasse I-Molekülexpression auf der Tumorzelloberfläche ist zwar ein möglicher Ausweichmechanismus vor einer adaptiven Immunantwort, die Tumorzellen werden allerdings hierdurch zu potentiellen Angriffzielen anderer Zellgruppen des nativen Immunsystems. Für diese **Nicht-MHC Klasse I-beschränkten Zellen** stellt das Vorhandensein der MHC Klasse I-Moleküle also ein inhibitorisches Signal dar. Zu der heterogenen Gruppe Nicht-MHC Klasse I-beschränkter (non MHC class I restricted) Zellen gehören neben den $\gamma\delta$ -T-Zellen und den NKT-Zellen auch die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Alle entstammen einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle, differenzieren aber über verschiedene Wege (pathways). T-NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren CD 3 und den T-Zell-Rezeptor (TCR), sie repräsentieren somit echte T-Zellen. Die NK-T-Zellen exprimieren α - und β -Ketten des T-Zell-Rezeptors, wogegen die $\gamma\delta$ -T-Zellen γ - und δ -Ketten exprimieren. NK-Zellen fehlt sowohl eine CD 3- als auch die TCR-Expression. Mehr als 95% dieser Zellpopulation exprimieren dafür CD 56 (Marker für NK-Zellen und einige T-Lymphozyten) und CD 16 (auf NK-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert) (Lowdell, Lamb et al. 2001). Trotzdem sind NK-Zellen in der Lage MHC-Moleküle zu erkennen, diese Interaktion hat einen Einfluß auf die Kontrolle der Zytolyse. Allen diesen Zelltypen gemeinsam ist, dass sie in der primären Immunantwort auf Tumorzellen und intrazelluläre Pathogene fungieren. Ihnen fehlt allerdings die Fähigkeit Gedächtnis-Zellen zu bilden, um so eine sekundäre zelluläre Immunantwort auf wiederkehrende Antigene zu ermöglichen (Lowdell, Lamb et al. 2001).

Trotz fehlender MHC Klasse I-Molekülexpression können Tumoren entstehen, ohne dass die Nicht-MHC Klasse I-beschränkten (non MHC class I restricted) Zellen gegen diese reagieren. Die Tumorabwehr durch das native Immunsystem ist offensichtlich noch an weitere Bedingungen gekoppelt. Es muss also eine Interaktion zwischen NK-Zell-spezifischen Rezeptoren und Liganden auf der Tumorzelloberfläche stattfinden (Diefenbach and Raulet 2002).

6.3. Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung

Während die Wirkweise der CTLs des adaptiven Immunsystems von einer Tumorantigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle abhängt, sind –wie zuvor beschrieben– die Gruppe der „Nicht-MHC-beschränkten cytotoxischen Lymphozyten“ nicht auf eine Antigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle angewiesen.

Die Expression von MHC Klasse I-Molekülen auf der Zielzelle stellt ein inhibitorisches Signal für eine NK-Zell-vermittelte Lyse dar. NK-Zellen sind permanent in der Lage Zielzellen zu lysieren. Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen stellen aufgrund der Herunterregulation von MHC-Molekülen geeignete Ziele einer NK-Zell-vermittelten Lyse dar. Auch Zellen mit normaler MHC-Molekülexpression lassen sich durch NK-Zellen eliminieren, sobald sie NK-Zell-stimulierende Signale exprimieren. Bei humanen Zielzellen wäre dies beispielsweise die Expression des Fcγ-Rezeptors (CD 16), welcher es den NK-Zellen ermöglicht die inhibierenden Signale zu überwinden (Lowdell, Lamb et al. 2001).

Die Erkennung einer zu eliminierenden Zielzelle durch Komponenten des nativen Immunsystems ist u.a. auch von dem Vorhandensein stimulatorischer Liganden, wie beispielsweise dem RAE-1 (retinoic acid early inducible gene 1) abhängig. Die Abbildung 6.3.a zeigt ein modifiziertes Modell (nach Diefenbach und Raulet) der Zielzellerkennung durch NK-Zellen. Ein balanciertes Verhältnis von inhibitorischen und stimulatorischen Liganden auf den Zellen sorgt für die Tolerierung der Zelle durch das native Immunsystem (Diefenbach and Raulet 2002).

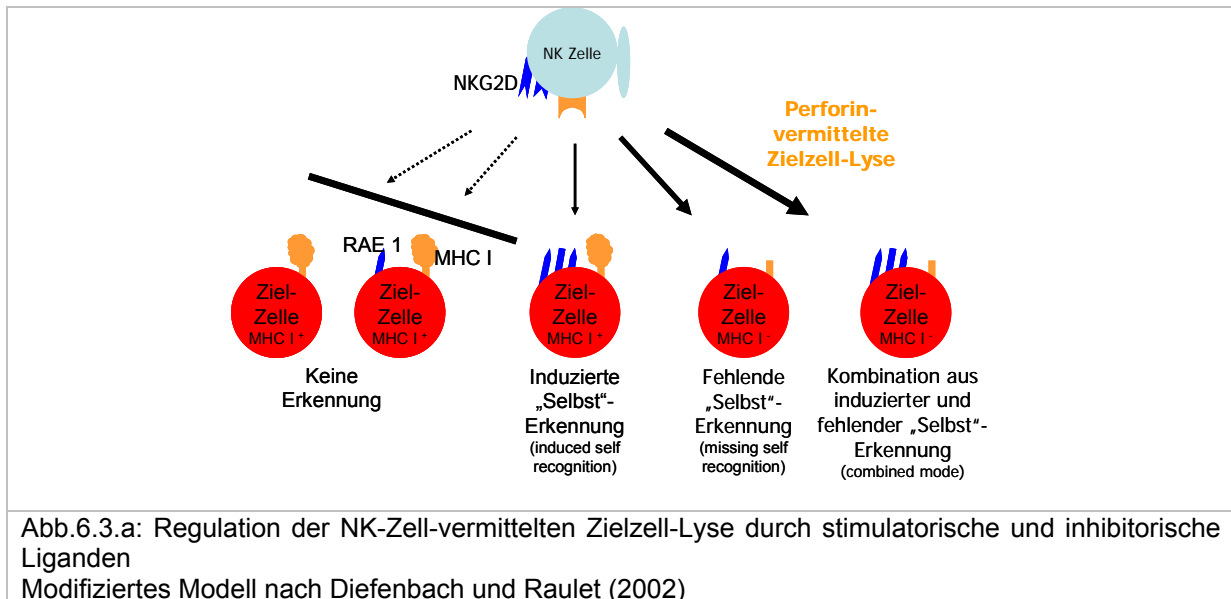
Erst die Disbalance zwischen den oben genannten Liganden führt zur Aktivierung von NK-Zellen. Dominiert der Anteil NK-Zell-stimulierender oder aktivierender Liganden gegenüber dem Anteil der MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche, könnte eine Erkennung und Eliminierung stattfinden. Fehlen, bzw. reguliert eine Zielzelle die stimulatorischen Signale im gleichen Maße wie die inhibitorischen Signale herunter, ist eine Fremderkennung durch das native Immunsystem nicht mehr möglich. In ihrem Modell beschreiben Diefenbach und Raulet die Bedingungen, für eine Reaktion des nativen Immunsystems zur Zielzellerkennung. Sie postulieren ausserdem, dass die Immunantwort –je nach Verteilung von stimulatorischen zu inhibitorischen Liganden– unterschiedlich stark ausfallen kann.

Es werden drei unterschiedlich starke Ausprägungen der NK-Zell-Erkennung/-Abwehr beschrieben,

- (i) die induzierte Selbsterkennung,
- (ii) die fehlende Selbsterkennung und
- (iii) die Kombination aus induzierter und fehlender Selbsterkennung.

Bei der induzierten „Selbst“-Erkennung ist die RAE-1-Dichte auf der Zielzelle höher als die MHC Klasse I-Rezeptordichte. Bei der fehlenden „Selbst“-Erkennung (missing

self recognition) exprimiert die Zielzelle keinerlei MHC Klasse I-Moleküle, jedoch moderat RAE-1. Die Kombination aus beiden vorangegangenen Modellen führt zur stärksten Abwehrreaktion: stimulatorische Liganden werden überexprimiert, während die MHC Klasse I-Molekülexpression vollständig fehlt (Diefenbach and Raulet 2002).



Eine Zahl von Molekülen, die die NK-Zell-Inhibierung vermitteln, wurde innerhalb der letzten Jahre identifiziert. Ihre Liganden sind fast ausschließlich MHC Klasse I-Moleküle (Moretta and Moretta 1997; Lanier 1998). Einige dieser Rezeptoren („KIRs“, killer cell Ig-like receptors) sind spezifisch für Determinanten, die von bestimmten Klasse I-Allelen geteilt werden. Jeder dieser KIRs ist auf einer Subgruppe von NK-Zellen exprimiert. Daher erkennen einige NK-Zellen der NK-Zell-Population diese spezifischen Klasse I-Allele und werden durch diese inhibiert (Lowdell, Lamb et al. 2001). Unter einem solchen selektivem Druck können Ausweich-Varianten unter den Tumoren entstehen, denen MHC Klasse I- oder II-Moleküle, costimulatorische Moleküle (z.B. B7, intracellular adhesion molecule-1 und LFA-3) oder tumorspezifische Antigene fehlen (van den Broek, Kagi et al. 1995). Einige Ausweich-(Escape)-Varianten die die MHC Klasse I-Expression verloren haben, werden (*in vivo*) wirksam über die perforin-vermittelte NK-Zellabwehr kontrolliert (van den Broek, Kagi et al. 1995).

Die Studien der Funktion körpereigener (autologer) Natürlicher Killerzellen für die Behandlung von Leukämien könnte in naher Zukunft zur Entwicklung besserer passiver Immuntherapie-Ansätze führen (Lowdell, Lamb et al. 2001).

6.4. Mechanismen der CTL-Aktivierung

Um aktiviert zu werden muss eine naive T-Zelle fremde Peptide erkennen, die an ein Selbst-MHC-Molekül gebunden sind. Weiterhin muss noch von einer spezialisierten antigenpräsentierenden Zelle ein costimmulierendes Signal ausgehen (nur dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen können dies). Der Kontakt – beispielsweise mit einer dendritischen Zelle- sorgt für die klonale Vermehrung naiver T-Zellen und ihrer Differenzierung zu „bewaffneten“ Effektorzellen.

6. 5. Mechanismen der Cytotoxizität

Die cytolytische Aktivität von CTLs und NK-Zellen wird hauptsächlich durch zwei Mechanismen, den „Perforin-Granenzym-“ und den „Fas-FasL-Pathway“ vermittelt. Die Interaktion des auf den CTLs exprimierten FasL mit dem Fas-Rezeptor auf der Membran der Zielzelle initiiert den sog. „Fas-Zelltod-Pathway“. Über diesen wird die Aktivierung der Kaspase-Kaskade ausgelöst. Der Perforin-Granenzym-Pathway setzt sich zusammen aus der Exozytose lytischer Granula und der Freisetzung von Perforin und Granenzymen. Als Poren-bildendes Protein greift Perforin die Zielzellmembranen an. Zu den Granenzymen gehören Ca^{2+} -abhängige Serinesterasen, welche ebenfalls in der Lage sind die Kaspase-Kaskade zu aktivieren. Der Perforin/Granenzym-Pathway spielt also bei der Immunantwort auf Virusinfektionen und Tumorzellen durch CTLs und NK-Zellen eine herausragende Rolle (Schmaltz, Alpdogan et al. 2001).

Einige Studien belegen, dass ebenfalls die Expression (oder Sekretion) von TNF (tumor necrosis factor) oder TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) an der Cytotoxizität der CTLs beteiligt ist. Anhand zweier Knochenmarkstransplantations-Mausmodelle wurde gezeigt, dass der FasL-Effektor-Pathway für CTLs die GVHD-Aktivität (graft versus host disease) und der Perforin-Pathway für die GVL-Aktivität (graft versus leukemia) verantwortlich ist.

6.6. Transgene Mausmodelle mit eingeschränkter immunzellvermittelter Tumorabwehr

Die Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören, wird als Immunüberwachung (immune surveillance) bezeichnet (Burnet 1970). Es lässt sich allerdings nicht leicht nachweisen, dass Tumoren tatsächlich einer Überwachung durch das Immunsystem unterliegen.

Bei den Krebsarten, die bei Mäusen oder Menschen mit Immunschwäche gehäuft auftreten, handelt es sich hauptsächlich um virusassoziierte Tumoren. Daraus lässt sich schliessen, dass die Immunüberwachung bei der Kontrolle virusassoziierter Tumoren von grosser Bedeutung ist. Ob das Immunsystem auf die tumorspezifischen Antigene von spontan entstandenen Tumoren anspricht, welche durch multiple genetische Veränderungen gebildet werden, ist noch strittig.

Inwieweit nicht virusassoziierte Tumoren durch das Immunsystem kontrolliert werden ist ebenfalls ein kontrovers diskutierter Punkt. In vielen verschiedenen immunsupprimierten Mausmodellen konnte keinerlei erhöhte Tumorgenese nachgewiesen werden.

Neuere Transgene Mausmodelle ermöglichen eine focussiertere Betrachtungsweise und kommen teilweise zu gegensätzlichen Aussagen (Dunn, Old et al. 2004). So sind Tumoren die in Lymphozyten-defizienten Mäusen auftreten immunogener als solche die sich in der Gegenwart eines intakten Immunsystems bilden. Shankaran et al beschreiben, dass das Immunsystem das Auftauchen von Primärtumoren mit einer reduzierten Immunogenität fördern kann. Diese Tumoren sind in der Lage der Erkennung und der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen (Shankaran, Ikeda et al. 2001).

Um die Bedeutung des Immunsystems für die Abwehr MMR-defekter Tumoren zu untersuchen wurden Mausmodelle mit unterschiedlichen „Beeinträchtigungen“ im

Immunsystem verwendet. Einige, für diese Studie relevante Modelle sollen im Folgenden kurz aufgezeigt werden:

6.6.1. $\beta 2m$ -Mäuse

Um den Einfluss einer fehlenden MHC Klasse I-Molekülexpression als möglicher Ausweichmechanismus von Tumorzellen vor einer cytotoxischen T-Zellantwort besser zu verstehen, wurden $\beta 2m$ Mikroglobulin-defiziente Mäuse ($\beta 2m$) untersucht. Sämtlichen Zellen der $\beta 2m^{-/-}$ -Mäuse fehlt die Expression von MHC Klasse I-Molekülen. Daher werden nur wenige cytotoxische T-Zellen (CTLs) in diesen Tieren gebildet. Das MHC-Klasse-I-Molekül ist ein Heterodimer aus einer α -Kette (43kDa), die sich durch die Membran erstreckt, das mit dem $\beta 2m$ Mikroglobulin (12kDa) nichtkovalent assoziiert ist. $\beta 2m$ Mikroglobulin-defiziente Zellen sind nicht in der Lage, intakte MHC Klasse I-Moleküle zu bilden. Eine Erkennung und Aktivierung von CTLs via MHC Klasse I-Molekülexpression ist bei $\beta 2m$ -Defizienz demzufolge nicht mehr möglich. In $\beta 2m$ defizienten Mäusen liegt kein verstärktes Auftreten von Tumoren vor.

$\beta 2m/p53$ -Mäuse: Aktivierte cytotoxische T-Lymphozyten können Tumoren *in vitro* eliminieren. Sie rufen *in vivo* eine Selektion auf Tumorvarianten hervor, die den Abwehrmechanismen dieser Komponente des Immunsystems auszuweichen versuchen. CD 8-T-Zell-Defizienz muss trotzdem nicht zwingend mit einer erhöhten Tumorzinzidenz einhergehen. Beispielsweise treten bei Patienten mit beeinträchtigter Immunsystemfunktion nur bestimmte Tumortypen vermehrt auf. Auch die T-Zell-defizienten athymischen Mäuse zeigen keinerlei merkliche Häufung in der Tumorentstehung (Johnsen, France et al. 2001).

6.6.2. *perf*-Mäuse

Die perforin-vermittelten Immunantwort (auch „Granenzyme pathway“) ist ein wichtiger Abwehrmechanismus, über den sowohl CTLs als auch NK-Zellen eliminieren können. Es wurde gezeigt, dass Perforin notwendig für die immunzellvermittelte Kontrolle von Tumorzellwachstum und –Metastasierung ist (Street, Cretney et al. 2001). Bei Anwesenheit von Calcium bindet das porenformende Protein Perforin an die Zielzellmembran. Dies führt zum Verlust der osmotischen Stabilität der Zelle und einen Influx von Granula-assoziierten Proteinen, welche Apoptose induzieren (Lehmann, Zeis et al. 2000).

Perforin defiziente Mäuse verfügen über eine normale Anzahl an intakten NK und CD8+ Zellen, sofern keine Infektionen auftreten (Kagi, Ledermann et al. 1994).

Perforin-defiziente Mäuse sind anfälliger für die Entwicklung spontaner T-, B- und NK-Zell-Tumoren (Smyth, Thia et al. 2000). So wird das Wachstum von implantierten Tumorzellen in Mäusen durch die NK-Zell-Cytotoxizität kontrolliert, welche wiederum vom Perforin abhängig ist (van den Broek, Kagi et al. 1995). Perforin spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei in Mäusen beschriebene Klasse I-beschränkte Graft-versus-host-diseases (GvHD) (Graubert, DiPersio et al. 1997; Jiang, Podack et al. 2001).

Studien über das Ausweichen der Tumorzellen vor einer körpereigenen Immunantwort (tumor surveillance) zeigen, dass die perforin-vermittelte Ziellzelllyse

ein bedeutsamer Prozess ist. Demgegenüber scheint der Fas-FasL-Pathway für die Erkennung und Abwehr von Tumoren von nur untergeordneter Bedeutung zu sein (Lehmann, Zeis et al. 2000).

In vitro-Studien beweisen, dass eine Bindung von Perforin an der Oberfläche der Zielzelle/Tumorzelle die notwendige Grundvoraussetzung für das Auslösen des Zelltodes derselbigen ist. Perforin ist essentiell bei der Prozessierung der Granulozyten-vermittelten Cytotoxizität (granule mediated cytotoxicity). Immunhistochemische Oberflächenfärbungen der untersuchten Tumorzellen belegte, dass die meisten perforin-positiven Zellen gleichermassen abgestorbene Zellen waren.

Tumorzellen von Patienten mit akuten Leukämien wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber cytotoxischen NK-Zell-Lysaten untersucht. Die Resultate erlauben den Schluss, dass die Perforin-Resistenz ein häufiges Ereignis bei hämatologischen Erkrankungen darstellt. Eine Beeinträchtigung der Perforin-Bindungsfähigkeit auf der Tumorzelloberfläche ist ein Mechanismus der Tumorzell-Resistenz gegenüber der NK-Zell-vermittelten Cytotoxizität (Lehmann, Zeis et al. 2000).

***pfp*^{-/-} *p53*^{+/-} Mausmodell:** Smyth et al. untersuchten, ob der Tumorphänotyp in p53 defizienten Mäusen durch eine fehlende Perforin(*pfp*-)Expression verändert wird. Innerhalb des Zeitraums von 2 Jahren überlebten alle untersuchten *pfp*^{+/-} *p53*^{+/-}-Tiere (n=20). Die *pfp*^{-/-} *p53*^{+/-}-Mäuse wiesen innerhalb des ersten Lebensjahres keinerlei Symptome auf, erkrankten danach jedoch häufig an aggressiven, disseminierten Lymphomen in Milz, Lymphknoten und Leber (Durchschnittsalter der *pfp*^{-/-} *p53*^{+/-}-Tiere: 569, ±22 Tage). Die *pfp*^{-/-} *p53*^{+/-}-Mäuse erkrankten durchschnittlich etwa 90 Tage früher (Durchschnittsalter: 479, ±22 Tage), als die *pfp*^{-/-} *p53*^{+/-}-Mäuse. Die p53 heterozygoten Kontrolltiere (*pfp*^{+/+} *p53*^{+/-}) entwickelten nur selten spontan auftretende Tumoren früher als 250 Tage; 50% aller *pfp*^{+/+} *p53*^{+/-}-Tiere (15 von 30) zeigten eine Tumorentwicklung um Tag 650. Von diesen 15 *pfp*^{+/+} *p53*^{+/-}-Tumortieren entwickelten lediglich 2 Tiere disseminierte Lymphome.

Obwohl also die zusätzliche p53-Heterozygotie in *pfp* defizienten Mäusen zu einer deutlich beschleunigten Lymphomentstehung führte, war die Anzahl der auftretenden Lymphomereignisse unverändert. Daher wurde postuliert, dass dem Perforin und nicht p53 eine unabkömmliche Rolle bei der Entstehung von Lymphomen in ansonsten normalen Inzuchtmäusen zukommt.

Die Schlussfolgerungen sind, dass (i) das disseminierte Lymphome durch CTLs über den Perforin-Pathway eliminiert werden, (ii) dass das Fehlen von Perforin zu einer erhöhten Lymphomagenese in verschiedenen Zelllinien (T-, B- und NKT-Zellen) führt und (iii) diese spontane Tumorbildung durch eine zusätzliche p53-Mutation verstärkt wird. Die Transplantation solcher Lymphome in wildtypische Mäuse oder Mäuse mit verschiedensten depletierten Lymphozyten-Untergruppen zeigten, dass hier CD 8 positive T-Lymphozyten (CTLs) für die Tumoreliminierung verantwortlich sind (Smyth, Thia et al. 2000).

6.6.3. *pfp*/β2m-Mäuse

Doppelt defizienten Mäusen (*pfp*^{-/-}/β2m^{-/-}) fehlen aufgrund ihrer Perforindefizienz (keine cytotoxische Aktivität von NK- und CD8+ CTL Zellen via Granulinsynthese) und aufgrund der β2Mikroglobulin-Defizienz die Möglichkeit zur Selbst-MHC Klasse I-Erkennung essentielle Komponenten speziell zur Tumorzelleliminierung durch CTLs.

Die Abhängigkeit von Perforin wurde für die Cytotoxizität dieser Effektoren *in vitro* und für die Fähigkeit dieser Effektoren eine Vielzahl von Tumoren zu eliminieren *in vivo* nachgewiesen. NK-Zellen in $\beta 2$ Mikroglobulin defizienten Mäusen selbst sind nicht in der Lage normale (gesunde) Zellen zu eliminieren. NK-Zellen von $\beta 2$ Mikroglobulin defizienten Mäusen können MHC Klasse I defiziente Tumorzellen lysieren. Wie auch normale Zellen, lassen sich NK-Zellen in $\beta 2m$ defizienten Mäusen aktivieren, um MHC Klasse I-defiziente Lymphoblasten zu eliminieren (Salcedo, Andersson et al. 1998).

Ungeachtet der Fähigkeit von NK-Zellen in $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen Tumorzellen zu lysieren, ist die Abwehr MHC Klasse I defizienter Tumoren beeinträchtigt (Freland, Chambers et al. 1998).

Smyth et al. stützen die Ergebnisse von Freland et al. und erweitern die getroffene Aussage darüber hinaus, dass das CD8+ T-Zell-Repertoire von $\beta 2$ Mikroglobulin defizienten Mäusen die reaktiv gegen Selbst MHC Klasse I-Moleküle (i) syngeneische Tumoren abwehren können, (ii) in der Lage sind zumindest teilweise H2-K^b und H2-D^b (die murinen Analoge zum menschlichen HLA-A und HLA-B) zu erkennen und (iii) syngeneische Tumoren *in vivo* mittels Perforin eliminieren können (Smyth and Snook 1999).

6.6.5. Tap1/p53-Mäuse

TAP1, bzw. LMP2 prozessieren die Präsentation von Antigenen durch MHC Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche beteiligt. Tap1-defiziente Tiere sind hinsichtlich des Peptid-Transports in Richtung Zelloberfläche und damit der normalen MHC Klasse I-Antigenpräsentation beeinträchtigt. Zudem verfügen sie über nur sehr wenige CD8+ T-Zellen (de Wind, Dekker et al. 1998). Da weder $Tap1^{-/-}$, als auch $Lmp2^{-/-}$ Mäuse ein erhöhtes Auftreten eines spontanen Tumorwachstums gegenüber wildtypischen Tieren aufwiesen (Beobachtungszeitraum: 4 Jahre), wurde zusätzlich p53-Defizienz in die Mäuse eingekreuzt. $p53^{-/-}$ -Tiere entwickeln hauptsächlich maligne Lymphome und Sarkome innerhalb der ersten 6 Lebensmonate. Mit den doppelt-defizienten Mausmodellen wurden die Effekte einer systemischen Wirtsdefizienz bei spezifischen Komponenten der MHC Klasse I-Antigenprozessierung untersucht (da vorausgegangene Studien zeigten, dass die MHC Klasse I-Antigenprozessierung nachweislich auch in einigen Tumorzellen herunterreguliert ist). Auch die Mehrzahl der $Tap1^{-/-} p53^{-/-}$ und $Lmp2^{-/-} p53^{-/-}$ Mäuse entwickelte Lymphome und Sarkome. Weder die Tumorzinzidenz noch das Tumorspektrum unterschied sich signifikant bei den $Tap1^{+/+} p53^{-/-}$ und den $Tap1^{-/-} p53^{-/-}$ Mäusen (Johnsen, France et al. 2001).

Diese Resultate bedeuten jedoch nicht zwingend, dass TAP1 keinen Effekt auf die Tumorzinzidenz in anderen Modellsystemen hat. Beispielsweise könnte es am unterschiedlichen Repertoire an Tumorantigenen der Tumorzellen liegen, welche durch p53-Defizienz entstehen. Unter Umständen sind die T-Zellen bedeutsamer für die Abwehr einer virusinduzierten Tumorentstehung. Das Einkreuzen von Tap1-Defizienz in andere Tumormodelle erbrachte dagegen andere Resultate. So haben $Tap1^{-/-} Msh2^{-/-}$ Mäuse ein anderes Tumorspektrum als $Tap1^{+/+} Msh2^{-/-}$ Mäuse auf (de Wind, Dekker et al. 1998).

Auch das Einkreuzen anderer Immundefizienz-Modelle wäre geeignet um festzustellen, ob andere Komponenten des Immunsystems (wie z.B. NK-Zellen oder CD 4 positive T-Lymphozyten) einen Einfluss auf die Kontrolle der Tumorentstehung haben (Johnsen, France et al. 2001).

6.6.6. *Tap1/Msh2*- Mäuse

Als bisher einziges Mausmodell um zu klären, ob und inwieweit das Tumorspektrum in *Msh2* defizienten Mäusen durch das Immunsystem kontrolliert wird, wurden *Msh2*^{-/-}-Tiere (n =13) mit zusätzlich homozygot defizientem *Tap1*-Gen untersucht (de Wind, Dekker et al. 1998). *Msh2*^{-/-}-Tiere entwickeln frühzeitig lymphoblastische Lymphome vom T-Zell-Typ (thymus-lokalisiert) und später gastrointestinale Tumoren. In den untersuchten *Tap1*^{-/-}/*Msh2*^{-/-}-Mäusen traten keine lymphoblastischen T-Zell Lymphome mehr auf. Die Mehrzahl der Tiere (10 von 13) entwickelten intestinale Tumoren, Talgdrüsen-Tumoren oder beide Tumorarten. Hinsichtlich ihres Tumorspektrums, der Latenzzeit und dem Auftreten der HNPCC-ähnlichen Tumoren glichen *Tap1*^{-/-}/*Msh2*^{-/-}-Mäuse, die älter als 30 Wochen wurden den - in *Msh2*^{-/-}-Mäusen - gefundenen Tumoren. Die Lokalisation, das zeitliche Auftreten der Tumorereignisse und die Anzahl an MMR-defizienten Tumoren in diesen Mäusen wird anscheinend nicht durch eine CTL-vermittelte Immunabwehr kontrolliert (de Wind, Dekker et al. 1998). Allerdings lässt diese Studie offen, ob das vollständige Fehlen von lymphoiden Tumoren in den *Tap1*^{-/-}/*Msh2*^{-/-}-Mäusen durch andere Zelltypen und Mechanismen des Immunsystems hervorgerufen wurde.

7. Zielsetzung der Arbeit

Bestimmte Defekte im Mismatch-Reparatur-(MMR-) System führen zur Entstehung von Tumoren beim Menschen. Insbesondere Mutationen im *Mlh1*- und im *Msh2*-Gen kommt hierbei eine herausragende Rolle zu. Um die Mechanismen dieser Art von Tumorentstehung *in vivo* zu untersuchen, wurden verschiedene Mausmodelle mit MMR-Defizienz generiert.

Die ***Mlh1*^{-/-}-Maus** reflektiert mit ihrem Tumorphänotyp eine ähnliche Situation, wie sie in Patienten mit Hereditärem Nicht-Polypösem Kolorektalem Karzinom (HNPCC) vorliegt. Darüber hinaus entwickeln diese Mäuse ebenfalls lymphoide Tumoren. Ein Ziel der Arbeit war es diese Lymphome zu charakterisieren und die Relevanz für humane Lymphomkrankungen herauszuarbeiten. Die in den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen auftretenden Lymphome sind bisher kaum beschrieben. Mit Hilfe molekularbiologischer (Immunphänotypisierung, Genexpressionsanalysen, MSI-Assay) und histologischer Techniken wurde eine Charakterisierung dieser Lymphome vorgenommen. Die von W. Edelmann generierten Mäuse tragen eine Nullmutation im *Mlh1*-Gen. Sie wurden auf einen gemischten genetischen Hintergrund gezüchtet (C57BL/6 x 129/Ola). Die *Mlh1*^{-/-}-Mäuse besitzen einen Tumorphänotyp, welcher hauptsächlich durch die Entstehung von Gastrointestinaltumoren und Lymphomen gekennzeichnet ist. Die *Mlh1*^{-/-}-Maus stellt somit ein bereits etabliertes Modell für die *in vivo* Untersuchung der, durch MMR-Defizienz entstehenden Gastrointestinaltumoren bei HNPCC-Patienten, dar.

Weiter galt es herauszufinden, auf welche Art und Weise die entstehenden Tumoren einer körpereigenen Immunantwort entgehen. Hierzu wurden verschiedene Mauslinien mit defektem, bzw. eingeschränkt funktionierendem Immunsystem in die *Mlh1*^{-/-}-Mauslinie eingekreuzt. Die *Mlh1*^{-/-}-Tiere wurden mit $\beta 2m$ -, Perforin- und Rag-defizienten Mäusen gekreuzt. Von besonderem Interesse waren die daraus resultierenden 5 Mauslinien: $\beta 2m$ ^{-/-}/*Mlh1*^{-/-} und $\beta 2m$ ^{+/-}/*Mlh1*^{-/-}, *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-} und *pfp*^{-/-}/ $\beta 2m$ ^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}, sowie *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}.

$\beta 2m$ ^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}- und $\beta 2m$ ^{+/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse: In einigen Studien über humane Tumoren wird das Fehlen von MHC Klasse I-Molekülen als ein möglicher Ausweichmechanismus der Tumorzelle vor einer –durch cytotoxische T-Zellen (CTL) vermittelten- Immunantwort beschrieben. Eine für den Aufbau des MHC Klasse I-Moleküls benötigte Hauptkomponente ist die $\beta 2$ Mikroglobulin-Kette. $\beta 2$ Mikroglobulin-defiziente Zellen exprimieren keine MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche; die Tiere entwickeln darüber hinaus keine (kaum) cytotoxische T-Zellen.

$\beta 2m$ ^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse besitzen also zum einen den -durch die Mismatch-Reparatur-Defizienz induzierten- Tumorprädispositionsphänotyp, zum anderen fehlt sämtlichen Zellen die MHC Klasse I-Molekülexpression und die Tiere verfügen über keine funktionstüchtigen cytotoxischen T-Zellen. Das Immunsystem dieser Mäuse ist somit funktionell stark eingeschränkt.

In den ebenfalls untersuchten **$\beta 2m$ ^{+/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen** lag - bis auf das defekte Gen eines $\beta 2$ Mikroglobulin-Allels - eine vergleichbare Situation wie bei den *Mlh1* defizienten Tieren vor. Diese Mäuse sind in der Lage MHC Klasse I-Moleküle zu bilden und besitzen intakte cytotoxische T-Zellen. Die Wahrscheinlichkeit einer funktionszerstörenden Mutation im verbliebenen intakten $\beta 2$ Mikroglobulin-Gen wird

durch die zusätzliche Mlh1-Defizienz jedoch erhöht. Mit diesen beiden Modellen soll der Einfluss der Tumorantigenpräsentation zum einen und die Rolle der CTLs auf die Abwehr MMR+ Tumoren untersucht werden.

pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}-Tiere: Die Perforin-vermittelte Zielzell-Lyse ist essentiell für die Funktion von sowohl cytotoxischen T-Zellen als auch NK-Zellen. Die perforin-vermittelte Zielzelllyse stellt einen Haupt-Abwehrmechanismus von cytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen bei der Eliminierung von –als fremd/pathologisch erkannten- Zielzellen dar. Fehlt Perforin, sind diese Zellen nicht mehr in der Lage über diesen „sekretorischen Pathway“ potentielle Zielzellen zu eliminieren. Für die Mlh1 defizienten Tiere bedeutet dies, das eine verstärkte (beschleunigt und/oder vermehrt) Tumorgenese zu erwarten wäre, falls die Überwachung von MMR-defekten Tumoren durch das Immunsystem (durch speziell den „sekretorischen Pathway“) von Bedeutung ist.

pfp^{-/-}/β2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}-Tiere: Um die Erkenntnisse aus den *β2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}-* und *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}-*Mausmodellen zu überprüfen, wurde Perforin-Defizienz (*pfp^{-/-}*) in *β2m/Mlh1* doppelt defiziente Mäuse eingekreuzt.

Der Einfluß eines Fehlens von CTL, einer fehlenden MHC Klasse I-Molekülexpression und der „Entwaffnung“ der NK-Zellen auf die Tumorentstehung in Mlh1 defizienten Mäusen sollte mit diesem Modell geklärt werden.

Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-Mäuse: Ein anderes Modell, mit dem sich der Einfluß des Immunsystems auf die Erkennung und die Abwehr von Tumoren in MMR-defizienten Mäusen untersuchen lässt, sind die *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-*Mäuse. *Rag^{-/-}-*Mäuse entwickeln keine reifen T- und B-Lymphozyten, ihr Immunsystem ist demzufolge funktionell stark eingeschränkt. Bei den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-*Tieren liegt also neben dem Tumorprädispositionsphänotyp eine zusätzliche Immundefizienz vor. Spielt die Erkennung und Abwehr von *Mlh1^{-/-}-*Tumoren durch das Immunsystem eine Rolle, wäre eine beschleunigte Tumorgenese in den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-*Tieren zu erwarten.

II Material und Methoden

1. Material

1.1. Modellsysteme

Verwendete Mauseinzuchtstämme:

- C57BL/6J **Wildtyp**
- C57BL/6J **mMLH1^{-/-}** (Edelmann, Cohen et al. 1996) generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Winfried Edelmann, Albert-Einstein College of Medicine, NY, USA
- C57BL/6J **Rag^{-/-}mMLH1^{-/-}**
- C57BL/6J **β2-Microglobulin^{-/-}mMLH1^{-/-}**
- C57BL/6J **Perforin^{-/-}β2-Microglobulin^{-/-}mMLH1^{-/-}**
- C57BL/6J **Perforin^{-/-}mMLH1^{-/-}**

Die Ausgangs-Mauslinien *Rag^{-/-}*, *β2mikroglobulin^{-/-}* und *Perforin^{-/-}* wurden kommerziell erworben (Fa. Harlan).

1.2. Chemikalien

Antikörper

Verwendete monoklonale Rattenantikörper (**Primäre Antikörper**):

FITC anti-Maus-**CD 2** 500 µg/ml (1/100 verdünnt)
 FITC anti-Maus-**CD 4** 500 µg/ml (1/100 verdünnt)
 FITC anti-Maus-**CD 24** 500µg/ml (1/200 verdünnt)
 FITC anti-Maus-**CD 80** 500µg/ml (1/100 verdünnt)
 FITC anti-Maus- **H-2K^b (MHC class I)** 500µg/ml (1/200 verdünnt)
 FITC anti-Maus **Ig D** 500µg/ml (1/100 verdünnt)

PE anti-Maus-**CD 3** 200µg/ml (1/50 verdünnt)
 PE anti-Maus-**CD 19** 200µg/ml (1/200 verdünnt)
 PE anti-Maus-**CD 45** 200µg/ml (1/200 verdünnt)
 PE anti-Maus-**CD 70** 200µg/ml (1/100 verdünnt)
 PE anti-Maus-**Ig M** 250µg/ml (1/300 verdünnt)
 PE anti-Maus-**TER** 200µg/ml (1/100 verdünnt)

Cy anti-Maus-**CD 8α** 200µg/ml (1/400 verdünnt)
 Cy anti-Maus-**CD 45R** 200µg/ml (1/200 verdünnt)

biotinylierter anti-Maus-**CD 3** 200µg/ml (1/100 verdünnt)

(Sekundäre Antikörper):

Streptavidin Cy anti-Maus 200µg/ml (1/400 verdünnt)

Streptavidin FITC anti-Maus 500µg/ml (1/200 verdünnt)

Kits

DNA-Isolation: DNeasy Tissue Kit; Quiagen, Hilden

RT-PCR-Kit: ImProm II, Fa. Promega

MACS-Kit: Magnetic Cell Sorting of Mouse Leukocytes, CD 45R (B220) MicroBeads, Fa. Milteny Biotec

PCR-Technik

Taq-DNA-Polymerase; 5 Units/µl (Fa. Genaxxon, Biberach)

dNTP (Fa. Eppendorf)

10 x Taq Puffer (Fa. Eppendorf)

DMSO

Primer

- für Typisierungen:

Primer	Primer Sequenz (5'-3')
MLH1 A	5'-tgt caa tag gct gcc cta gg-3'
MLH1 B	5'-tgg aag gat tgg agc tac gg-3'
MLH1 C	5'-ttt tca gtg cat cct atg ctc-3'
β2m forward	5'-gta aca cag ttc cac ccg cc-3'
β2m reverse	5'-gct cgg cca tac tgt cat gc-3'
oIMR0205	5'-ttt ttg aga ccc tgt aga ccc a-3'
oIMR0206	5'-gca tcg cct tct atc gcc ttc t-3'
oIMR0207	5'-ccg gtc ctg aac tcc tgg cca c-3'
oIMR0208	5'-ccc ctg cac aca tta ctg gaa g-3'

- für Genexpressionsstudien:

Primer	Primer Sequenz (5'-3')
TdT	forw.: 5'-gaa gat ggg aac aac tcg aag ag-3' rev.: 5'-cag gtg ctg gaa cat tct ggg ag-3'
E2A	forw.: 5'-cat cca tgt cct gcg aag cca-3' rev.: 5'-ttc ttg tcc tct tcg gcg tc-3'
Rag	forw.: 5'-aac cac cag tcc ttt cat cg-3' rev.: 5'-gtc agg gga agg atg tgc ta-3'
Pax5	forw.: 5'-tca gga cag gac atg gag gag-3' rev.: 5'-gat cct gtt gat gga gct gac g-3'
CDK4	forw.: 5'-gta cgg ctg atg gat gtc tgt-3' (left) rev.: 5'-agc ttg acg gtc cca tta ctt-3' (right)
Tal1	forw.: 5'-aac cgg gtg aag agg agg ccc tcc-3' rev.: 5'-aag cac gtc ctg tag aag gtc-3'
Mult1	forw.: 5'-gcc ttt ctc gga ttg atc ttc-3' rev.: 5'-ttc aac ttc cga gga cag aga-3'
RAE-1 (H60)	sense: 5'-att gcc tcg agg atg gta cag act ctc taa gt-3' antis.: 5'-tat cct cga gca gac cct ggt tgt cag aat tat gtc-3'

- für Mikrosatelliten-Instabilitäts-Assay:

Primer	Primer Sequenz (5'-3')
D17Mit123	forw.: 5'-cac aag gag gga gcc tgt ag-3' rev.: 5'-cac cgt aag agt cta ata ata agg gg-3' (5'FAM)
D7Mit91	forw.: 5'-tct tgc ttg cat aca ctc acg-3' rev.: 5'-gag aca aac cgc agt ctc ct-3' (5'HEX)
D9Mit17	forw.:5'-gcc aag gct gtc tct tag cc-3' rev.: 5'-gag aga agg gtt ctg ggc ag-3' (5'FAM)
D10Mit2	forw.:5'-gtt cat ttg agg cac aag ca-3' (5'HEX) rev.: 5'-ctg ctc aca acc cat tcc tt-3' (left)
L24372	-P1: 5'-ggg aag act gct tag gga aga -3' -P2: 5'-att gga taa gta tga ggt act-3' -P3: 5'-att tgg ctt tca agc atc cat a-3' (5'FAM)
Aa006036	-P1: 5'-acg tca aaa atc aat gtt agg-3' -P2:5'-ttg ctg aat tgg tga gct tc-3' -P3:5'-cag caa ggg tcc ctg tct ta-3' (5'HEX)
U12235	-P1: 5'-gct cat ctt cgt tcc ctg tc-3' -P2: 5'-taa cac tgg aag cca ttc gg-3' -P3: 5'-cat tgc gtg gaa agc tct ga-3' (5'HEX)

RNA-Isolation

Trizol-Reagent, Isopropanol, Ethanol, DEPC-Wasser

Lysieren von Erythrozyten

Ammonium Chlorid

Gebrauchslösungen für Zellsuspensionen

PBS

FACS-Puffer (490 µl PBS, 5 ml 10% Natriumacid, 5 ml FCS)

Histologische Verfahren

4 % Paraformaldehyd (PFA):

- gepuffertes Formalin
 - 9,07 g KH₂PO₄
 - 11,86 g Na₂HPO₄
 - lösen in 860 ml A. dest
 - 140 ml 37% Formalin zugeben
 - pH 7,4 einstellen
- Methanol

-für 4 % PFA werden 10 % Methanol zu dem gepufferten Formalin zugegeben

Isopropanol, Xylol, Parafin, Hämatoxylin, Eosin

1.3. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Labohrmarken, nummeriert	Hauptner-Herberholz, Solingen
Zellsiebe, 70µm, steril	BD Falcon, USA
50 ml Falcons	BD
15 ml Falcons	BD
FACS-Röhrchen	Greiner BioOne
1,5 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf
2,0 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf
Kryoröhrchen	
Einwegpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	TPP
Pipettenspitzen (kristall, gelb, blau)	Brand
Deckgläser (20*20*0,4 mm)	Hartenstein, Würzburg
Neubauer-Zählkammer	Mariemfeld
Objektträger	Fa. Menzel
Deckgläschen	Fa. Menzel
MicroBeat-Aufreinigungssäulchen	Miltenyi Biotec

1.4. Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Pipetten (10, 20, 100, 1000 µl)		Brand
Pipettierhilfe		
Blockthermostat	BT 100	Kleinfeld, Gehrden
Brutschrank	Hereaeus Function Line	Heraeus Instruments, Hanau
MACS-Magnet		Milteny
FACS-Analyse	FACS Scan	Becton Dickinson
Gelelektrophoresesystem	Subcell GT-System	Biorad, München
Magnetrührer		Mariemfeld
PCR-Thermocycler, 25 Well	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
PCR-Thermocycler, 96 Well	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	inoLab	WTW, Weilheim
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Reagenzglas mixer	Vortex	neoLab, Heidelberg
Spektralphotometer	UltraspecIII	Pharmacia Biosystems, Freiburg
Stereomikroskop	SMZ 1500	Nikon, Japan
Sterilbank	Heraeus HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad	EcoTemp TW12	Julabo, Seelbach
Tischentrifuge, groß	5804 R, gekühlt	Eppendorf, Hamburg
Tischentrifuge, klein	5415 D	Eppendorf, Hamburg

1.5. Analyseprogramme und Datenbanken

Programme
Microsoft Word (Office XP Professional)
Microsoft Excel (Office XP Professional)
SPSS for Windows 1.1
Microsoft PowerPoint (Office XP Professional)
Adobe Photoshop 5.0
Cell Quest 3.3 (Becton Dickinson)

2. Methoden

2.1. Tumorkontrolle der Mauslinien (monitoring)

Die Populationen wurden über einen Zeitraum von 60 Wochen kontinuierlich auf Krankheitssymptome überwacht. Sichtbare Erkrankungsanzeichen sind u.a. Verhaltensauffälligkeiten, anämische Extremitäten, Hautveränderungen, Blutstuhl oder vergrößerte lymphatische Organe. Diese Tiere wurden schmerzlos getötet und die Erkrankungsursache festgestellt. In Sektionsprotokollen wurden untersuchungsrelevante Daten, wie z.B. Alter, Geschlecht der Tiere, Art, Anzahl und Größe der gefundenen Tumoren festgehalten. Unauffällige Tiere wurden nach 60 Wochen ebenfalls schmerzlos getötet, sezirt und auf mögliche Erkrankungen untersucht.

Tumormaterial wurde für eine Tumorbank *Mlh1*^{-/-}-Mäuse gesammelt. Formalinfixiertes, bzw. nativ gefrorenes Tumorgewebe diente der Erstellung histologischer Schnittpräparate. DNA wurde isoliert und für Mikrosatelliten-Instabilitäts-Untersuchungen verwendet. In Einzelzellsuspension überführte lymphoide Tumoren wurden für immunphänotypische Untersuchungen eingesetzt. Von aus Lymphomen isolierter RNA wurden Genexpressionsstudien durchgeführt. Die histologischen, immunologischen, und molekularbiologischen Analysen dienten der Charakterisierung in *Mlh1* defizienten Mäusen auftretenden Tumoren.

2.2. Probengewinnung

2.2.1. Tumorgewebe für histologische Befundung

Durchführung: Ein Teil der Tumorgewebe wurde in 4% gepuffertem Paraformaldehyd aufgenommen und bei 2-8°C gelagert. Diese Proben wurden entwässert und in Parafin eingebettet und für die Übersichtsfärbungen (HE- und Giemsa-Färbung) geschnitten.

Ein weiterer Teil wurde sofort in Kryoröhrchen überführt, mit OCT überschichtet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert. Diese Proben dienten für Nativschnitte mit dem Kryotom und anschließende immunhistochemische Färbungen.

Material:

- Eppendorf-Tubes, 2 ml
- 50 ml Falcons
- Kryoröhrchen
- OCT (Einbettmedium für kryokonservierte Gewebe)
- Flüssiger Stickstoff

2.2.2. Probengewinnung für Immunphänotypisierung und RNA-Isolation

Tumorinfiltrierte lymphatische Organe wurden immunphänotypisch charakterisiert.

Durchführung: Hierzu wurden Teile des Gewebes durch ein Zellsieb gerieben und in 10-20ml FACS-Puffer aufgenommen.

Stark erythrozytenhaltige Organe (z.B. Milz) wurden durch 10 Minuten Inkubation in 10%iger Ammoniumchlorid-Lösung lysiert.

Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut durch ein Zellsieb gefiltert, um Zellverklumpungen und Detritus zu entfernen.

Zellzahlbestimmung eines Aliquots mit Neubauer-Zählkammer.

Ein Teil der Zellsuspension wurde für die FACS-Analyse eingesetzt, aus einem weiteren Teil RNA isoliert (siehe „RNA-Isolation aus Zellsuspensionen mittels Trizol“).

Material:

Zellsiebe (70µm Maschendurchmesser)

50 ml Falcons

FACs-Puffer (490 ml PBS mit 5 ml 1% FCS und 5 ml 0,01% Natrium-Acetat)

PBS

Ammonium Chlorid (mit H₂O verdünnte 10%ige Arbeitskonzentration)

Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer

Durchführung: Aus 10 ml Zellsuspension 100 µl Aliquot entnehmen und in 900 µl PBS-Puffer (oder FACs-Puffer) aufnehmen (Verdünnungsfaktor 1:10) und ca. 10 µl unter das Deckglas der Neubauerzählkammer geben.

Zellen unter dem Mikroskop in einem der 4 Gruppenquadranten (unterteilt in 16 Kleinstquadranten) auszählen. Ermittelte Zellzahl eines Gruppenquadranten mit dem Verdünnungsfaktor 10 und dem Kammerfaktor 10⁴ multiplizieren → Zellzahl/ml.

Material:

PBS-Puffer

Neubauer-Zählkammer und Deckglas

2.3. Histologische Methoden

Gewebeproben wurden in 4% Paraformaldehyd aufgenommen oder als Nativmaterial OCT-überschichtet, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Paraformaldehyd-Fixierung:

- Gewebe in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixieren (8-18h bei RT, für längere Zeit 4°C)
- 2-6 Stunden in Leitungswasser spülen
- Aufsteigende Alkoholreihe (jeder Schritt etwa 45-60 Minuten):
 - 20% Isopropanol
 - 40% Isopropanol
 - 60% Isopropanol

- 80% Isopropanol
- 100% Isopropanol
- 100% Isopropanol
- 100% Isopropanol
- 1 Stunde in Xylol
- 1 Stunde in Xylol
- 1 Stunde in Xylol
- 4 Stunden in heissem (55-65°C) Paraffin
- 8 bis 16 Stunden in heissem (55-65°C) Paraffin
- 4 Stunden in heissem (55-65°C) Paraffin
- einblocken in heissem Paraffin

Die Schnittpräparate wurden nach den geläufigen Protokollen für HE- und Giemsa-Färbung aufgearbeitet.

2.4. Immunphänotypisierung mittels FACS-Analyse

Durchführung: Aus der gewonnenen Einzelzellsuspension werden pro Ansatz mindestens $2,0 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen.

Zentrifugation: 5 Min (1200 rpm).

Überstand abgießen und jeweils 20 µl 2-4 AK-Antikörper zugeben, 20 Minuten inkubieren (unspezifische Bindungsstellen werden abgedeckt).

Anschließend Antikörperverdünnungen zugeben, jeweils 50 µl von jeder AK-Verdünnung. Inkubation bei 4°C für 30 Min.

Waschen mit 1 ml FACS-Puffer. Zentrifugation: 5 Min (1200 rpm). Überstand abgießen.

Aufnehmen der Zellen in 2-3 Tropfen FACS-Puffer (bereit für Messung).

Falls benötigt, 50 µl der sekundären Antikörperverdünnung (z.B. Streptavidin Cy oder Streptavidin FITC) zugeben. Inkubation bei 4°C für 30 Min.

Waschen mit 1 ml FACS-Puffer. Zentrifugation: 5 Min (1200 rpm). Überstand abgießen, aufnehmen der Zellen in 2-3 Tropfen FACS-Puffer.

Eine Lagerung bei 4°C in 1-2 ml FACS-Puffer ist über Nacht möglich. Die Analyse und Auswertung erfolgt am FACS-Scan (Software: „Cell Quest“).

Material:

FACS-Puffer

Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper (siehe Material „FACs-Antikörper“)

2.5. DNA-Methoden

Verschiedene Techniken zur Isolation von DNA aus Tumor-/Normal-Gewebe wurden durchgeführt. Zur Typisierung der Mäuse wurden das „DNeasy tissue kit“ sowie die „DNA-Isolation ohne Säulenaufreinigung“ verwendet. Zur Tumor-DNA-Isolation wurde hauptsächlich „DNA-Isolation ohne Säulenaufreinigung“ und die „DNA-Isolation aus Trizolbehandelten Zellsuspensionen“ durchgeführt.

DNA-Isolation mit DNeasy tissue kit

Durchführung: 180 µl ATC-Puffer und 20 µl Proteinase K zu dem 1,5 ml Epi mit Gewebeprobe geben. Probe mindestens 6 Stunden in Brutschrank bei 55°C verdauen (in Rotationsmischer).

400 µl AL-Puffer (AL-Ethanol-Gemisch) zusetzen und 15 Sekunden vortexen.

Probe auf DNeasy mini column auftragen und 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren.

Neues Auffanggefäß unter die Säule bringen.

500 µl AW1-Puffer auf Säule auftragen, Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 rpm.

Neues Auffanggefäß unter die Säule bringen.

500 µl AW2-Puffer auf Säule auftragen, Zentrifugation für 3 Minute bei 13000 rpm.

Säule in steriles 1,5 ml Epi stellen, 100 µl AE-Puffer direkt auf Säule geben, 1 Minute bei RT inkubieren. Zentrifugation bei 8000 rpm, 1 Minute.

Nochmals 100 µl AE-Puffer auf Säule geben, 1 Minute bei RT inkubieren.

Zentrifugation bei 8000 rpm, 1 Minute.

Proben in Kühlschrank (2-8°C) lagern.

Material:

DNeasy tissue kit (Fa. Quiagen)

Eppendorf Tubes, 1,5 ml

Brutschrank

Rotationsmischer

DNA-Isolation ohne Säulenaufreinigung (Tumorgewebe, Schwanzspitze)

Durchführung: Zur Genotypisierung von Nachkommen aus heterozygoten Zuchtpaaren der interessierenden Mausinzuchtlinien muss zunächst DNA isoliert werden. Hierzu wird den ~3 Wochen alten Nachkommen ca. 0,5 mm von der Schwanzspitze abgenommen und wie folgt DNA isoliert:

Schwanzspitze (oder Tumorgewebe) in 200µl Lysispuffer aufnehmen und 10 µl Proteinase K (Endkonzentration: 10 mg/ml) zugeben. Verdau bei 55°C, mindestens 2 Stunden. Vortexen. 8 Minuten bei 100°C aufkochen. 5 Minuten zentrifugieren bei maximaler Umdrehungszahl. DNA bei 4°C lagerbar .

Material:

Lysispuffer: 2,5 ml 10%ige Sacrosyllösung

1 ml 5M NaCl

2,5 g Chelex (Biorad)

ad 50 ml ddH₂O

ProteinaseK (Ausgangslösung: 20 mg/ml)

DNA-Isolation aus Trizol-behandelten Zellsuspensionen

Durchführung: Die organische Phase aus der RNA-Isolation mittels Trizol (siehe „RNA-Isolation mittels Trizol“) wird in neues 2 ml Epi überführt und die DNA mit 0,3 ml 100% Ethanol versetzt (DNA-Fällung) und gevortext. 2-3 Min. bei RT inkubieren, danach 5 Min. bei 2000 rcf (2-8°C) zentrifugiert.

Der Überstand wird appipettiert und kann ggf. für Protein-Isolation weiterverwendet werden.

Das Pellet wird zweimal mit 1 ml 0,1 molarem Natrium-Citrat (in 10% Ethanol gelöst) gewaschen. Nach jedem Waschgang wird die Probe 30 Min. bei RT inkubiert, und 5 Minuten bei 2000 rcf (2-8°C) zentrifugiert.

Das Pellet anschließend in 1,5-2,0 ml 75%igem Ethanol waschen und 10-15 Minuten bei RT inkubieren (Nach diesem Schritt kann die Probe übernacht bei 2-8°C gelagert werden).

Probe 5 Minuten bei 2000 rcf (2-8°C) zentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet bei RT ca. 15 Minuten trocknen lassen.

Pellet in 300-600 µl 8 molarer NaOH (pH 9,0) resuspendieren und Proben bei -80°C lagern.

Material:

100% Ethanol

75% Ethanol

0,1 molares Natrium-Citrat (in 10%igem Ethanol gelöst)

8 molare NaOH (pH 9,0)

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Durchführung: DNA wird 1:100 mit Wasser verdünnt und bei 260nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Da DNA UV-Licht der Wellenlänge 260nm absorbiert, kann ihre Konzentration durch eine Extinktionsmessung bei 260nm bestimmt werden.

Als Nullabgleich dient eine mit H₂O gefüllte Küvette. Insgesamt wird die Optische Dichte (OD) bei den Wellenlängen 320, 280, 260 und 230nm vermessen

OD₂₃₀ = organische Lösungsmittelverunreinigungen

OD₂₆₀ = DNA-Gehalt

OD₂₈₀ = Proteinverunreinigungen

Hierbei sollten die Quotienten OD₂₆₀/OD₂₃₀ und OD₂₆₀/ OD₂₈₀ bei gereinigter DNA zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

Material:

H₂O

Küvetten

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR stellt eine in vitro Methode zur Amplifikation geringster DNA-Mengen dar. Voraussetzung hierfür ist, dass die Sequenzen, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, bekannt sind. Mit Hilfe dieser Kenntnis können geeignete Primer erstellt werden (Primerdesign-Programm, http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Durchführung: Aufgrund der kleinen zu pipettierenden Volumina wird bei mehreren PCR-Ansätzen ein Master-Mix vorbereitet, er enthält neben den Primern, dNTPs, Taq-Puffer, Taq-Polymerase und ggf. DMSO. Aliquote des Mastermix werden in PCR-Reaktionstubes vorgelegt und mit jeweils 1-2 µl DNA versetzt. Die Amplifikation erfolgt in den PCR-Cyclern, die Proben durchlaufen mehrere Temperaturschritte.

Jeder Replikationszyklus der PCR besteht aus drei Schritten:

- der Trennung der DNA-Doppelhelix durch kurzzeitiges Erhitzen über die DNA-Schmelztemperatur (92-98°C),
- dem Primerannealing (55-65°C)
- und der Elongation, die bei Temperaturoptimum der jeweiligen Taq-Polymerase erfolgt (Taq-Polymerase: 72°C; Accu Taq-Polymerase: 68°C).

Durchschnittlich werden 25-35 Replikationszyklen durchgeführt wobei man eine exponentielle Vermehrung 2^n (n =Anzahl der Replikationszyklen) der DNA-Moleküle erhält.

Aliquote der amplifizierten PCR-Produkte werden mit Schwerepuffer versetzt und auf ein 1-1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

- PCR-Ansätze und -Protokolle:

„Mlh1“	Mastermix: 1 Ansatz [µl]	„β2m“
DNA	1,0	DNA
H2O	32,7	H2O
10x Taq-Puffer	5,0	10x Taq-Puffer
dNTP	1,0	dNTP
Mlh1 A	5,0	β2m A
Mlh1 B	2,5	β2m B
Mlh1 C	2,5	β2m C
Taq-Poymerase	0,3	Taq-Poymerase
gesamt	50,0	gesamt
		Mastermix: 1 Ansatz [µl]
		DNA
		H2O
		MgCl ₂ 25mmol
		10x Taq-Puffer
		dNTP
		oiMR0206
		oiMR0207
		oiMR0208
		oiMR0209
		Taq-Poymerase
		gesamt
		50,0
„Mlh1“	Temperatur	Zeit
33 Cyclen	Denaturation	95°C
	Denaturation	95°C
	Annealing	56°C
	Elongation	72°C
	Elongation	72°C
Lagerung	4-8°C	∞
„β2mneu“	Temperatur	Zeit
13 Cyclen	Denaturation	94°C
	Denaturation	94°C
	Annealing	62°C
	Elongation	72°C
	Elongation	72°C
26 Cyclen	Denaturation	94°C
	Annealing	56°C
	Elongation	72°C
Lagerung	4-8°C	∞
„PER001“	Temperatur	Zeit
35 Cyclen	Denaturation	94°C
	Denaturation	94°C
	Annealing	55°C
	Elongation	72°C
	Elongation	72°C
Lagerung	4-8°C	∞

PCR-Protokolle und PCR-Programme für Mlh1-, β2m- und Perforin-Typisierung.

Material:

Template-DNA
 Primer
 Taq-Polymerase
 dNTP-Mix (2mM)
 10 x Taq-Polymerase-Puffer
 25 mM MgCl₂

Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

DNA trägt eine negative Nettoladung und wandert daher in einem elektrischen Feld zur Anode. Hierbei wandern DNA-Fragmente mit kleinem Molekulargewicht schneller als solche mit einem größeren Molekulargewicht. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (interkaliert zwischen den Basen) lassen sich die DNA-Banden bei 250-360nm visualisierbar machen.

Durchführung: Agarose der gewünschten Konzentration (effektive Trennbereiche siehe Tabelle) in 0,5 x TBE-Puffer aufnehmen und in der Mikrowelle aufkochen. 0,5 µl Ethidiumbromid zu 10 ml Agaroselösung zugeben. Gelschlitten mit Kamm in den Gelspanner einsetzen und Agaroselösung luftblasenfrei eingießen und aushärten lassen. Gel in die mit 0,5 x TBE gefüllte Elektrophoresekammer transferieren. 50 µl DNA-Produkt mit 4 µl Ladepuffer versetzen, mischen und 15 µl in die Taschen pipettieren. Gellauf bei 80-130 V für 40-60 Minuten. Im Ladepuffer markiert Bromphenolblau die untere Lauffront und Xylencyanol die obere Lauffront. Elektrophorese stoppen. Gel unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm fotografieren.

Konzentration [%]	0,3	0,6	0,7	0,9	1,2	1,5	2,0
Eff.Trennbereich [kb]	5,0-60	1,0-20	0,8-10	0,5-7,0	0,4-6,0	0,2-4,0	0,1-0,3

Effektive Trennbereiche von Agarosegelen.

Material:

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 µg/ml
 4 x Ladepuffer: 25ml Glycerin
 10 ml 0,5M EDTA
 2,5 ml 20% Natriumdoecylsulfat (SDS)
 125 mg 3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfonphtalein (Bromphenolblau)
 125 mg Xylencyanol
 DNA-Größenmarker
 0,5 x TBE: 44,5 mM Tris, pH 7,6
 44,5 mM Borsäure
 1mM EDTA
 Agarose

2.5.1. Mikrosatelliteninstabilitäts-(MSI-)Assay

Die DNA-Proben der Tumormäuse wurden auf Instabilitäten in 7 verschiedenen Mikrosatelliten getestet. Die MSI-Marker sind mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Die Produktamplifikation erfolgte mittels normaler PCR-Technik.

Insgesamt wurden 4 verschiedene PCR-Läufe/-Protokolle durchgeführt. Bei den Multiplex-PCRs wurden mehrere Primer gleichzeitig eingesetzt, dies ist möglich, wenn unterschiedliche Produktgröße und Fluoreszenzfarbstoffe vorliegen. In der Multiplex A-PCR wurden die beiden Dinukleotid-Marker D 17 Mit 123 und D 7 Mit 91 und bei der Multiplex D-PCR die Marker D 9 Mit 17 und D 10 Mit 2 getestet. Bei der seminested Multiplex B wurden die beiden Mononucleotid-Marker Aa 006036 und L 24372 untersucht. In der seminested PCR U12235 wurde nur ein Mononucleotid-Marker untersucht, U 12235 genannt. Von einer seminested PCR spricht man, wenn in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Läufen einer von den drei verwendeten Primern wiederholt verwendet wird. Der im zweiten Lauf verwendete dritte Primer kodiert für einen Bereich im amplifizierten Produkt aus der ersten PCR.

Die Produkte wurden auf einem ABI-Sequenzier aufgetragen und gemessen.

<i>MSI-Primer</i>	<i>Produktgröße [bp]</i>	<i>Programm</i>
D 17 Mit 123-FAM	133	
D7 Mit 91-HEX	145	Multiplex B
D9 Mit 17-FAM	156	
D10 Mit 2-HEX	123	Multiplex D
U 12235-HEX	85	U 12235
L 24372-FAM	89	
Aa 006036	86	Multiplex A

<i>„MSI003“</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Denaturation	94°C	4 Minuten
30 Cyclen	Denaturation	94°C
	Annealing	58°C
	Elongation	72°C
Elongation	72°C	2 Minuten
Lagerung	4-8°C	∞

PCR-Protokoll und PCR-Programm für MSI-Analyse

<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Multiplex A</i></th> <th><i>1 Ansatz [µl]</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>DNA</td><td>1-2</td></tr> <tr><td>H2O</td><td>12,5</td></tr> <tr><td>10x Taq-Puffer</td><td>3,0</td></tr> <tr><td>dNTP</td><td>0,4</td></tr> <tr><td>D 17 Mit 123 forward</td><td>0,6</td></tr> <tr><td>D 17 Mit 123-HEX reverse</td><td>0,6</td></tr> <tr><td>D 7 Mit 91 forward</td><td>0,4</td></tr> <tr><td>D 7 Mit 91-FAM reverse</td><td>0,4</td></tr> <tr><td>Taq-Poymerase</td><td>0,144</td></tr> <tr><td>gesamt</td><td>20,0</td></tr> </tbody> </table>		<i>Multiplex A</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>	DNA	1-2	H2O	12,5	10x Taq-Puffer	3,0	dNTP	0,4	D 17 Mit 123 forward	0,6	D 17 Mit 123-HEX reverse	0,6	D 7 Mit 91 forward	0,4	D 7 Mit 91-FAM reverse	0,4	Taq-Poymerase	0,144	gesamt	20,0	<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Multiplex D</i></th> <th><i>1 Ansatz [µl]</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>DNA</td><td>1-2</td></tr> <tr><td>H2O</td><td>12,5</td></tr> <tr><td>10x Taq-Puffer</td><td>3,0</td></tr> <tr><td>dNTP</td><td>0,4</td></tr> <tr><td>D 9 Mit 17 forward</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>D 9 Mit 17-FAM reverse</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>D 10 Mit 2 forward</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>D 10 Mit 2-HEX reverse</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>Taq-Poymerase</td><td>0,144</td></tr> <tr><td>gesamt</td><td>20,0</td></tr> </tbody> </table>		<i>Multiplex D</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>	DNA	1-2	H2O	12,5	10x Taq-Puffer	3,0	dNTP	0,4	D 9 Mit 17 forward	0,5	D 9 Mit 17-FAM reverse	0,5	D 10 Mit 2 forward	0,5	D 10 Mit 2-HEX reverse	0,5	Taq-Poymerase	0,144	gesamt	20,0
<i>Multiplex A</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>																																														
DNA	1-2																																														
H2O	12,5																																														
10x Taq-Puffer	3,0																																														
dNTP	0,4																																														
D 17 Mit 123 forward	0,6																																														
D 17 Mit 123-HEX reverse	0,6																																														
D 7 Mit 91 forward	0,4																																														
D 7 Mit 91-FAM reverse	0,4																																														
Taq-Poymerase	0,144																																														
gesamt	20,0																																														
<i>Multiplex D</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>																																														
DNA	1-2																																														
H2O	12,5																																														
10x Taq-Puffer	3,0																																														
dNTP	0,4																																														
D 9 Mit 17 forward	0,5																																														
D 9 Mit 17-FAM reverse	0,5																																														
D 10 Mit 2 forward	0,5																																														
D 10 Mit 2-HEX reverse	0,5																																														
Taq-Poymerase	0,144																																														
gesamt	20,0																																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Multiplex B (1 st round)</i></th> <th><i>1 Ansatz [µl]</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>DNA</td><td>1-2</td></tr> <tr><td>H2O</td><td>10,5</td></tr> <tr><td>10x Taq-Puffer</td><td>3,0</td></tr> <tr><td>dNTP</td><td>0,4</td></tr> <tr><td>Aa 006036 Primer 1</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>Aa 006036 Primer 2</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>L 24372 Primer 1</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>L 24372 Primer 2</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>Taq-Poymerase</td><td>0,144</td></tr> <tr><td>gesamt</td><td>20,0</td></tr> </tbody> </table>		<i>Multiplex B (1 st round)</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>	DNA	1-2	H2O	10,5	10x Taq-Puffer	3,0	dNTP	0,4	Aa 006036 Primer 1	1,0	Aa 006036 Primer 2	1,0	L 24372 Primer 1	1,0	L 24372 Primer 2	1,0	Taq-Poymerase	0,144	gesamt	20,0	<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Multiplex B (2 nd round)</i></th> <th><i>1 Ansatz [µl]</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>DNA aus 1 st round</td><td>1</td></tr> <tr><td>H2O</td><td>10,5</td></tr> <tr><td>10x Taq-Puffer</td><td>3,0</td></tr> <tr><td>dNTP</td><td>0,4</td></tr> <tr><td>Aa 006036 Primer 1</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>Aa 006036-HEX Primer 3</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>L 24372 Primer 1</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>L 24372-FAM Primer 3</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>Taq-Poymerase</td><td>0,144</td></tr> <tr><td>gesamt</td><td>20,0</td></tr> </tbody> </table>		<i>Multiplex B (2 nd round)</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>	DNA aus 1 st round	1	H2O	10,5	10x Taq-Puffer	3,0	dNTP	0,4	Aa 006036 Primer 1	1,0	Aa 006036-HEX Primer 3	1,0	L 24372 Primer 1	1,0	L 24372-FAM Primer 3	1,0	Taq-Poymerase	0,144	gesamt	20,0
<i>Multiplex B (1 st round)</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>																																														
DNA	1-2																																														
H2O	10,5																																														
10x Taq-Puffer	3,0																																														
dNTP	0,4																																														
Aa 006036 Primer 1	1,0																																														
Aa 006036 Primer 2	1,0																																														
L 24372 Primer 1	1,0																																														
L 24372 Primer 2	1,0																																														
Taq-Poymerase	0,144																																														
gesamt	20,0																																														
<i>Multiplex B (2 nd round)</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>																																														
DNA aus 1 st round	1																																														
H2O	10,5																																														
10x Taq-Puffer	3,0																																														
dNTP	0,4																																														
Aa 006036 Primer 1	1,0																																														
Aa 006036-HEX Primer 3	1,0																																														
L 24372 Primer 1	1,0																																														
L 24372-FAM Primer 3	1,0																																														
Taq-Poymerase	0,144																																														
gesamt	20,0																																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>U 12235 (1 st round)</i></th> <th><i>1 Ansatz [µl]</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>DNA</td><td>1-2</td></tr> <tr><td>H2O</td><td>13,8</td></tr> <tr><td>10x Taq-Puffer</td><td>3,0</td></tr> <tr><td>dNTP</td><td>0,4</td></tr> <tr><td>U 12235 Primer 1</td><td>0,35</td></tr> <tr><td>U 12235 Primer 2</td><td>0,35</td></tr> <tr><td>Taq-Poymerase</td><td>0,144</td></tr> <tr><td>gesamt</td><td>20,0</td></tr> </tbody> </table>		<i>U 12235 (1 st round)</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>	DNA	1-2	H2O	13,8	10x Taq-Puffer	3,0	dNTP	0,4	U 12235 Primer 1	0,35	U 12235 Primer 2	0,35	Taq-Poymerase	0,144	gesamt	20,0	<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>U 12235 (2 nd round)</i></th> <th><i>1 Ansatz [µl]</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>DNA</td><td>1-2</td></tr> <tr><td>H2O</td><td>13,8</td></tr> <tr><td>10x Taq-Puffer</td><td>3,0</td></tr> <tr><td>dNTP</td><td>0,4</td></tr> <tr><td>U 12235 Primer 1</td><td>0,35</td></tr> <tr><td>U 12235-HEX Primer 3</td><td>0,35</td></tr> <tr><td>Taq-Poymerase</td><td>0,144</td></tr> <tr><td>gesamt</td><td>20,0</td></tr> </tbody> </table>		<i>U 12235 (2 nd round)</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>	DNA	1-2	H2O	13,8	10x Taq-Puffer	3,0	dNTP	0,4	U 12235 Primer 1	0,35	U 12235-HEX Primer 3	0,35	Taq-Poymerase	0,144	gesamt	20,0								
<i>U 12235 (1 st round)</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>																																														
DNA	1-2																																														
H2O	13,8																																														
10x Taq-Puffer	3,0																																														
dNTP	0,4																																														
U 12235 Primer 1	0,35																																														
U 12235 Primer 2	0,35																																														
Taq-Poymerase	0,144																																														
gesamt	20,0																																														
<i>U 12235 (2 nd round)</i>	<i>1 Ansatz [µl]</i>																																														
DNA	1-2																																														
H2O	13,8																																														
10x Taq-Puffer	3,0																																														
dNTP	0,4																																														
U 12235 Primer 1	0,35																																														
U 12235-HEX Primer 3	0,35																																														
Taq-Poymerase	0,144																																														
gesamt	20,0																																														

Tab.: MSI-PCR-Protokolle für Mutiplex A, Multiplex D, Multiplex B (seminested PCR) und U 12235 (seminested PCR)

2.6. RNA-Methoden

RNA-Isolation aus Zellsuspensionen mittels Trizol

Durchführung: Ein Aliquot der vereinzelt und in FACS-Puffer (für Immunphänotypisierung) aufgenommenen Zellen wird mit PBS gewaschen und das Pellet anschließend in Trizol resuspendiert. Jeweils $1 \cdot 10^7$ Zellen werden mit jeweils 1 ml Trizol versetzt.

Probe 10 Minuten bei RT inkubieren (und ggf. wegfrieren bei -20°C).

Je 1 ml Trizol-Probengemisch in 1,5 ml Epi aufnehmen und 0,2 ml Chloroform zusetzen; 2-3 Minuten bei RT inkubieren. 15 Minuten bei 12000 rcf zentrifugieren ($2-8^\circ\text{C}$).

Wässrige Phase in neues 1,5 ml Epi überführen (organische Phase für DNA/Protein-Isolation ggf. aufheben). 0,5 ml Isopropanol zur wässrigen Phase geben, vorsichtig mischen und 10 Minuten bei RT inkubieren. Zentrifugation für 20 Minuten (ggf. auch länger \rightarrow höhere Ausbeute) bei 12000 rcf ($2-8^\circ\text{C}$).

Überstand durch Abgießen verwerfen, Pellet in 1 ml 75% Ethanol aufnehmen und Probe vortexen. Zentrifugation für 5 Minuten bei 7500 rcf ($2-8^\circ\text{C}$).

Überstand vorsichtig abpipettieren und Pellet ca. 15 Minuten bei RT trocknen lassen. Pellet in 30 μl DEPC-Wasser resuspendieren (ggf. durch Erwärmen auf 55°C für 5 Minuten)

1 μl Aliquot mit 79 μl DEPC-Wasser verdünnen und RNA-Gehalt messen.

Probe bei -80°C einfrieren.

2.6.1. Genexpressionsanalyse (RT-PCR)

Für Genexpressionsanalysen wurden RNA-Proben durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt und diese in darauffolgenden PCR-Läufen amplifiziert. Im Vergleich zu einem ebenfalls getesteten Referenz-Gen (GAPDH) ist - bei gleichen eingesetzten Mengen an Ausgangs-RNA- eine semiquantitative Aussage über die RNA-Expression von untersuchten Genen in den verschiedenen Lymphomproben möglich. Für die RT-PCR-Analysen wurde das ImProm-IITM Reverse Transcription System der Firma Promega verwendet.

Reverse Transkription: Hierzu wird jeweils 1 μg RNA mit RNase-freiem Wasser auf insgesamt 4 μl Endvolumen in ein 1,5 ml Epi vorgelegt. 1 μl Random primer zusetzen, vortexen und kurz zentrifugieren. 5 Minuten Inkubation bei 70°C , dann die Proben auf Eis lagern.

Reaktionsmix herstellen: pro Ansatz (RNA-Probe) 15 μl Reaktionsmix.

Hierzu 7,8 μl RNase-freies Wasser, 4,0 μl 5 x Reaktionspuffer (ImProm-buffer), 1,2 μl MgCl_2 , 1,0 μl 10 mM dNTP-Mix und 1,0 μl Reverse Transkriptase pipettieren und auf Eis lagern. Als Positiv-Kontrolle dient die mitgelieferte Kanamycin-RNA-Probe, der zu verwendene Reaktionsmix unterscheidet sich von dem Proben-Reaktionsmix lediglich in der eingesetzten MgCl_2 -Konzentration (4,8 μl MgCl_2 und dementsprechend nur 4,2 μl RNase-freies Wasser).

Jeweils 15 μl Reaktionsmix zur oben vorbereiteten RNA/Random-Primer-Probe geben. 5 Minuten bei 25°C inkubieren, anschließend 60 Minuten bei 42°C . Proben kurz zentrifugieren, dann in einem letzten Inkubationsschritt 15 Minuten bei 70°C inkubieren. Proben auf Eis lagern oder bei $2-8^\circ\text{C}$ im Kühlschrank.

PCR der cDNA: Erfolgt wie jede andere PCR auch, allerdings ist beim Primerdesign zu berücksichtigen, dass die erstellte cDNA eine gespaltene Variante der normalen DNA ist und daher über keine intronischen Sequenzen mehr verfügt. Für die PCR wird jeweils 1 µl cDNA eingesetzt. Mastermix für Proben und die Kanamycin-Kontrolle vorpipettieren. Dieser enthält H₂O, Puffer, Primer, dNTPs, DMSO und Taq-Polymerase. Der Kanamycin-Kontrollmastermix unterscheidet sich vom Probenmastermix lediglich in den verwendeten Primern (Kanamycin upstream/downstream).

Es erfolgen im PCR-Cycler die Produktamplifikationen der cDNA-Proben in 25-35 Zyklen, wobei sich jeweils Denaturierung, Annealing und Elongation abwechseln. Je nach Schmelztemperatur der verwendeten Primer werden die Annealing-Temperatur und die Zyklen-Zahl angepasst.

Verschiedene Gene wurden getestet: Rag, TdT, E2A, Pax5, Rae-1 und Mult1. Das PCR-Protokoll und die PCR-Cyclerprogramme sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

	Probenmastermix: 1 Ansatz [µl]	Kanamycin-Kontrolle: 1 Ansatz [µl]
cDNA	1,0	1,0
DEPC-H ₂ O	38,3	38,3
10x Taq-Puffer	5,0	5,0
dNTP	1,0	1,0
forward primer	1,0	1,0
reverse primer	1,0	1,0
DMSO	2,5	2,5
Taq-Polymerase	0,2	0,2
gesamt	50,0	50,0

PCR-Protokoll für RT-PCR

	„GAPDH“	Temperatur	Zeit		„GAPDH30c“	Temperatur	Zeit
25 Cyclen	Denaturation	95°C	5 Minuten	30 Cyclen	Denaturation	95°C	5 Minuten
	Denaturation	95°C	30 Sekunden		Denaturation	95°C	30 Sekunden
	Annealing	60°C	30 Sekunden		Annealing	61°C	30 Sekunden
	Elongation	72°C	30 Sekunden		Elongation	72°C	30 Sekunden
	Elongation	72°C	10 Minuten		Elongation	72°C	10 Minuten
	Lagerung	4-8°C	∞		Lagerung	4-8°C	∞
30 Cyclen	Denaturation	95°C	5 Minuten	30 Cyclen	Denaturation	95°C	5 Minuten
	Denaturation	95°C	30 Sekunden		Denaturation	95°C	30 Sekunden
	Annealing	60°C	30 Sekunden		Annealing	62°C	30 Sekunden
	Elongation	72°C	30 Sekunden		Elongation	72°C	30 Sekunden
	Elongation	72°C	10 Minuten		Elongation	72°C	10 Minuten
	Lagerung	4-8°C	∞		Lagerung	4-8°C	∞
30 Cyclen	Denaturation	95°C	5 Minuten	27 Cyclen	Denaturation	95°C	5 Minuten
	Denaturation	95°C	30 Sekunden		Denaturation	95°C	30 Sekunden
	Annealing	64°C	30 Sekunden		Annealing	53°C	30 Sekunden
	Elongation	72°C	30 Sekunden		Elongation	72°C	30 Sekunden
	Elongation	72°C	10 Minuten		Elongation	72°C	10 Minuten
	Lagerung	4-8°C	∞		Lagerung	4-8°C	∞

PCR-Cyclerprogramme für RT-PCR

III Ergebnisse

1. Tumorgenese in Mlh1 defizienten Mäusen

Um den Einfluß des MMR-Systems auf die Tumorgenese zu untersuchen wurden Mäuse mit verschiedenen MMR-Gendefekten generiert. Solche Mausmodelle ermöglichen es, die auf MMR-Defizienz basierende Tumorgenese *in vivo* zu studieren. Insbesondere *Msh2* als auch *Mlh1* defiziente Mäuse wurden bisher als Modelle der Entstehung von gastrointestinalen Tumoren verwendet, da sie eine HNPCC- ähnliche Tumorentstehung aufweisen. Zudem entwickeln insbesondere *Mlh1*^{-/-}- und *Msh2*^{-/-}- Tiere lymphoide Tumoren. Die Charakterisierung dieser Lymphome und gleichzeitig die Analyse der Relevanz von MMR-Defekten für die Lymphomagenese war Schwerpunkt dieser Arbeit.

Die von Dr. Winfried Edelmann generierte Mlh1 defiziente Mauslinie wurde durch 10 fache Rückkreuzungen mit C57BL/6 auf einen reinen C57BL/6-Hintergrund gebracht (N10). Diese Tiere wurden verwendet, um die Entstehung, Inzidenz und Charakteristika von Tumoren MMR-defizienter Mäuse zu untersuchen.

Wie erwartet, entstanden aus Verpaarungen der *Mlh1*^{+/-}-Tiere nach dem Mendelschen Verteilungsgesetz etwa 25% *Mlh1*^{-/-}-, 25% *Mlh1*^{+/+}- und 50% *Mlh1*^{+/-}- Tiere. Insgesamt wurden für die Analyse der Tumorgenese 62 Mlh1 defiziente (*Mlh1*^{-/-}), 28 wildtypisch homozygote (*Mlh1*^{+/+}) und 19 heterozygote (*Mlh1*^{+/-}) mittels PCR genotypisierte Geschwistertiere für die Untersuchung verwendet.

Über einen Zeitraum von 60 Wochen wurde die Population kontinuierlich, d. h. zweimal wöchentlich, auf Krankheitssymptome überwacht. Mögliche sichtbare Erkrankungsanzeichen beginnender Tumorentwicklung waren u.a. Verhaltensauffälligkeiten, Anämien, schlechtes Allgemeinbefinden, Kachexie, Hautveränderungen, Blutstuhl oder vergrößerte lymphatische Organe. Tiere mit deutlichen Krankheitssymptomen wurden schmerzlos getötet und die Erkrankungsursache durch Sektionen der Tiere festgestellt. In Sektionsprotokollen wurden untersuchungsrelevante Daten, wie z.B. Alter, Geschlecht der Tiere, Art, Anzahl und Größe der gefundenen Tumoren festgehalten. Der Überwachungszeitraum war auf 60 Wochen begrenzt. Über diesen Zeitraum unauffällige Tiere wurden ebenfalls schmerzlos getötet, sezirt und auf mögliche Erkrankungen untersucht.

Tumormaterial wurde für eine Tumorbank *Mlh1*^{-/-}-Mäuse gesammelt und aserviert. Formalinfixiertes, bzw. nativ schockgefrorenes Tumorgewebe diente der Erstellung histologischer Schnittpräparate. In Einzelzellsuspension überführte lymphoide Tumoren wurden für immunphänotypische Untersuchungen mittels FACs-Analyse eingesetzt. Mit der aus Lymphomen isolierten RNA wurden Genexpressionsstudien durchgeführt. Die histologischen, immunologischen und molekularbiologischen Analysen dienten der Charakterisierung in Mlh1 defizienten Mäusen auftretenden Tumoren. DNA aus Tumoren und nicht-Tumorgewebe der Mäuse wurde isoliert und für Mikrosatelliteninstabilitäts-Untersuchungen verwendet.

1.1. Tumorzinzidenz und Überlebenskurven *Mlh1* defizienter Mäuse

Der zeitliche Erkrankungsverlauf aller *Mlh1*-Mäuse spiegelt sich in der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abbildung 1.1.1.a) wider. Alle 62 *Mlh1*^{-/-}-Mäuse erkrankten innerhalb von 55 Wochen und wurden nach dem Auftreten erster Symptome schmerzlos getötet. Als Kontrollpopulation dienten *Mlh1*^{+/+} Geschwistertiere. Keines der Kontrolltiere entwickelte innerhalb des Überwachungszeitraums einen Tumor.

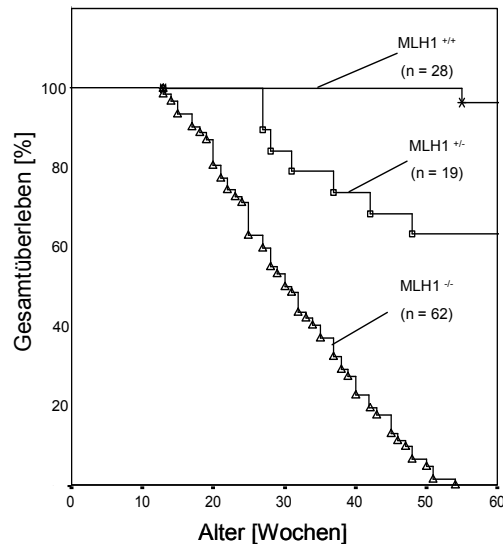


Abb. 1.1.1.a: Kaplan-Meier Überlebenskurven aller untersuchten *Mlh1*^{-/-}-, *Mlh1*^{+/-}- und *Mlh1*^{+/+}-Mäuse. Alle *Mlh1*^{-/-}-Tiere erkrankten innerhalb von 55 Wochen. 62 *Mlh1*^{-/-}-Tiere (Δ), 19 *Mlh1*^{+/-}-Tiere (\square) und 28 *Mlh1*^{+/+}-Tiere (*) nach ihrem Alter (in Wochen) eingetragen. K-M-Überlebenskurve mit Statistikprogramm „SPSS for Windows“ erstellt.

Tumorgeneese in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen: Sektionen und weiterführende Analysen von isolierten Gewebe dieser Mäuse zeigten, dass alle *Mlh1*^{-/-}-Tieren Tumore ausbildeten. Die Tabelle 1.1.1.b stellt das prozentuale Auftreten der verschiedenen Tumorarten dar. Die *Mlh1*^{-/-}-Mäuse entwickelten entweder lymphoide Tumore oder Tumoren im Gastrointestinaltrakt (GI). Etwa die Hälfte der Mäuse bildeten Lymphome, die andere Hälfte GI-Tumoren aus. In 13,0 % der Tiere wurden gastrointestinale und lymphoide Tumoren gleichzeitig nachgewiesen.

Tumorart	<i>Mlh1</i> ^{-/-} (n = 62)
Gastrointestinale Tumoren	43,5%
Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	13,0%
Lymphoide Tumoren	43,5%

Tab. 1.1.1.b: Verteilung der unterschiedlichen Tumorarten in *Mlh1* defizienten Mäusen. Dargestellt ist der Anteil der Mäuse mit gastrointestinalen Tumoren, Lymphomen oder beiden Tumorarten an der Gesamtpopulation. Alle 62 untersuchten Tiere entwickelten gastrointestinale Tumoren oder Lymphome.

Betrachtet man den Zeitpunkt der Tumorentstehung in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen hinsichtlich der beiden Tumorarten (Abbildung 1.1.1.c) zeigte sich, dass Mäuse mit Lymphomen

deutlich früher erkrankten als Tiere mit Gastrointestinaltumoren. Das „50%-Überleben“, also der Zeitpunkt, an dem die Hälfte der Tiere der jeweiligen Gruppe erkrankte, lag bei den Lymphomtieren bei 21 Wochen, das der Gastrointestinaltumortiere bei 39 Wochen. Alle Lymphomtiere erkrankten innerhalb der ersten 37 Wochen, wogegen das letzte Gastrointestinaltumor-Tier mit 55 Wochen erkrankte.

Zwischen den Tieren, die beide Tumorarten (Lymphom und Gastrointestinaltumor) aufwiesen und den, an Gastrointestinaltumoren erkrankten Mäusen, war hinsichtlich des Erkrankungszeitpunktes kein deutlicher Unterschied erkennbar. Ihr 50%-Überleben lag bei 38 Wochen, alle Tiere erkrankten innerhalb der ersten 52 Wochen (die Gastrointestinaltumortiere innerhalb der ersten 55 Wochen).

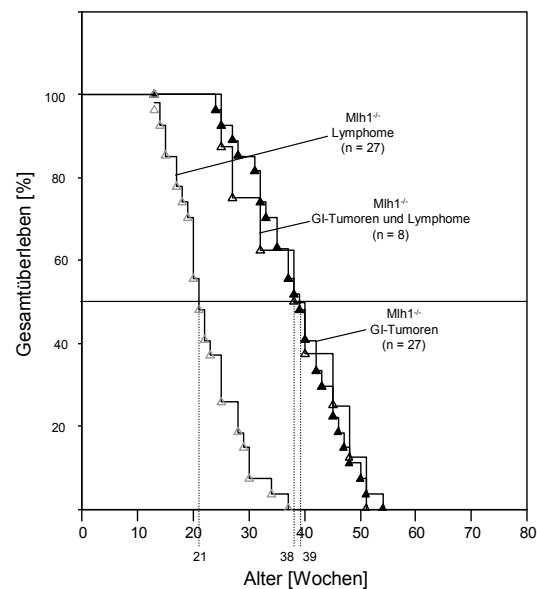


Abb. 1.1.1.c: Kaplan-Meier Überlebenskurve: Überleben der *Mlh1*^{-/-}-Mäuse unterteilt nach der Art der entwickelten Tumoren.

Die gestrichelte Linien illustrieren für alle drei Graphen den Zeitpunkt an dem jeweils die Hälfte der Tiere erkrankten (50%-Überleben): 50% aller *Mlh1*^{-/-}-Mäuse waren innerhalb von 21 Wochen an Lymphomen, innerhalb von 38 Wochen an gastrointestinalen und lymphoiden Tumoren und innerhalb von 39 Wochen an Gastrointestinaltumoren erkrankten. *Mlh1*^{-/-}-Lymphomtiere (Δ), *Mlh1*^{-/-}-Gastrointestinaltumortiere (\blacktriangle) und *Mlh1*^{-/-}-Tiere mit Gastrointestinaltumoren und Lymphomen (\triangle). K-M-Überlebenskurve mit Statistikprogramm „SPSS for Windows“ erstellt.

Der zeitliche Ablauf der Tumorentwicklung in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen verlief zweigeteilt: (i) Tiere, die lymphoide Tumoren entwickelten, die innerhalb der ersten 15-37 Wochen erkrankten und (ii) Mäuse die mit 22-55 Wochen später an gastrointestinalen Tumoren erkrankten.

Der unterschiedliche Zeitpunkt der Tumorentstehung lymphoide oder gastrointestinaler Tumore wurde auch sichtbar, unterteilte man die *Mlh1*^{-/-}-Mauspopulation in zwei Gruppen: i) Tiere, die innerhalb der ersten 30 Wochen erkrankten und ii) Tiere, die älter als 30 Wochen wurden (Tabelle 1.1.1.d).

Das Auftreten von Lymphomen gegenüber der Gastrointestinaltumor-Entwicklung in *Mlh1* defizienten Mäusen war die häufigste Ursache für ein frühzeitiges Erkranken *Mlh1* defizienter Tiere. Mit 79,3 % machten die Lymphom-entwickelnden Mäuse den

Hauptanteil in der Tiergruppe „jünger als 30 Wochen“ aus. Die Mehrzahl der Tiere „älter (gleich) Wochen“ stellten mit 69,7 % die Gruppe der an Gastrointestinaltumoren erkrankten Mäuse.

Zeitpunkt der Tumorinzidenz	Tumorart	<i>Mlh1</i> ^{-/-} (n = 62)
Jünger 30 Wochen n = 29 (47%)	Gastrointestinale Tumoren	13,8%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	6,9%
	Lymphoide Tumoren	79,3%
Älter 30 Wochen n = 33 (53%)	Gastrointestinale Tumoren	69,7%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	18,2%
	Lymphoide Tumoren	12,1%

Tab. 1.1.1.d: Tumorinzidenz in der *Mlh1*^{-/-}-Mauspopulation vor und nach der 30. Lebenswoche. Einteilung der Gesamtpopulation *Mlh1* defizienter Mäuse in Tumor-Tiere, die vor und nach der 30. Woche erkrankten. Verteilung der unterschiedlichen Tumorarten (in Prozent) in beiden Gruppen.

Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass die untersuchte *Mlh1* defiziente Maus-Population durch das Auftreten zweier verschiedener Tumorarten, den gastrointestinalen und den lymphoiden Tumoren, charakterisierbar sind. Die Verteilung von Lymphom- und Gastrointestinaltumor-entwickelnden Mäusen lag bei jeweils etwa 50%. Tiere mit lymphoiden Tumoren erkrankten allerdings in der Regel früher als solche, die Gastrointestinaltumoren entwickelten. Das frühere Auftreten der Lymphome spricht für eine größere Aggressivität dieser Tumorart, als die der gastrointestinalen Tumoren. Der geringe Anteil an Lymphomereignissen in Mäusen, die älter als 30 Wochen wurden, zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit einer Lymphomentstehung nach ca. 30 Wochen in den Tieren drastisch abnimmt.

Tumorgenese in *Mlh1*^{+/-}-Mäusen: Wie in Abbildung 1.1.1.a zu erkennen ist, kam es in der untersuchten *Mlh1*^{+/-}-Population ebenfalls zu einer erhöhten Sterberate innerhalb des Überwachungszeitraumes. Von den 19 Mäusen der *Mlh1*^{+/-}-Kontrollpopulation erkrankten 7. In keinem der 12 überlebenden Tiere fanden sich in der nach 60 Wochen durchgeführten Sektion Tumoren. Die Tumorentstehung in den 7 erkrankten *Mlh1*^{+/-}-Mäusen war deutlich verzögert im Vergleich zu den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen. Ein Tier entwickelte gastrointestinale Tumoren. Drei Tiere entwickelten lymphoide Tumore. Die restlichen drei Tiere litten an Hautproblemen und wurden daher schmerzlos getötet; sie wiesen aber keine sichtbaren Anzeichen einer Tumorentwicklung auf.

1.2. Lymphomagenese in *Mlh1* defizienten Mäusen

Die Bedeutung von MMR-Defekten für die Lymphomagenese ist zurzeit strittig diskutiert. Anhand der vorliegenden Daten konnten gezeigt werden, dass *Mlh1*-Defizienz zur Entstehung von Lymphomen in der Maus führt. Um zu untersuchen welche Art, bzw. Entität diese Lymphome besitzen, wurden Lymphome aus *Mlh1* defizienten Mäusen isoliert und eine Charakterisierung und Klassifizierung vorgenommen. Die *Mlh1*^{-/-}-Lymphome wurden anhand morphologischer und histologischer Merkmale, Immunphänotypisierungen und durch die Erstellung von Genexpressionsprofilen beschrieben. Weitere Analysen dienten der Untersuchung

möglicher Ausweichmechanismen von MMR-defizienten Lymphomen vor einer Erkennung und Eliminierung der Tumorzellen durch das Immunsystem. Die Mikrosatelliten Instabilität als klassisches Merkmal für MMR-Defizienz wurde ebenfalls bei den *Mlh1*^{-/-}-Lymphomen untersucht.

1.2.1. Charakterisierung der Lymphome

1.2.1.1. Einteilung neoplastisch veränderter lymphatischer Organe nach Tumorlokalisation

Ein makroskopisch sichtbares Kriterium einer neoplastischen Veränderung in einem fortgeschrittenen Zustand ist die massive Vergrößerung lymphatischer Organe, wie Thymus, Milz oder der Lymphknoten. Bei *Mlh1* defizienten Mäusen waren Thymi Milzen (Abb. 1.2.1.1.a links) und Lymphknoten neoplastisch verändert.

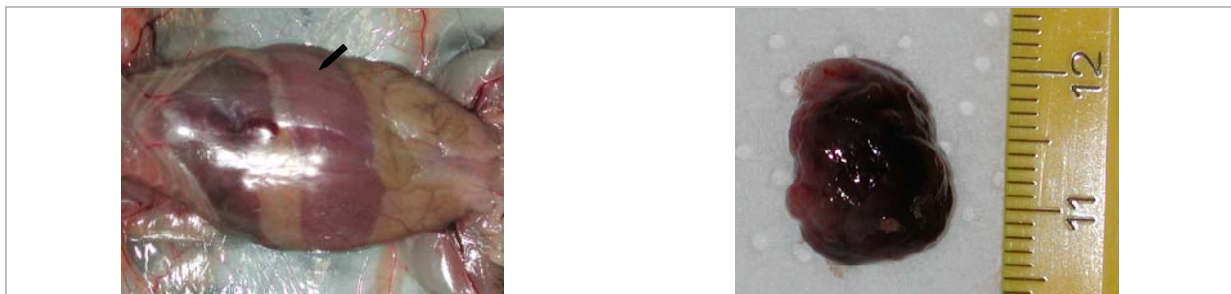
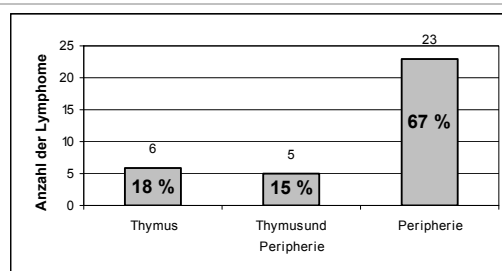


Abb.1.2.1.1.a: Neoplastisch veränderte lymphatische Organe *Mlh1* defizienter Mäuse. Links (Pfeil): massiv vergrößerte Milz (*Mlh1*^{-/-}-Tier # 43); Rechts: neoplastisch veränderter Thymus (*Mlh1*^{-/-}-Tier # 28)

Auffällig in den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen war, dass sich prinzipiell zwei unterschiedliche Manifestierungen von Lymphomen unterscheiden ließen: (i) Lymphome, die nur im Thymus entstanden und (ii) Lymphome, die sich in mehreren peripheren lymphatischen Organen entwickelten.

Von insgesamt 34 untersuchten Lymphomtieren (Tab.1.2.1.1.b) waren in 23 Mäusen (67%) periphere lymphatische Organe (wie Lymphknoten und Milz) und bei 11 Tieren (33%) der Thymus (bis zu 10-15 fach) vergrößert. Bei 5 der 11 Tiere mit thymischen Neoplasien waren zusätzlich Lymphknoten und/oder die Milz vergrößert. Eine Übersicht aller Tiere ist in Tabelle 1 im Anhang angefügt.



Tab.1.2.1.1.b: Anzahl neoplastisch veränderter lymphatischer Organe *Mlh1* defizienter Mäuse. Von 34 untersuchten Mäusen wiesen 11 Tiere thymische Alterationen und 23 Tiere vergrößerte periphere lymphatische Organe (Milz und Lymphknoten) auf.

Lymphome, die sich im Thymus der Tiere nachweisen ließen, wurden als thymische Lymphome bezeichnet. Solche Lymphome, die in Lymphknoten und/oder der Milz (also in der Peripherie) auftraten wurden als disseminierte bezeichnet. Wie weitere Untersuchungen zeigten, korreliert die unterschiedliche Manifestierung der Lymphome mit molekularen Unterschieden dieser Lymphomgruppen.

1.2.1.2. Histologische Befundung der lymphoiden Tumoren

Um eine histologisch Befundung durchführen zu können, wurde von makroskopisch auffälligen lymphoiden Organen der *Mlh1*^{-/-}-Mäuse HE- und Giemsa-gefärbte Schnittpräparate erstellt. In Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Zettl (Institut für Pathologie) wurden 24 Lymphome histologisch befundet. Beispiele verschiedener T- und B-Zell Lymphome *Mlh1* defizienter Mäusen zeigt die Abbildung 1.2.1.2.a.

Alle Lymphome konnten so als Non Hodgkin-Lymphome, also lymphoblastische Lymphome vom T- oder B-Zell-Typ, bzw. deren Vorläufer-Zellen klassifiziert werden. Diese, in den Mäusen nachgewiesenen Lymphome aus Vorläuferzellen („precursor cells“) vom T- oder B-Zelltyp, werden auch beim Menschen beschrieben und weisen ähnliche Charakteristika auf (Morse, Anver et al. 2002).

Die lymphoblastischen Lymphome aus Vorläufer-B-Zellen („pre-BLL, precursor B cell lymphoblastic lymphoma/leukemia“) sind morphologisch durch Milzmegalie und Lymphadenopathie gekennzeichnet und können sich in Leber, Nieren und Lungen ausdehnen oder eine Paralyse der Hinterbeine auslösen. Histologisch erscheinen die Zellen uniform, sind von mittlerer Größe, haben einen schmalen Cytoplasmasaum und einen rundlichen oder ovalen Nukleus mit lockerer Chromatinstruktur. Nukleoli liegen häufig zentral und einzeln vor, können aber auch klein sein und gehäuft auftreten. Phänotypisch lassen sich diese Lymphome u.a. durch die Expression von CD 45R (B 220), CD19 und TdT charakterisieren; sie exprimieren kein Ig D auf der Zelloberfläche. Beim Menschen wird diese Tumorerkrankung ebenfalls als Vorläufer-B-Zell lymphoblastisches Lymphom und Leukämie („precursor B cell lymphoblastic lymphoma and leukemia“) bezeichnet (Morse, Anver et al. 2002).

Die Vorläufer-T-Zell lymphoblastischen Lymphome lassen sich makroskopisch durch vergrößerte Thymi, aber auch gelegentlich Milzmegalie und Lymphadenopathien feststellen. Histologisch erscheinen die Zellen mittelgroß, sind uniform und haben ebenfalls einen schmalen Cytoplasmasaum. Der Nukleus ist rundlich, mit locker strukturiertem Chromatin. Es finden sich mehrere, kleine (manchmal zentral gelegene) Nukleoli, ähnlich wie bei den Prä-BLL. Die Zellen liegen in einem diffusen Verteilungsmuster im Gewebe vor, gelegentlich als „Sternhimmel-Bild“ (starry sky) manifestiert. Histologisch sind die Vorläufer-T-Zell lymphoblastischen Lymphome nicht von Vorläufer-B-Zell lymphoblastischen Lymphomen zu unterscheiden. Phänotypisch exprimieren diese aus unreifen T-Zellen entstandenen Lymphome CD 3 (T-Zell-Rezeptor) und TdT. Die einfach positiven T-Zell Lymphome exprimieren die Co-Rezeptoren CD 4 oder CD 8, die doppelt negativen (DN) weder CD 4 noch CD 8 und die doppelt positiven beide Co-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Beim Menschen wird diese Erkrankung ebenfalls als Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom und Leukämie bezeichnet (Morse, Anver et al. 2002).

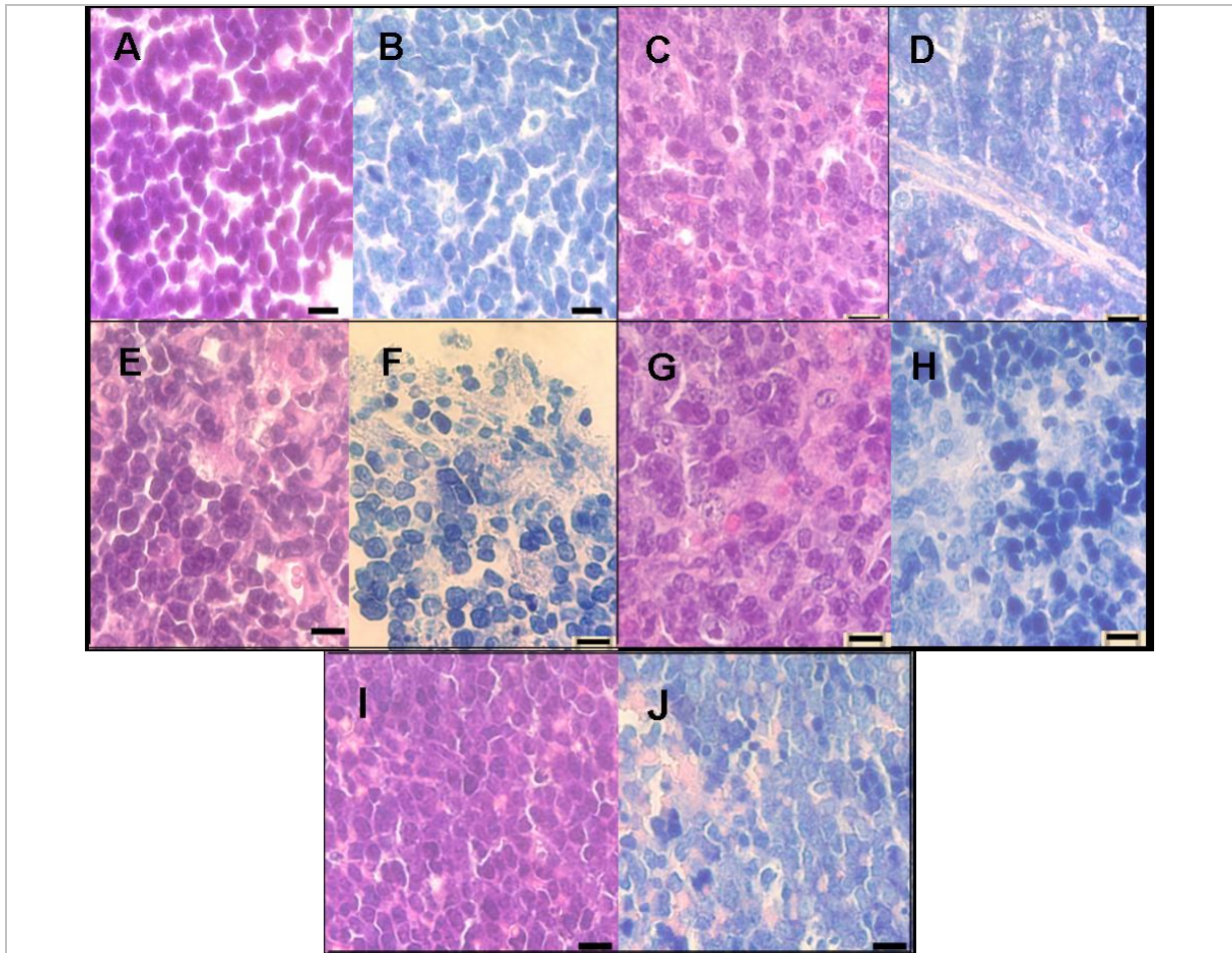


Abb. 1.2.1.2.a: lymphoide Tumoren von *Mlh1*^{-/-}-Mäusen, jeweils HE- und Giemsa-Färbung.
A+B: T-NHL (doppelt positives T-Zell Lymphom, Thymus; # 48 EO5),
C+D: T-NHL (CD 8 einfach positives T-Zell Lymphom, Thymus; # 46 AH4),
E+F: T-NHL (CD 4 einfach positives T-Zell Lymphom, Milz; # 39, AE3),
G+H: T-NHL (doppelt negatives T-Zell Lymphom, Milz; # 52, AG2),
I+J: B-NHL (B-Zell Lymphom, Milz; # 36, H1) ;
Schwarze Balken: ~20µm

In Tabelle 1.2.1.2.b wurde die histologische Befundung der immunphänotypischen Klassifizierung und die Lokalisation der betroffenen lymphatischen Organe vergleichend gegenübergestellt. Die Lymphomzellen wurden hinsichtlich ihrer Morphologie und dem Ursprungsort der klonalen Vermehrung beurteilt.

Lfd. Nr.	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in
55	32	DP T-Zell-Lymphom	T-NHL high grade	Thymus
56	15	DP T-Zell-Lymphom	T-NHL	Thymus (Milz)
48	30	DP T-Zell-Lymphom	T-NHL	Thymus
58	13	DP T-Zell-Lymphom	T-NHL	Thymus (Peripherie)
46	15	CD 8+ Lymphom	T-NHL	Thymus (LK)
47	19	CD 8+ Lymphom	T-NHL	Thymus (Peripherie)
50	27	DN T-Zell-Lymphom	T-NHL	Peripherie
51	38	DN T-Zell-Lymphom	T-NHL	Peripherie
52	14	DN T-Zell-Lymphom	T-NHL	Milz
54	28	DN T-Zell-Lymphom	T-NHL	Milz
38	40	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie
39	25	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie
40	20	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie
41	20	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie
43	17	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie
28	21	B-Zell-Lymphom	B-NHL	LK
30	28	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Peripherie
32	20	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Peripherie
34	21	B-Zell-Lymphom	B-NHL	LK
35	25	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Peripherie
36	23	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Milz
37	34	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Milz
59	48	CD 3- / CD 45R-	mehrkernige Riesenzelle	Milz
61	17	CD 3- / CD 45R-	NHL	Thymus
62	29	CD 3- / CD 45R-	NHL	Thymus (LK)

Tab. 1.2.1.2.b: Histologische Befundung von HE- und Giemsa gefärbten Schnitten *Mlh1^{-/-}*-Lymphomen. Alle untersuchten T- und B-Zell-Lymphome wurden histologisch als Non Hodgkin-Lymphome (NHL) befundet.

Lfd.Nr. (Tierbezeichnung), Alter [Wochen] (Zeitraum, in dem die Tiere Tumoren entwickelten), Lymphomart (durch Immunphänotypisierung durchgeführte Charakterisierung der Lymphome), Lymphom entwickelt in (betroffene tumorinfiltrierte lymphatische Organe), Peripherie (Milz und Lymphknoten tumorinfiltriert).

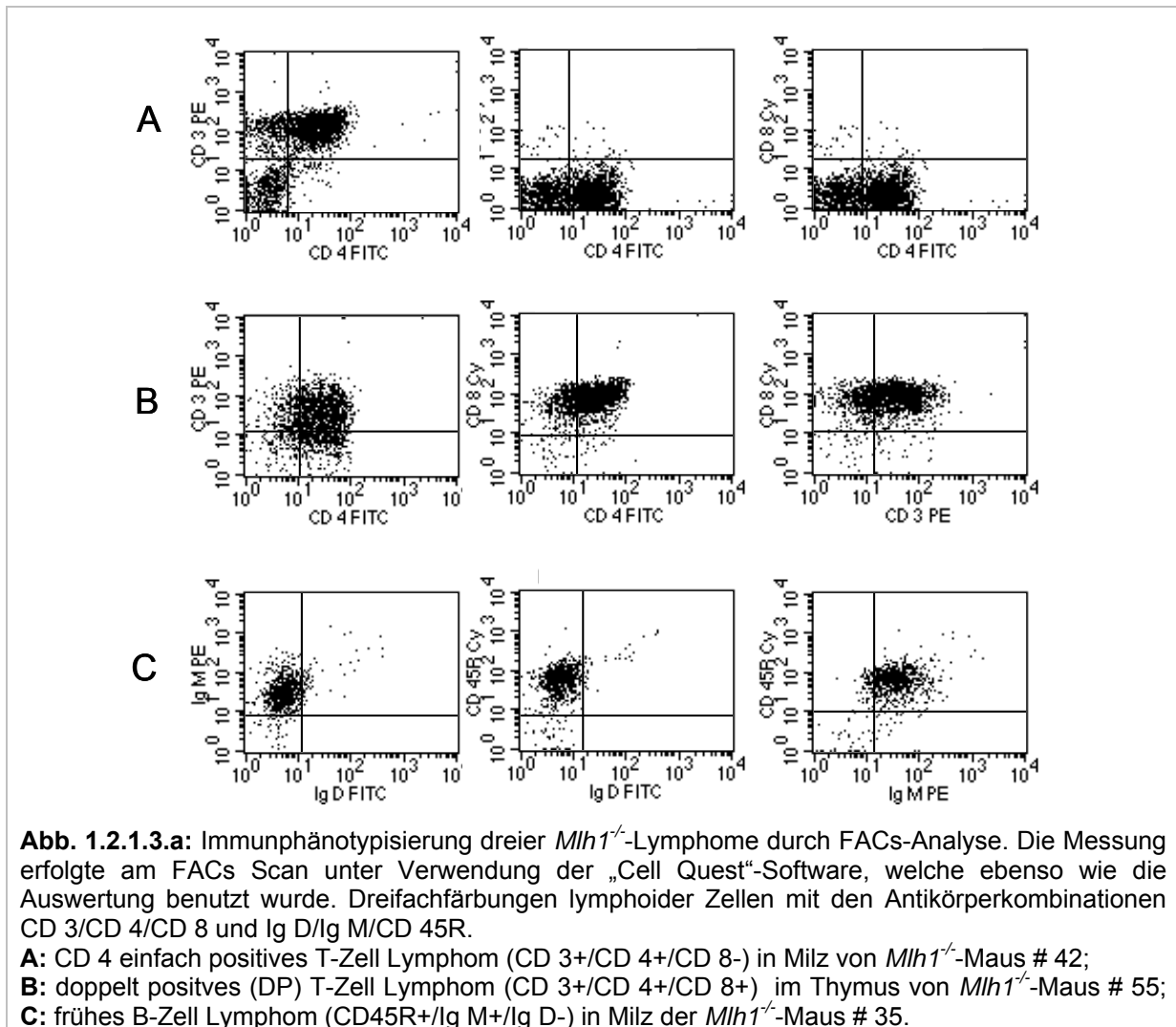
Gemeinsam mit den Immunphänotypisierungsergebnissen ergab sich also für die 25 histologisch befundeten Lymphome folgende Verteilung: 15 Non Hodgkin-Lymphome vom T-Zell-Typ (T-NHL), 7 Non Hodgkin-Lymphome vom B-Zell-Typ (B-NHL) und 3 immunphänotypisch nicht genau identifizierte Non Hodgkin-Lymphome.

1.2.1.3. Immunphänotypisierung der Lymphome

Zur zusätzlichen Einteilung der Lymphome wurden Oberflächenmarker, die spezifisch auf Subklassen lymphoider Zellen exprimiert werden, analysiert. Die Immunphänotypisierung ermöglichte eine Einteilung der *Mlh1*^{-/-}-Lymphome nach dem Zelltyp aus dem die Tumorzellen entstanden sind. Die Resultate aus der Immunphänotypisierung wurden ebenfalls für die histologische Befundung der Lymphome herangezogen.

Ziel dieser Untersuchung war es mittels FACs-Färbungen die Expression Lymphozyten-spezifischer Moleküle, die Lymphome in Subpopulationen einzuteilen. Folgende Subpopulationen konnten unterschieden werden: (i) T-Zell Lymphome, (ii) B-Zell Lymphome und (iii) Lymphome, ohne Expression T- oder B-Zellspezifischer Oberflächenmoleküle. Letztere wurden als „hämatopoetische Lymphome“ bezeichnet. T-Zell Lymphome wurden durch die Expression von CD 3 klassifiziert. Gleichzeitig wurde die Expression von CD 4 und CD 8 (Corezeptoren), CD 24 und CD 2 analysiert, um eine weitere Subklassifizierung der T-Zell Lymphome zu ermöglichen. T-Zell Lymphome zeigen keine Expression von CD 19 oder CD 45R (B220), diese Antikörper sind B-Zell-Linienspezifisch. Die B-Zell Lymphome wurden durch die Analyse von Ig M und Ig D, CD 2, CD 24 und TER in weitere Untergruppen eingeteilt. Die hämatopoetischen Lymphome zeigten keine Expression für T- oder B-Zell-spezifische Oberflächenmarker (CD 3, CD 4, CD 8, CD 19 oder CD 45R) auf. Sie ließen sich nur durch Expression von TER, CD 2 und CD 24 charakterisieren. Die T- und B-Zell Lymphome ließen sich durch Verwendung weiterer Antikörper noch weiter unterteilen (Tabelle 1 im Anhang).

Beispiele der Charakterisierung von zwei T-Zell Lymphomen und einem B-Zell Lymphom der *Mlh1*^{-/-}-Mäuse durch die FACs-Analyse zeigt die Abbildung 1.2.1.3.a. Reihe A + B stellen die Färbungen zweier T-Zell Lymphome von *Mlh1*^{-/-}-Mäuse (*Mlh1*^{-/-}-Tier #42, Milz und #55, Thymus) dar. Die Mehrheit der in A gezeigten Zellen exprimieren den CD 3 jedoch nur den Co-Rezeptoren CD 4 und sind negativ für eine CD 8-Expression, das Lymphom wird als CD 4 einfach positives (CD 4+) T-Zell Lymphom bewertet. In Reihe B erkennt man, dass sämtliche CD 3 positiven Zellen der Maus #55 auch beide Co-Rezeptoren CD 4 und CD 8 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dieses Lymphom, wurde als doppelt positives (DP) T-Zell Lymphom bezeichnet. Da nur unreife T-Lymphozyten beide Co-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren wurde das Lymphom als unreifes/frühes T-Zell Lymphom klassifiziert. Die Reihe C stellt ein typisches, in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen gefundenes unreifes/frühes B-Zell Lymphom dar (*Mlh1*^{-/-}-Tier #35, Milz). Die Hauptpopulation der gefärbten Zellen exprimierten CD 45R, exprimierten Ig M und waren negativ für eine Ig D-Expression. Reife B-Lymphozyten zeigen neben der Expression der B-Zell-linienspezifischen Marker CD 45R und CD 19, ebenfalls eine Expression der beiden Immunglobuline (Ig D und Ig M). Daher wurde dieses Lymphom als frühes/unreifes B-Zell Lymphom bewertet.



Bei der Immunphänotypisierung (Tabelle 1 im Anhang) wurden insgesamt 35 *Mlh1*^{-/-}-Lymphome mit folgenden Antikörpern in verschiedenen Dreifach-Färbungen untersucht: CD 3, CD 4, CD 8, CD 19, CD 45R, Ig D, Ig M, CD 24, CD 2, TER, MHC I. Insgesamt ließen sich so 21 T-Zell Lymphome, 10 B-Zell Lymphome und 4 „hämatopoetische Tumoren“ charakterisieren.

T-Zell Lymphome: Die Einteilung mit den mit den T-Zell-spezifischen Antikörpern CD 3, CD 8 und CD 4 ermöglichte eine weitere Subklassifikation der T-Zell-Lymphome in 4 Gruppen. Unter den *Mlh1*^{-/-}-Lymphomen waren 6 CD 4 positive, 5 CD 8 positive, 5 doppelt negative (DN) und 5 doppelt positive (DP) T-Zell-Lymphome. Beispiele der Charakterisierung durch FACs-Analyse von zwei T-Zell Lymphomen (DN und DP) wurden in Abbildung 1.2.1.3.a dargestellt.

B-Zell Lymphome: Die mit den B-Zell-spezifischen Antikörpern CD 45R und CD 19 charakterisierten 10 B-Zell-Lymphome exprimierten kein Ig D auf ihren Zelloberflächen, teilweise fehlte ihnen auch die Expression von Ig M auf der Oberfläche. Es resultiert eine Aufteilung in zwei Subpopulationen von unreifen B-Zell-Lymphomen: 4 Ig D negative / Ig M negative (Ig D- / Ig M-) und 6 Ig D negative / Ig M positive (Ig D- / Ig M+) B-Zell Lymphome. Reife B-Zellen exprimieren sowohl Ig D als auch Ig M. Die untersuchten B-Zell Lymphome zeigten ein typisches

Expressionsmuster unreifer B-Zellen, wie sie normalerweise nur im Knochenmark anzutreffen sind.

Zellen ohne Expression spezifischer T- oder B-Zell Antigene („hämatopoetische Tumoren“): Eine zusätzliche Gruppe von 4 Lymphomen ließ sich bei den *Mlh1* defizienten Mäusen durch die Expression der Pan-Lymphozytenmarker CD 24 und/oder CD 45 nachweisen, exprimierten aber kein CD 3 oder CD 45R. Diese Antigene werden generell von lymphoiden Zellen exprimiert. Mit den Immunphänotypisierungs-Ergebnissen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob diese Lymphome nicht auch Vorläuferzellen der B- oder T-Zell-Linie waren oder sich aus anderen hämatopoetischen Vorläufer-Zelllinien (NK-Zellen, erythroide Zellen etc.) entwickelten, sie wurden daher als hämatopoetische Lymphome bezeichnet. Diese Lymphome exprimierten teilweise den Antikörper TER. TER+ Zellen werden i.a. als hämatopoetische Zellen bezeichnet. Obwohl nicht alle Lymphome auf TER-Expression getestet wurden (und auch TER-negative vorlagen), wurden diese „nicht-B-/nicht-T-Lymphome“ als hämatopoetische Tumoren bezeichnet.

Zusammenfassung der Immunphänotypisierung: In der Tabelle 1.2.1.3.b wurden die verschiedenen in *Mlh1* defizienten Mäusen gefundenen Lymphomgruppen aufgelistet: 10 der untersuchten Lymphome exprimierten B-Zell-spezifische Oberflächen-Antigene (CD 19, CD 45 R), 21 trugen T-Zell spezifische Antigene (CD 3, CD 4 und CD 8) und 4 Lymphome wiesen weder T- noch B-Zell-spezifische Antigene auf, waren jedoch positiv für CD 45 und/oder CD 24 und wurden als hämatopoetische Lymphome bezeichnet.

Das Expressionsprofil der Oberflächenmarker machte deutlich, dass es sich bei den B-Zell Lymphomen, den doppelt negativen und doppelt positiven T-Zell Lymphomen um aus undifferenzierten B-, bzw. T-Lymphozyten entstandene Lymphome handelte. Ähnliche Expressionsprofile wurden auch auf lymphoblastischen Lymphom-Entitäten humaner Lymphome beschrieben.

<i>Lymphomart</i>	<i>Immunphänotypisierung</i>	<i>Mlh1^{-/-}</i> (n = 35)	
B-Zell-Lymphome	CD 45R+ IgD- IgM -	8,6%	} 28,6 %
	CD 45R+ IgD- IgM+	17,1%	
	CD 45R+ (IgD und IgM n.d.)	2,9%	
T-Zell-Lymphome	DP: CD 4+ CD 8+ CD 3+	14,3%	} 60 %
	CD 8+: CD 4- CD 8+ CD 3+	14,3%	
	DN: CD 4- CD 8- CD 3+	14,3%	
	CD 4+: CD 4+ CD 8- CD 3+	17,1%	
Hämatop. Tumoren	CD 24+ CD 45R - CD 3-	11,4%	} 11,4 %

Tab. 1.2.1.3.b: Zusammenfassung der mittels FACS-Analyse ermittelten Ergebnisse der Immunphänotypisierung von 35 *Mlh1^{-/-}*-Lymphomen. 28,6 % der Tiere entwickelten B-Zell Lymphome, 60 % T-Zell Lymphome und 11,8 % hämatopoetische Tumoren.
CD 45R, Ig D, Ig M (B-Zell spezifische Antikörper); CD 4, CD 8, CD 3 (T-Zell spezifische Antikörper); CD 24 (Antikörper für lymphoide Zellen).

Anteilig fanden sich in der *Mlh1^{-/-}*-Population also 28,6% B-Zell-, 60% T-Zell-Lymphome sowie 11,4% hämatopoetische Lymphome (CD 24+, CD 3- / CD 45R-) (Tab. 1.2.1.3.b).

1.2.1.4. Genexpressionsprofile der Lymphome anhand von Differenzierungsmarkern

Neben den anhand von Oberflächenmarkern erstellten Expressionsprofilen können die Expressionsmuster verschiedener Gene zur Klassifizierung von Lymphomen verwendet werden, die während Differenzierungs- und Aktivierungs-Prozessen differentiell in Lymphozyten exprimiert sind.

Aus *Mlh1*^{-/-}-Lymphomen wurde die mRNA isoliert und auf die Expression von TdT, Rag, Pax5 und E2A untersucht. Expressionsprofile dieser Gene diente auch der Klassifizierung von Lymphomen humaner und muriner lymphoblastischer Lymphome. Für diese semiquantitative RT-PCR-Analyse wurden gleiche RNA-Ausgangskonzentrationen (1µg/ml) von allen Proben eingesetzt und auf die Expression eines Referenz-Genes (housekeeping gene) GAPDH abgeglichen. Als Kontrollen diente aus Zellsuspensionen des Thymus und der Milz wildtypischer Geschwistertiere isolierte mRNA. Zusätzlich wurden aus Zellsuspensionen der Milz ruhende reife B-Zellen (mittels MACS-Technik) isoliert und ebenfalls als Kontrolle eingesetzt.

Insgesamt konnten 34 *Mlh1*^{-/-}-Lymphome auf die Expression der o.a. Gene getestet werden. Hierunter befanden sich 7 B-Zell Lymphome, 22 T-Zell Lymphome und 5 hämatopoetische Lymphome (CD 24+ / CD 45+). Die T-Zell Lymphome ließen sich durch die Ergebnisse der Immunphänotypisierung in die vier Subgruppen doppelt positive (DP), CD 8 einfach positive (CD 8+), doppelt negative (DN) und CD 4 einfach positive (CD 4+) T-Zell-Lymphome unterteilen.

Die Abbildung 1.2.1.4.a zeigt die Expressionen der untersuchten Gene in den 34 verschiedenen MMR-defekten Lymphomen.

TdT fand sich bei den Kontrollen (wie zu erwarten) nur in thymischen Lymphozyten exprimiert, nicht aber in den Lymphozyten der Milz oder den daraus isolierten reifen B-Zellen. Die T-Zell Lymphome ließen sich in TdT-exprimierende (TdT+) und TdT-negative (TdT-) Lymphome einteilen. Auffällig war hierbei, daß die DP und die CD 8+ T-Zell Lymphome mehrheitlich TdT exprimierten (10 von 11). Dagegen hatte die Mehrzahl der DN (mit einer Ausnahme) und alle CD 4+ T-Zell Lymphome TdT herunterreguliert. Auch unter den B-Zell Lymphomen und den hämatopoetischen Lymphomen ließen sich TdT-exprimierende und TdT-negative Tumoren nachweisen. 2 von 7 B-Zell Lymphomen exprimierten TdT, ebenso wie 3 der 5 untersuchten hämatopoetischen Lymphome.

Das Expressionsmuster von **Rag** war insbesondere bei den T-Zell Lymphomen mit der TdT-Expression nahezu identisch: 9 der 11 DP und CD 8+ T-Zell Lymphome exprimierten Rag, wogegen keines der DN (mit einer Ausnahme) und CD 4+ T-Zell Lymphome Rag exprimierten. Bei den Kontrollen fand sich ebenfalls eine Expression von Rag ausschließlich in der Thymus-Kontrolle, Milz-Lymphozyten und aus der Milz isolierte reife B-Zellen exprimierten Rag nicht. Von den B-Zell Lymphomen zeigten 3 von 7 Proben schwache Rag-Expressionen. Anders als bei den T-Zell Lymphomen schien keine übereinstimmende Expression von TdT und Rag bei den B-Zell Lymphomen vorzuliegen. Bei den hämatopoetischen Lymphomen hingegen exprimieren 3 der 5 getesteten Lymphome sowohl Rag als auch TdT.

Ein - zu der Expression von TdT und Rag - alternierendes Expressionsmuster fand sich bei **Pax5**. Sowohl die Kontrollen von Milz und B-Zellen exprimierten dieses Gen, wogegen die Thymus-Kontrolle keine Pax5-Expression aufwies. Alle B-Zell Lymphome exprimierten Pax5. Überraschenderweise wiesen allerdings auch die Mehrzahl der DN und CD 4+ T-Zell Lymphome (9 von 11) sowie zwei CD 8+ T-Zell

Lymphome (2 von 6) eine Expression des B-Zell-linienspezifischen Markers Pax5 auf. Bemerkenswert war, dass diese gehäufte Pax5-Expression unter den T-Zell Lymphomen weitestgehend auf solche Lymphome beschränkt war, die keinerlei Expression von Rag und TdT zeigten. 2 der 5 untersuchten hämatopoetischen Lymphome exprimierten zudem Pax5, eines davon war ebenfalls negativ für TdT und Rag.

E2A wurde sowohl von den wildtypischen Kontrollen, als auch von allen Lymphomen exprimiert.

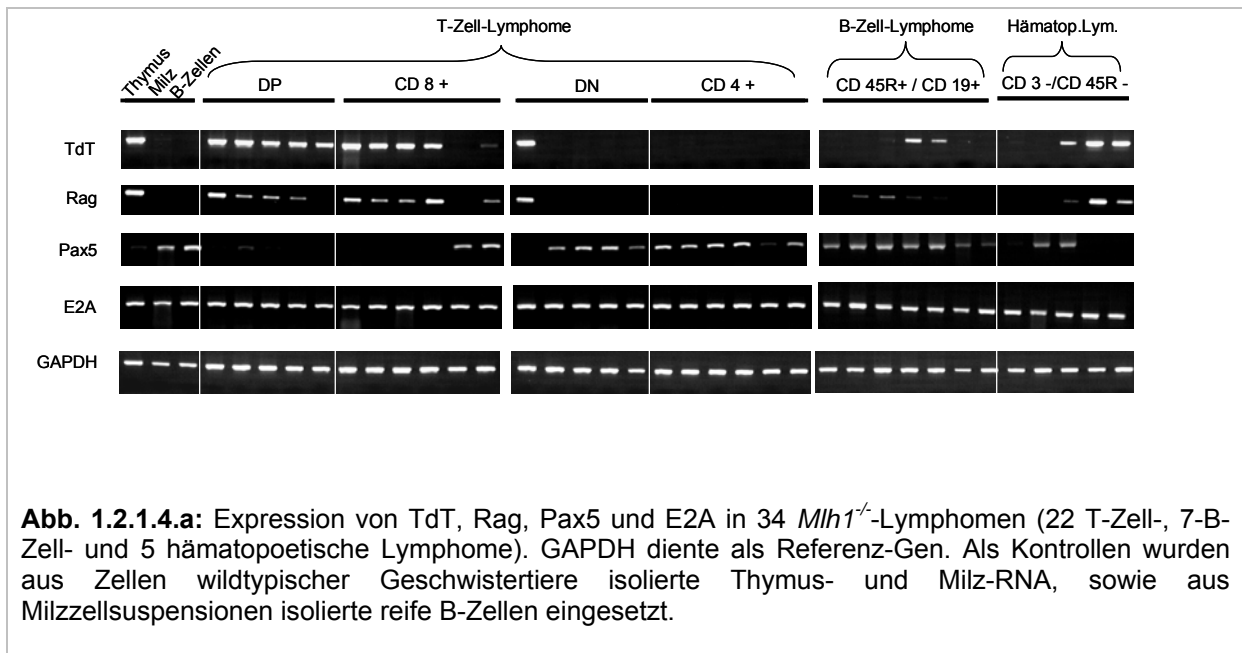


Abb. 1.2.1.4.a: Expression von TdT, Rag, Pax5 und E2A in 34 *Mlh1*^{-/-}-Lymphomen (22 T-Zell-, 7-B-Zell- und 5 hämatopoetische Lymphome). GAPDH diente als Referenz-Gen. Als Kontrollen wurden aus Zellen wildtypischer Geschwistertiere isolierte Thymus- und Milz-RNA, sowie aus Milzzellsuspensionen isolierte reife B-Zellen eingesetzt.

In der Tabelle 1.2.1.4.b wurden diese Ergebnisse zusammengefasst. Es wird deutlich, dass sich die T-Zell Lymphome offensichtlich in zwei Gruppen einteilen ließen: (i) TdT+/Rag+/Pax5- T-Zell Lymphome und (ii) TdT-/Rag-/Pax5+ T-Zell Lymphome. Alle B-Zell Lymphome waren durch eine Pax5-Expression gekennzeichnet. TdT und Rag wurde in einem Teil der B-Zell Lymphome exprimiert, traten aber in keinem B-Zell Lymphom gemeinsam auf. Unter den als hämatopoetische Lymphome bezeichneten Tumoren ließ sich eine gleichzeitige Expression von TdT und Rag in 60% der Fälle nachweisen, ein Lymphom (20%) hiervon exprimierte zudem Pax5. Insgesamt waren 40% der hämatopoetischen Lymphome Pax5-positiv. Lediglich ein hämatopoetisches Lymphom exprimierte weder Pax5, TdT oder Rag.

Lymphomart	Anzahl (n)	E2A	exprimiert			
			Pax 5	Rag	TdT	
T-Zell Lymphome	DP T-Zell-Lymphom	5	100%	0%	80%	100%
	CD 8+ Lymphom	6	100%	33%	83%	83%
	DN T-Zell-Lymphom	5	100%	80%	20%	20%
	CD 4+ Lymphom	6	100%	83%	0%	0%
B-Zell Lymphome	CD 45R+ / CD 19+	7	100%	100%	43%	29%
Hämatop. Lymphome	CD 3- CD 45R-	5	100%	40%	60%	60%

Tab. 1.2.1.4.b: Prozentuale Darstellung der Expressionsergebnisse der Entwicklungsmarker (E2A, Pax5, Rag und TdT) bei den 34 untersuchten *Mlh1*^{-/-}-Lymphomen. Erkennbar war die alternierende Rag-/TdT-Expression zweier Subgruppen der T-Zell Lymphome. Zwei Subpopulationen sind innerhalb der Gruppe der T-Zell Lymphome unterscheidbar: Rag+TdT+Pax- und Rag-TdT-Pax5+.
n (Anzahl der untersuchten Lymphome je Subgruppe). DP, CD 8+, DN und CD 4+ (durch Immunphänotypisierung subklassifizierte T-Zell Lymphome), CD 3- CD 45R- (hämatopoetische Lymphome)

Durch die Genexpressionsstudien war eine Subklassifizierung der *Mlh1*^{-/-}-Lymphome anhand der Expression von Pax5 und Rag/TdT möglich. Die B-Zell Lymphome ließen sich durch die Expression von Pax5 charakterisieren. Unter den T-Zell Lymphomen waren zwei Gruppen unterscheidbar, Rag-/TdT-positive, Pax5-negative und Rag-/TdT-negative, Pax5-positive T-Zell Lymphome. Für weitere Studien ist es sinnvoll, die Ergebnisse aus Immunphänotypisierung und Genexpressionsanalysen mit der Lokalisation der Lymphome zu vergleichen.

1.2.1.5. Lokalisation der Lymphome

Wie bereits dargestellt, ließen sich die Lymphome in thymische und disseminierte Lymphome unterteilen. Aus den vorangegangenen Untersuchungen wurde klar, dass eine Einteilung insbesondere der T-Zell Lymphome nach verschiedenen Kriterien möglich ist. Zum einen war eine Subklassifizierung anhand der Immunphänotypisierung in 4 Gruppen (CD 8+, DP, CD 4+ und DN) durchführbar. Zum anderen war aufgrund der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen eine Unterteilung in Rag/TdT-negative, Pax 5-negative und Rag/TdT-positive, Pax 5-positive T-Zell Lymphome möglich. Die Lokalisation des Primärtumors ist ein weiterer wichtiger Aspekt insbesondere zur Charakterisierung der T-Zell Lymphome.

Es wurden insgesamt 22 unterschiedliche T-Zell Lymphome hinsichtlich der betroffenen lymphatischen Organe untersucht. Wies der Thymus der Tiere Lymphominfiltration auf, wurden die Tumoren als thymische Lymphome bezeichnet.

Die Abbildung 1.2.1.5.a zeigt, dass alle 6 doppelt positiven (DP) T-Zell Lymphome sowie die Mehrzahl der CD 8 einfach positiven (CD 8+) T-Zell Lymphome (4 von 5 Fällen) thymus-lokalisiert waren. Dagegen entwickelten sich 80% der doppelt negativen (DN) und 100% der CD 4 einfach positiven (CD 4+) T-Zell Lymphome in der Peripherie. Ein doppelt negatives T-Zell Lymphom (20%) war ebenfalls im Thymus nachweisbar.

Betrachtet man die CD 8+ und DP T-Zell Lymphome als eine Gruppe, lag der Anteil von im Thymus auftretender Lymphome bei 90,9%; nur 9,1% der Lymphome waren disseminierte Lymphome. Fasste man die doppelt negativen (DN) und CD 4 einfach positiven (CD 4+) T-Zell Lymphome zu einer Gruppe zusammen, war das Verhältnis von disseminierten zu thymuslokalisierten Lymphomen umgekehrt: 90,9% disseminierte Lymphome und 9,1% der Lymphome entwickelten sich im Thymus.

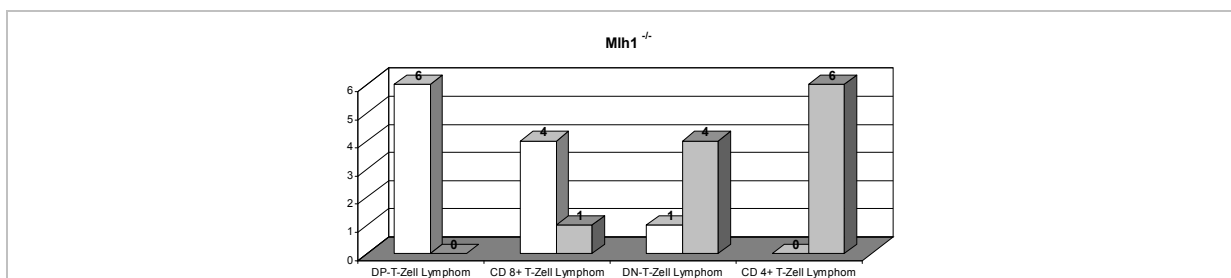
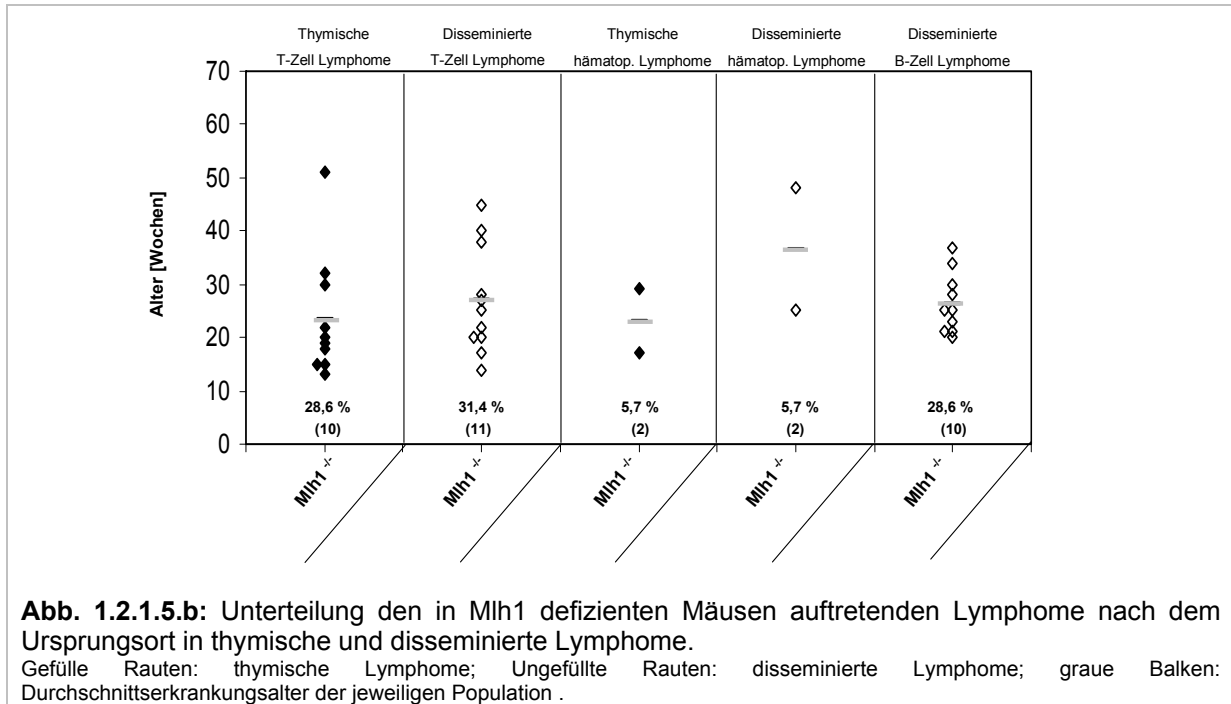


Abb. 1.2.1.5.a: Anzahl thymischer und disseminierter T-Zell *Mlh1*^{-/-}-Lymphome eingeteilt nach dem Immunphänotyp in doppelt positive (DP), CD 8 einfach positive (CD 8+), doppelt negative (DN) und CD 4 einfach positive (CD 4+) T-Zell Lymphome.

Weißer Balken: Lymphom in Thymus entwickelt; graue Balken: disseminierte Lymphome (in Milz und/oder Lymphknoten aufgetreten).

Abbildung 1.2.1.5.b zeigte neben einer Gleichverteilung in der Anzahl beider Gruppen ein durchschnittlich früheres zeitliches Auftreten der thymischen T-Zell Lymphome gegenüber den disseminierten T-Zell Lymphomen. Insgesamt traten 10 thymische und 11 disseminierte T-Zell Lymphome, 2 thymische und 2 disseminierte hämatopoetische Lymphome (CD 24+, CD 3- / CD 45R-) und 10 B-Zell Lymphome (ebenfalls als disseminiert bezeichnet) auf.



Eine klare Unterteilung der disseminierten und thymus-lokaliserten Lymphome erbrachte der Vergleich mit den Genexpressionsergebnissen dieser Tumoren. Sämtliche thymische T-Zell Lymphome waren TdT- und Rag-positiv und exprimierten keinerlei Pax5. Dagegen zeigte keines der getesteten disseminierten T-Zell Lymphome eine Rag- und TdT-Expressionsbande, sie exprimierten jedoch Pax5. Eine Gruppierung der Lymphome nach den Genexpressionsdaten ermöglicht somit eine sinnvollere Einteilung, als die ausschließliche Gruppierung nach den Immunphänotypisierungen. Die Kombination aller Daten ermöglicht somit die Einteilung der T-Zell Lymphome in (i) TdT+/Rag+/Pax5- thymische CD 8+ / DP T-Zell Lymphome und (ii) TdT-/Rag-/Pax5+ disseminierte CD 4+ / DN T-Zell Lymphome.

1.2.1.6. MHC Klasse I-Molekülexpression der Lymphome

Eine wichtige zu klärende Frage war, inwieweit das Immunsystem einen Einfluß auf die Tumorentstehung nimmt. Hierzu wurde die MHC Klasse I-Molekül-Expression auf den *Mlh1*^{-/-}-Lymphomen untersucht. Eine herunterregulierte MHC Klasse I-Molekülexpression wird bei einigen Tumorarten im Menschen als möglicher Mechanismus beschrieben, durch welchen die Tumorzellen einer Immunantwort durch cytotoxische T-Zellen entgehen.

Bei 26 der *Mlh1*^{-/-}-Lymphome wurde mittels FACs-Analyse (siehe Tabelle 1 im Anhang) die MHC Klasse I-Expression getestet und die Ergebnisse in Tabelle 1.2.1.6.a dargestellt. 30,8 % aller untersuchten *Mlh1*^{-/-}-Lymphome fehlte die

Expression von MHC Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Der Anteil der MHC Klasse I-negativen Tumoren war mit 41,2 % bei den T-Zell Lymphomen und mit 33,3 % bei den hämatopoetischen Lymphomen am höchsten. Gehäuft fanden sich MHC Klasse I-negative T-Zell Lymphome, insbesondere unter den CD 8+ (50%) und DP (75%) T-Zell Lymphomen, also der Gruppe der thymischen T-Zell Lymphome. Interessanterweise war in der Gruppe der TdT-/Rag-/Pax5+ disseminierten T-Zell Lymphome in keinem der 10 untersuchten Lymphome ein Verlust der MHC Klasse I-Molekülexpression feststellbar. Ebenfalls zeigte keines der untersuchten B-Zell-Lymphome einen Verlust der MHC Klasse I-Molekülexpression.

Lymphomart		Anzahl [n]	MHC Klasse I positiv	MHC Klasse I negativ
B-Zell Lymphome		6	100%	0%
T-Zell Lymphome	DP T-Zell Lymphome	4	25%	75%
	CD 8+ T-Zell Lymphome	4	50%	50%
	DN T-Zell Lymphome	4	75%	25%
	CD 4+ T-Zell Lymphome	5	80%	20%
hämatopoetische Lymphome		3	66,7%	33,3%
Gesamt		26		

Tab. 1.2.1.6.a: MHC Klasse I Expression auf der Zelloberfläche von *Mlh1*^{-/-}- Lymphomen. In 8 von 26 Lymphomen *Mlh1* defizienter Mäuse fehlten MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche. DN (doppelt negativ für CD 4 und CD 8), DP (doppelt positiv für CD 4 und CD 8); n.d. (nicht durchgeführt)

1.2.1.7. RAE-1- und Mult1-Expression der Lymphome

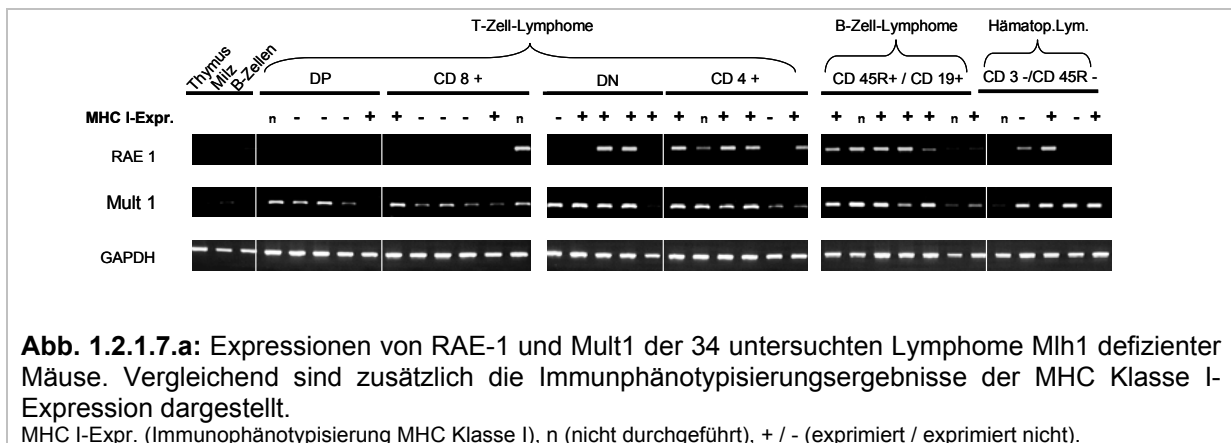
Zellen mit der herunterregulierten MHC Klasse I-Molekülexpression sind in der Lage einer Immunantwort durch cytotoxische T-Zellen zu entgehen. Allerdings werden MHC Klasse I-negative Zellen durch andere Komponenten des Immunsystems, wie beispielsweise NK-Zellen (und $\gamma\delta$ -T-Zellen) leichter erkannt. Exprimieren die Zellen zusätzlich stimulatorische Signale, wie beispielsweise RAE-1, können die NK-Zellen über eine perforin-vermittelte Lyse eliminiert werden. MHC Klasse I-negative Lymphome wären somit bei gleichzeitiger Expression von RAE-1 potentielle Ziele einer NK-Zell vermittelten Lyse.

Daher wurden die *Mlh1*^{-/-}-Lymphome auf Genexpression stimulatorischer Liganden, wie **RAE-1** (retinoic acid early inducible gene 1) und **Mult1** (mouse UL16-binding protein-like transcript 1) getestet. Die Ergebnisse wurden mit der MHC Klasse I-Expression (aus der Immunphänotypisierung) vergleichend in Abbildung 1.2.1.7.a gegenübergestellt. Wie erwartet exprimierten die normalen lymphatischen Gewebe (Thymus-, Milz- und B-Zell-Kontrolle) weder RAE-1 noch Mult1. Von den 34 Lymphomen wiesen 21 (61,8%) eine Expression von RAE-1 und 29 (85,3%) eine Mult1-Expression auf. Bereits Abbildung 1.2.1.7.a zeigte, dass die Gruppe der Rag+/TdT+/Pax5- thymischen CD 8+ und DP T-Zell Lymphome häufig keine RAE-1-Expression aufwiesen.

Korrelierte man diese Expressionsdaten mit der Klassifizierung der Lymphome nach den Oberflächenmarkerprofilen ergab sich, dass die RAE-1-exprimierenden Lymphome alle zu den B-Zell Lymphomen, hämatopoetischen Lymphomen oder den TdT-/Rag-/Pax5+ disseminierten T-Zell Lymphomen gehörten. Keines der untersuchten thymischen T-Zell Lymphome exprimierte RAE-1.

Vergleiche der RAE-1-Expression mit der MHC Klasse I-Molekülexpression in den Lymphomen zeigten zudem, dass sich eine RAE-1-Expression ausschließlich in solchen Lymphomen nachweisbar war, die auf ihrer Zelloberfläche MHC Klasse I-Moleküle exprimierten. Im Umkehrschluß exprimierte keines der MHC Klasse I-negativen Lymphome RAE-1. Die einzige Ausnahme bildete ein hämatopoetisches Lymphom, das MHC Klasse I-negativ war und eine schwache RAE-1-Expressionsbande aufwies.

In allen T-Zell Lymphomen (disseminiert oder thymisch) lag also eine Art Balance-Situation zwischen RAE-1-Expression und MHC Klasse I-Molekülexpression vor. Die B-Zell Lymphome ließen sich durch eine Expression von MHC Klasse I-Molekülen, bei gleichzeitiger RAE-1-Expression kennzeichnen.



Eine zusammenfassende Gegenüberstellung der Genexpressionen von RAE-1 und Mult1 und den Ergebnissen aus der Immunphänotypisierung wurde in Tabelle 1.2.1.7.b vorgenommen.

Lymphomart		Anzahl	RAE 1	Mult 1
		(n=34)	exprimiert	
T-Zell Lymphom	DP T-Zell-Lymphom	5	0%	80%
	CD 8+ Lymphom	6	17%	100%
	DN T-Zell-Lymphom	5	40%	80%
	CD 4+ Lymphom	6	83%	67%
B-Zell Lymphom	CD 45R+ / CD 19+	7	86%	100%
Hämatop. Lymphom	CD 3- / CD 45R-	5	40%	80%

Tab. 1.2.1.7.b: Verhältnis der Expressionsergebnisse von RAE-1 und Mult1 bei 34 untersuchten Lymphomen Mlh1 defizienter Mäuse. RAE-1 wurde hauptsächlich in den B-Zell-Lymphomen, den DN und den CD 4+ T-Zell Lymphomen exprimiert. Der Großteil der DP und CD 8+ T-Zell Lymphome war RAE-1-negativ. Mult1-Expression fand sich in der Mehrzahl aller untersuchten Lymphome.
n (Anzahl der untersuchten Lymphome je Subgruppe).

Die bisherigen Ergebnisse aus den verschiedenen Analysen wurden in Abbildung 1.2.1.7.c zusammengefasst. Es erschien sinnvoll, eine Gruppierung der T-Zell Lymphome nach ihrer Lokalisation (thymus-lokalisiert oder disseminiert) sowie ihren Genexpressionsdaten, vorzunehmen (TdT-, Rag- und Pax5-Expression). Die Mehrzahl der hämatopoetischen Lymphome glichen (mit einer Ausnahme) in ihren

Genexpressionen ebenfalls den lymphoblastischen T- oder B-Zell-Lymphomen und konnten daher in ähnlicher Weise bewertet werden.

Vergleiche mit den tumorinfiltrierten lymphatischen Organen und den o.a. Analysen zeigten, dass 90,9% der im Thymus nachgewiesenen Lymphome Rag exprimierten und ebenfalls eine Expressionsbande für TdT (100%) aufwiesen. Zusammenfassend exprimierten also 90,9% der T-Zell Lymphome die, für unreife T-Lymphozyten typischen Differenzierungsgene Rag und TdT.

Dagegen exprimierten nur disseminierte (in Milz und/oder Lymphknoten aufgetretene) T-Zell Lymphome weder TdT noch Rag, waren allerdings positiv hinsichtlich einer Pax5-Expression.

Man konnte somit auch eine Gruppierung der disseminierten und der thymischen T-Zell Lymphome nach der Expression von TdT und Rag in zwei Gruppen (TdT/Rag doppelt positiv oder TdT/Rag doppelt negativ) aber auch der Expression des B-Zell spezifischen Markers Pax5 vornehmen. Pax5-Expression fand sich ebenfalls in einer Gruppe dieser T-Zell Lymphome, den TdT/Rag doppelt negativen disseminierten T-Zell Lymphomen.

Von den fünf getesteten hämatopoetischen Lymphomen ähnelten 4 Lymphome den thymischen T-Zell Lymphomen oder den B-Zell Lymphomen (bzw. den disseminierten T-Zell Lymphomen). Zwei hämatopoetische Lymphome die Rag und TdT exprimierten und negativ für Pax5 waren, zeigten auch keine RAE-1-Expression. Dies entsprach also einer Balance-Situation, wie sie auch bei den thymischen T-Zell Lymphomen vorlag. Zwei weitere hämatopoetische Lymphome exprimierten Pax5 und waren gleichzeitig positiv für RAE-1, ähnlich den untersuchten B-Zell Lymphomen und den disseminierten T-Zell Lymphomen. Das einzige *Mih1*^{-/-}-Lymphom mit einer Disbalance-Situation fand sich hier: ein hämatopoetisches Lymphom, das keine MHC Klasse I-Moleküle exprimierte, aber eine RAE-1-Expressionsbande aufwies.

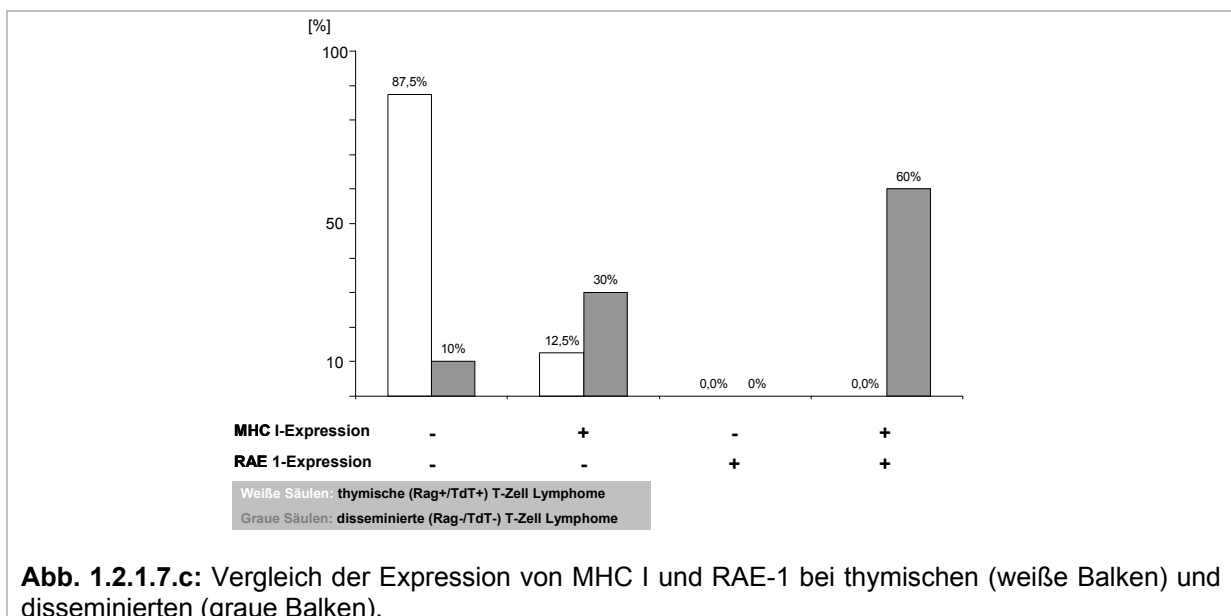


Abb. 1.2.1.7.c: Vergleich der Expression von MHC I und RAE-1 bei thymischen (weiße Balken) und disseminierten (graue Balken).

1.2.2. Mikrosatelliteninstabilität der Lymphome von *Mlh1*^{-/-}-Mäusen

Tumoren mit Defekten im MMR-System weisen in einer hohen Frequenz Insertions- und Deletions-Mutationen, insbesondere in Mikrosatelliten-Sequenzen auf. Die Mikrosatelliteninstabilität stellt somit das klassische Merkmal von Mismatch-Reparatur-Defizienz dar. Welche Rolle MMR-Defekte für die Entwicklung hämatologischer Tumorerkrankungen spielen, ist ein zurzeit kontrovers diskutierter Punkt. Daher war es für die Charakterisierung von *Mlh1*^{-/-}-Lymphomen von Interesse herauszufinden, ob sich in den –durch MMR-Defizienz hervorgerufenen- Tumoren genomische Instabilitäten vom MIN-Typ nachweisen ließen.

Nach Isolation von genomischer DNA aus seziierten Tumoren wurden diese auf Instabilitäten in 7 verschiedenen Mikrosatelliten-Loci untersucht (siehe Methoden). Hierbei wurden 4 Dinukleotid- und 3 Mononukleotid-Marker verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf Längenpolymorphismen verglichen zu Schwanz-DNA wildtypischer (*Mlh1*^{+/-}) Geschwistertiere getestet.

Abbildung 1.2.2.a zeigt ein Beispiel einer MSI-Analyse. In diesem Fall wurde ein *Mlh1*^{-/-}-Lymphom (Abb. 1.2.2.a oben) auf MSI in den Dinucleotid-Sequenzen D17Mit123 (FAM-markiert) und D7Mit91 (HEX-markiert) untersucht. Von der wildtypischen Kontrolle (Abb. 1.2.1.a unten) unterschied sich D7Mit91 (links) nicht von der Tumorprobe. Bei D17Mit123 war ein Linksversatz um 2 Basenpaare in dem Lymphom gegenüber der Kontrolle erkennbar. Es lag hier also eine durch Deletion verursachte Verkürzung in der Mikrosatellitensequenz-Länge eines Mikrosatelliten vor (MSI). Von verschiedenen Lymphomen wurden DNA-Proben in identischer Weise auf Instabilitäten in den 7 verschiedenen Mikrosatellitenmarkern getestet.

Eine Tumorprobe wurde als Mikrosatellitenstabil (MSS) bezeichnet, wenn in keinem der getesteten 7 Mikrosatelliten Alterationen, verglichen zu den Proben der wildtypischen Geschwistertiere, auftraten. Niedrige Mikrosatelliteninstabilität lag vor, wenn nicht mehr als 29% der Marker Alterationen aufwiesen. Waren mehr als 30% der Mikrosatelliten verändert, wurde die Probe als hoch Mikrosatelliteninstabil bewertet.



Abb. 1.2.2.a: Mit GenScan ermittelte Mikrosatelliteninstabilität in einem von zwei MSI-Markern: D17Mit123 (links) und D7Mit91 (rechts).

Oben: Isolierte DNA aus dem Lymphom einer *Mlh1*^{-/-}-Maus,

Unten: Schwanz-DNA eines *Mlh1*^{+/-}-Geschwistertieres. Die beiden Striche markieren den jeweils höchsten Produkt-Peak und dienen als Orientierungspunkt um Insertionen und Deletionen nachweisen zu können.

Die Tumorprobe wies bei D17Mit123 eine Deletion von 2 Basen auf (MSI). Keine Unterschiede zwischen Tumorprobe und Kontrolle waren bei dem Marker D7Mit91 sichtbar (MSS).

Es wurden 19 *Mlh1*^{-/-}-Lymphome auf Mikrosatelliteninstabilitäten in 7 Mikrosatelliten getestet. In Tabelle 1.2.2.b zeigt, das 2 (10,5%) der untersuchten Lymphome Mikrosatellitenstabil (MSS) waren. 6 (31,6%) der getesteten Lymphome wiesen eine niedrige Mikrosatelliteninstabilität (L-MSI) und 11 (57,9%) Lymphome eine hohe Mikrosatelliteninstabilität (H-MSI) auf. Als interne Kontrolle wurde genomische DNA gastrointestinaler Tumoren von 9 *Mlh1*^{-/-}-Mäusen auf Mikrosatelliteninstabilität untersucht. Wie zu erwarten, konnte in allen Fällen niedrige oder hohe Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden.

<i>Genotyp</i>	<i>Anzahl [n]</i>	<i>MSS</i>	<i>L-MSI</i>	<i>H-MSI</i>
<i>Mlh1</i>^{-/-}-Lymphome	19	10,5%	31,6%	57,9%
<i>Mlh1</i> ^{-/-} -Gastrointestinaltumoren	9	0,0%	55,6%	44,4%

Tab. 1.2.2.b: Mikrosatelliteninstabilität in lymphoiden und gastrointestinalen Tumoren von *Mlh1*^{-/-}-Tieren. 89,5% der untersuchten Lymphome wiesen Mikrosatelliteninstabilität auf, 10,5% der Lymphome waren Mikrosatellitenstabil (MSS). Alle Gastrointestinalen Tumoren waren Mikrosatelliteninstabil.

MSS (Mikrosatelliten stabil), L-/H-MSI (niedrig-/hoch- Mikrosatelliten instabil). Eine Probe wurde als Mikrosatelliten-stabil (MSS) bezeichnet, wenn keiner der 7 getesteten Mikrosatelliten Unterschiede zur *Mlh1*^{+/+}-Kontroll-DNA aufwies. Niedrige Mikrosatelliteninstabilität (L-MSI; low microsatellite instability) lag vor, wenn nicht mehr als 2 der getesteten Mikrosatelliten in der Tumor-DNA verändert waren. Hohe Mikrosatelliteninstabilität lag vor, bei mehr als 2 veränderten Mikrosatelliten (H-MSI; high microsatellite instability).

In Tabelle 1.2.2.c wurden die MSI-Ergebnisse mit den Lymphomarten in Korrelation gesetzt um Zusammenhänge zwischen dem Grad der Instabilität mit dem Phänotyp der Lymphome zu vergleichen. Insgesamt 19 *Mlh1*^{-/-}-Lymphome, 4 B-Zell Lymphome, 14 T-Zell Lymphome (darunter 3 DP, 2 CD 8+, 4 DN und 5 CD 4+ T-Zell Lymphome) und ein hämatopoetisches Lymphom wurden ausgewertet. Hierbei fiel auf, dass alle thymischen (Rag+ / TdT+ / Pax5-) T-Zell Lymphome hoch Mikrosatelliteninstabil (H-MSI) waren. Bei den disseminierten (Rag- / TdT- / Pax5+) T-Zell Lymphomen war der Grad der Mikrosatelliteninstabilität dagegen geringer, neben drei niedrig mikrosatelliteninstabilen (L-MSI) fand sich in dieser Gruppe auch ein mikrosatellitenstabiles dissemiertes T-Zell Lymphom. Bei den B-Zell Lymphomen war der Grad der Mikrosatelliteninstabilität –ähnlich wie bei den disseminierten T-Zell Lymphomen- eher moderat. Das einzige untersuchte hämatopoetische Lymphom zeigte eine niedrige Mikrosatelliteninstabilität.

Lfd. Nr.	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	MSI
55	32	DP T-Zell-Lymphom	T-NHL high grade	Thymus	H-MSI
48	30	DP T-Zell-Lymphom	T-NHL	Thymus	H-MSI
58	13	DP T-Zell-Lymphom	T-NHL	Thymus (Peripherie)	H-MSI
47	19	CD 8+ Lymphom	T-NHL	Thymus (Peripherie)	H-MSI
49	18	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus	H-MSI
50	27	DN T-Zell-Lymphom	T-NHL	Peripherie	L-MSI
51	38	DN T-Zell-Lymphom	T-NHL	Peripherie	L-MSI
52	14	DN T-Zell-Lymphom	T-NHL	Milz	MSS
53	20	DN T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	H-MSI
38	40	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie	H-MSI
39	25	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie	L-MSI
41	20	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie	H-MSI
42	22	CD 4+ Lymphom	n.d.	Peripherie	H-MSI
43	17	CD 4+ Lymphom	T-NHL	Peripherie	H-MSI
30	28	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Peripherie	L-MSI
32	20	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Peripherie	L-MSI
33	37	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Milz (LK)	MSS
35	25	B-Zell-Lymphom	B-NHL	Peripherie	H-MSI
61	17	CD 3- / CD 45R-	NHL	Thymus	L-MSI

Tab. 1.2.2.c: Mikrosatelliteninstabilität *Mlh1*^{-/-}-Lymphome verglichen mit dem Immunphänotyp, der Histologischen Befundung und der Lokalisation der tumorinfiltrierten lymphatischen Organe. Mikrosatelliteninstabilität ließ sich in 89,5% der untersuchten Lymphome nachweisen.

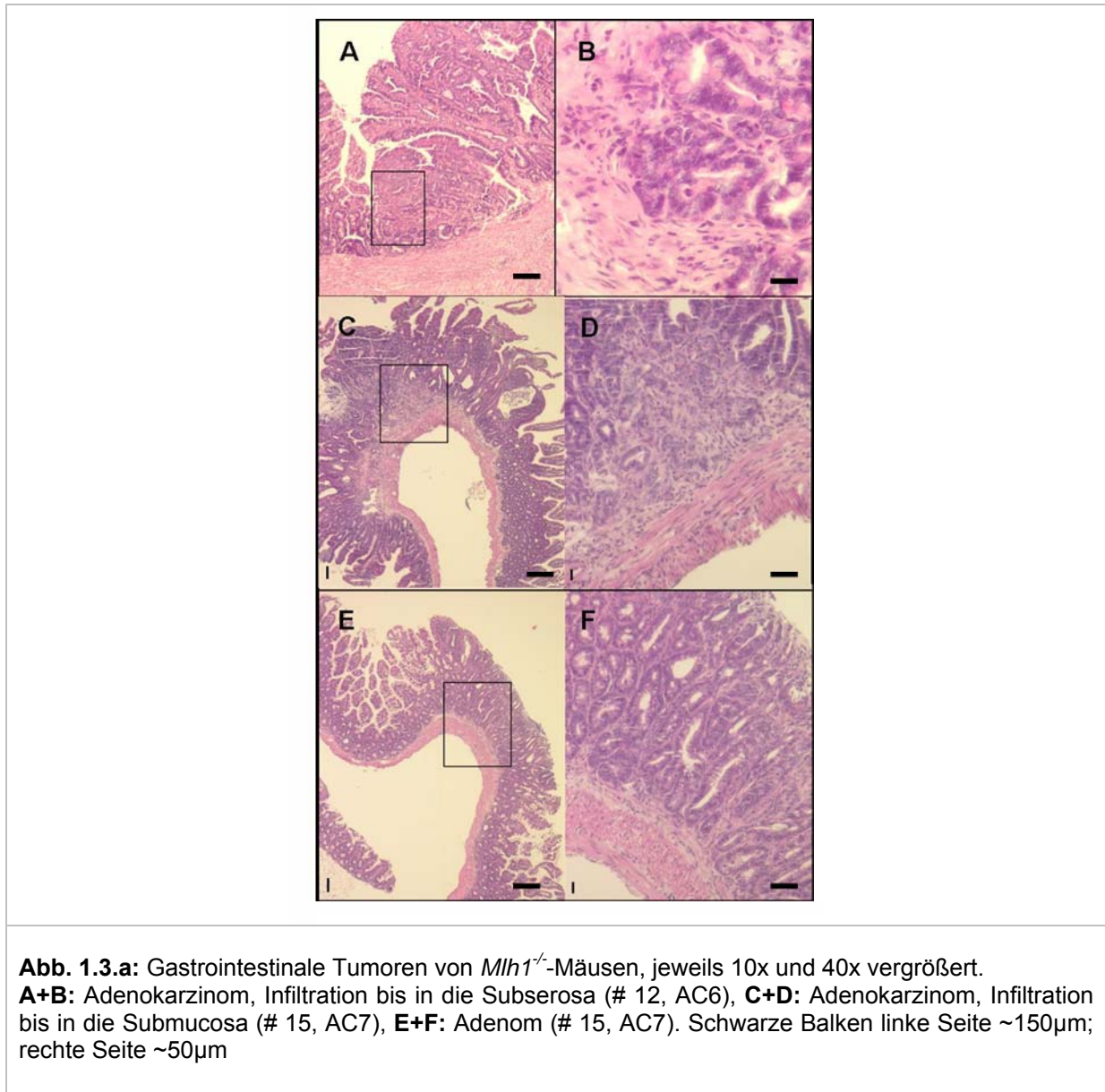
MSS (Mikrosatellitenstabil), L-/H-MSI (niedrig-/hoch- Mikrosatelliteninstabil); NHL (Non Hodgkin Lymphom; n.d. (nicht durchgeführt); DP (doppelt positives), CD 8+ (CD 8 einfach positives), DN (doppelt negatives), CD 4+ (CD 4 einfach positives) T-Zell Lymphom; CD 3- / CD 45R- (hämatopoetisches Lymphom); Alter [Wochen] (Zeitraum in dem die Tiere erkrankten).

Zusammengefaßt ließ sich also in fast allen Lymphomen *Mlh1* defizienter Mäuse Mikrosatelliteninstabilität nachweisen. Speziell die thymischen T-Zell Lymphome waren alle hoch-Mikrosatelliten-instabil (H-MSI), während die anderen Lymphomgruppen eine eher moderate MSI aufwiesen.

1.3. Gastrointestinaltumorentwicklung in Mlh1 defizienten Mäusen

Neben den lymphoiden Tumoren wurden auch gastrointestinale Tumoren histologisch untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten HE-gefärbte Gewebsschnitte von parafineingebetteten Organen.

Insgesamt wurden 22 Tiere mit gastrointestinalen Tumoren in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Zettl histologisch untersucht und befundet. Die Abb. 1.3.a zeigte verschiedene gastrointestinale Tumoren von Mlh1 defizienten Mäusen.



1.3.1. Histologische Charakterisierung der gastrointestinalen Tumoren

Die gastrointestinalen Tumoren wurden u.a. hinsichtlich ihrer Invasionsstiefe und Metastasierungsgrades in Anlehnung an die Einteilung nach dem WHO-Staging (der Humandiagnostik) befundet.

Mlh1^{-/-}-Tiere mit gastrointestinalen Tumoren entwickelten im Durchschnitt 2,7 Tumoren pro Tier. 19 *Mlh1*^{-/-}-Tiere bildeten Adenokarzinome aus, 9 von ihnen ebenfalls noch Adenome. In 3 Tieren fanden sich ausschließlich ein oder mehrere Adenome im Dünndarm. Kolorektale Karzinome wurden nicht gefunden. Kolorektale Adenome waren in zwei Tieren nachweisbar.

Insgesamt 29 Adenokarzinome wurden hinsichtlich ihrer Infiltrationstiefe beurteilt: 9 Adenokarzinome (31%) infiltrierten bis in die Mucosa/Submucosa (pT 1), 13 (45%) bis in die Muscularis propria (pT 2), 5 (17%) bis in die Subserosa (pT 3) und bei 2 Adenokarzinomen (7%) konnte ein Subserosadurchbruch mit Nachbarorganinfiltration (pT 4) festgestellt werden. Metastasen waren in keinem der *Mlh1*^{-/-}-Gastrointestinaltumortiere nachweisbar.

Lfd. Nr.	Alter [Wochen]	Tumoreignisse	Anzahl GI-Tumoren/Tier	Intestinales Adeno-Karzinom	Intestinales Adenom	colorektales Adenom
2	37	Gastroint. Tumor(en)	2	1x n.a.	Adenom	
6	25	Gastroint. Tumor(en)	3	1 x pT4	1 flaches und 1 tubulovillöses A.	
7	39	Gastroint. Tumor(en)	2	2x pT2		
9	43	Gastroint. Tumor(en)	4 (+1 Co Ad.)	2x pT2, 1x pT1	focales kleines flaches Adenom	flaches Colon Adenom, schwere Dysplasien (CIS)
10	37	Gastroint. Tumor(en)	4	1x pT4; 3x n.a.		
12	27	Gastroint. Tumor(en)	2	1x n.a.		
13	28	Gastroint. Tumor(en)	1	1x AdenoCA		
14	33	Gastroint. Tumor(en)	4	2x pT2; 1x pT3; 1x n.a.		
15	40	Gastroint. Tumor(en)	5	1x pT3; 2x pT1	2 flache Adenome	
17	42	Gastroint. Tumor(en)	5	1x pT3; 3x pT2	1 flaches Adenom	
18	42	Gastroint. Tumor(en)	4	3 x pT3; 1x pT2		
19	47	Gastroint. Tumor(en)	1	invasive AdenoCA		
21	51	Gastroint. Tumor(en)	3 (+1 Co Ad.)	1x pT4; 1x pT2; 1x pT1	1 tubulovillöses Adenom	
22	24	Gastroint. Tumor(en)	1		1 flaches Adenom	
24	35	Gastroint. Tumor(en)	2	1x pT2	1 tubulovillöses Adenom	
25	38	Gastroint. Tumor(en)	2	1x pT1	1 flaches Adenom	
27	54	Gastroint. Tumor(en)	3 (+1 Co Ad.)		3 flache Adenome der DSH m. mäßigen bis schweren Atypien	1 tubulovillöses Adenom m. schweren Atypien
38	40	Gastroint. Tumor(en) + Lymphom	2	1x pT2; 1x pT1		
50	27	Gastroint. Tumor(en) + Lymphom	2	1x CIS; 1x pT1		
51	38	Gastroint. Tumor(en) + Lymphom	1		1 tubulovillöses Adenom m. mäßigen Atypien	
55	32	Gastroint. Tumor(en) + Lymphom	1	1x pT1		
59	48	Gastroint. Tumor(en) + Lymphom	2	1x n.a.	Adenom	

Tab. 1.3.1.a: Histologische Befundung der gastrointestinalen Tumoren von *Mlh1* defizienten Mäusen. pT1 (Tumordinfiltration beschränkt auf Mucosa/Submucosa), pT2 (Infiltration der M. propria), pT3 (Infiltration der Subserosa), pT4 (Subserosadurchbruch/Nachbarorganinfiltration), CIS (carcinoma in situ), n.a. (nicht analysierbar hinsichtlich Infiltrationstiefe).

2. Einfluß des Immunsystems auf die Abwehr von Tumoren in MMR defizienten Mäusen

2.1. Tumorgenese in $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen

Um zu untersuchen, welchen Einfluß das Immunsystem auf die Abwehr von Tumoren in Mlh1 defizienten Mäusen hat, wurde $\beta 2$ Mikroglobulin-Defizienz in Mlh1 defiziente Mäuse eingekreuzt. In diesem Modell der doppelt defizienten Maus ($\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$) liegt also zum einen der durch die Mismatch-Reparatur-Defizienz induzierte Tumorprädispositionsphänotyp vor, zum anderen fehlt sämtlichen Zellen die MHC Klasse I-Molekülexpression und die Tiere besaßen keine funktionstüchtigen cytotoxischen T-Zellen. Das Immunsystem dieser Mäuse ist somit funktionell stark eingeschränkt.

Im folgenden Kapitel werden zuerst die Tumorgenese, unterteilt in Lymphom- und Gastrointestinaltumorentstehung in $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen besprochen und anschließend Unterschiede zu $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren untersucht. Die Tumorgenese in $\beta 2m/Mlh1$ -Mauspopulationen wurde mit den Daten aus den Analysen Mlh1 defizienter Mäuse verglichen (Abschnitt 2.1.5).

2.1.1. Tumorinzidenz und Überlebenskurven von $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen

Eine Population von 38 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ und 26 $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen wurde durch Kreuzung von $\beta 2m^{-/-}$ - Mäusen mit $Mlh1^{+/+}$ -Tieren generiert und über einen Zeitraum von 15 Monaten auf Tumorentstehung beobachtet. Die Verteilung der einzelnen Genotypen entsprach dem Mendelschen Vererbungsgesetz, embryonale Letalität war nicht feststellbar.

Als Kontrollgruppen wurden 18 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/+}$ - und 30 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/-}$ -Geschwistertiere aus diesen Verpaarungen verwendet. Da alle verwendeten Mäuse auf einen reinen C57-Bl/6 Hintergrund gezüchtet wurden, war die Tumorgenese in diesen Tieren mit den Daten der Mlh1 defizienten Mäuse ($\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$) direkt vergleichbar.

Der in Abbildung 2.1.1.a dargestellte Vergleich des Gesamtüberlebens der $\beta 2m/Mlh1$ -Tiere mit den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren zeigte, dass sowohl die $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - als auch $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere, zwar etwas früher als die $Mlh1^{-/-}$ -Population erkrankten, allerdings ohne signifikanten Unterschied. 97% der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse erkrankten innerhalb von 44 Wochen (mit einer Ausnahme). Alle Tiere der $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Population erkrankten nach 48 Wochen.

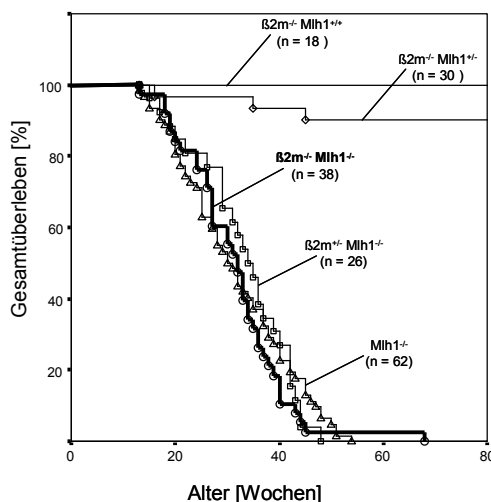


Abb. 2.1.1.a: Vergleich der Kaplan-Meier Überlebenskurven von 38 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - und 26 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/-}$ -Mäusen verglichen mit den 62 $Mlh1^{-/-}$ -Tieren. Insgesamt 30 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/-}$ - und 18 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/+}$ -Geschwistertiere bildeten die Kontrollgruppen.

$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (○), $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/-}$ (□), $Mlh1^{-/-}$ (Δ), $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/-}$ (◇), $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/+}$ (kein Symbol)

Alle $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/+}$ - und 90% der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/-}$ -Kontrolltiere überlebten den Beobachtungszeitraum von 80 Wochen. Die drei erkrankten $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{+/-}$ -Tiere wurden seziiert, es fanden sich bei ihnen keine Anzeichen einer Tumorerkrankung. Ältere Kontrolltiere wurden nach 80 Wochen schmerzlos getötet und auf die Entwicklung von Tumoren untersucht. Alle Kontrolltiere waren tumorfrei.

Wie die $Mlh1^{-/-}$ -Mäuse wurden auch die $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere auf eine Tumorentwicklung und die Tumorzinzenzen hin untersucht. Die Sektion der Tiere zeigte, dass alle 38 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere an der Ausbildung von Tumoren erkrankten. Die Inzidenz der Lymphomagenese oder die Entwicklung von Neoplasien im Gastrointestinaltrakt verteilte sich wie folgt: 47,4% der Tiere entwickelten gastrointestinale und 21,0 % lymphoide Tumoren. 31,6 % der Mäuse entwickelten beide Tumorarten (gastrointestinale und lymphoide Tumoren).

Es zeigte sich in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren also eine deutliche Reduktion in der Anzahl an Mäusen, die ausschließlich an Lymphomen erkrankten. Gleichzeitig kommt es in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl von Tieren die gastrointestinale Tumore alleine oder zusammen mit Lymphomen entwickelten.

Tumorart	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$ (n = 38)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Gastrointestinale Tumoren	47,4%	43,5%
Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	31,6%	13,0%
Lymphoide Tumoren	21,0%	43,5%

Tab.2.1.1.b: Prozentuales Auftreten von gastrointestinalen Tumoren und Lymphomen in 38 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - verglichen mit 62 $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen.

Um die Progression der beiden Tumorarten in den Tiergruppen direkt vergleichen zu können, wurden die Tiergruppen, die an den unterschiedlichen Tumorarten erkrankten in separaten Überlebenskurven (Abb. 2.1.1.b) dargestellt. Die $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere wurden wiederum mit identischen Gruppen der *Mlh1* defizienten Mauspopulation verglichen.

Obwohl die Anzahl der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere mit Lymphomen deutlich reduziert war, entsprach ihr zeitliches Auftreten dem der *Mlh1* defizienten Mäuse. Wie in Abbildung 2.1.1.c dargestellt, kommt es in $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren zu einer deutlich erhöhten Progression in der Entwicklung von gastrointestinal Tumoren. $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren verstarben früher als *Mlh1* defiziente Tiere. So waren bereits nach 45 Wochen alle $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere dieser Gruppe an Gastrointestinaltumoren erkrankt, wogegen *Mlh1*^{-/-}-Gastrointestinaltumortiere mit 55 Wochen deutlich länger überlebten. Auch $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere mit gastrointestinalen und lymphoiden Tumoren erkrankten mit 43 Wochen deutlich früher als die *Mlh1* defizienten Mäuse (mit 51 Wochen).

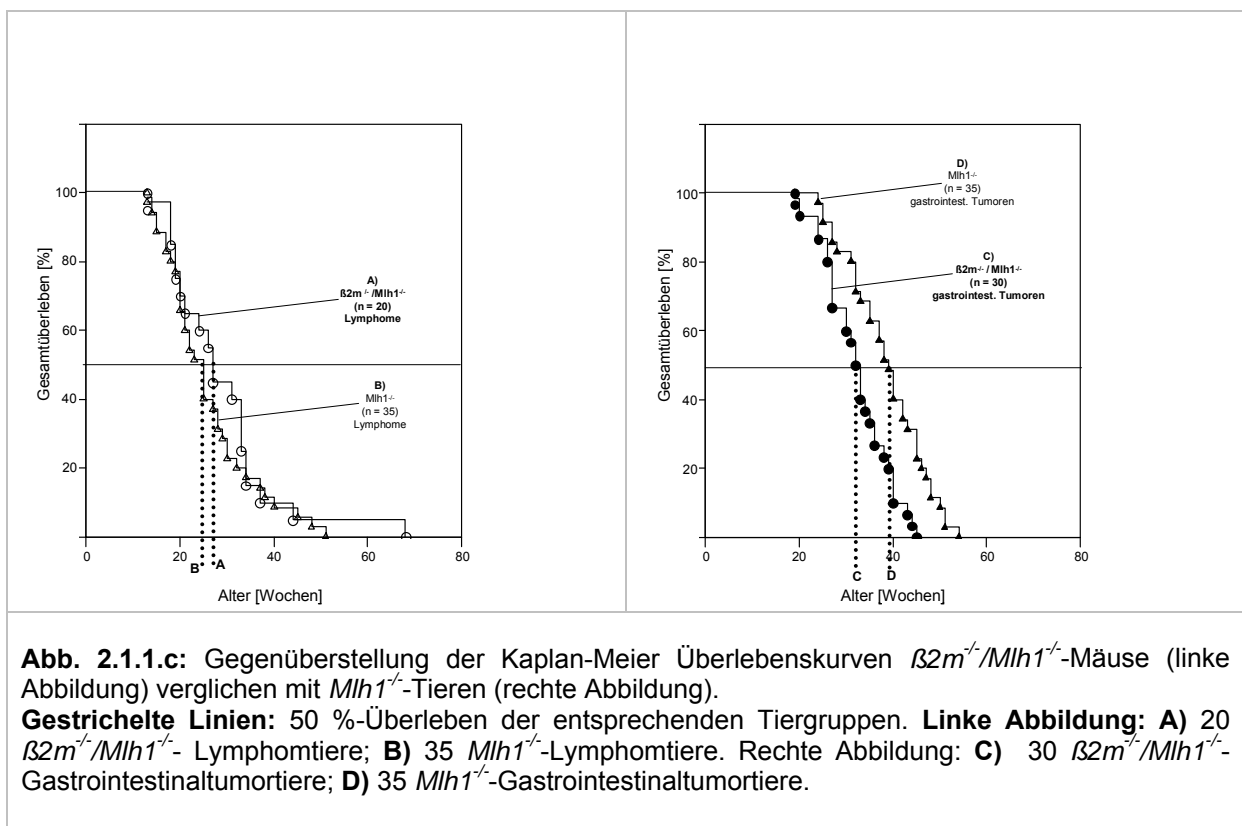
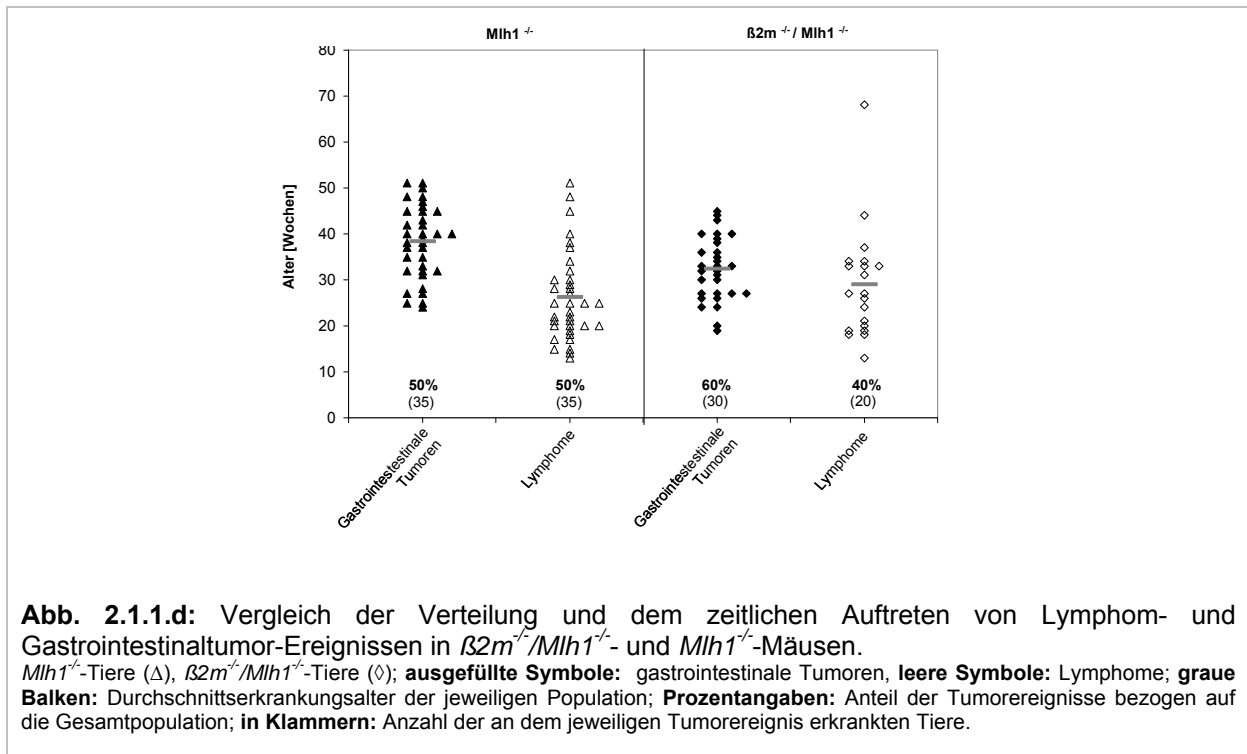


Abbildung 2.1.1.d zeigt den Entwicklungszeitraum der Tumorgenese der einzelnen Versuchstiere aufgeteilt nach den beiden Tumorarten. Auch in dieser Darstellung wurde ein früheres Auftreten von Gastrointestinaltumor bei den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren gegenüber den *Mlh1* defizienten Mäusen deutlich. Das Durchschnittserkrankungsalter (illustriert durch die grauen Balken) der Gastrointestinaltumor-Tiere war mit 31 Wochen bei den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren signifikant, gegenüber den *Mlh1*^{-/-}-Tieren (39 Wochen), verringert. Mit 28 Wochen war das Durchschnittserkrankungsalter der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere, die an Lymphomen erkrankten, gegenüber 26 Wochen bei den *Mlh1*^{-/-}-Tieren annähernd unverändert, bzw. leicht verzögert.



2.1.1.1. Unterteilung nach dem zeitlichen Auftreten der Tumorereignisse

Um eine Verschiebung im Anteil der Lymphommäuse zu den GI-Mäusen in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren besser darzustellen, wurde die Population in zwei Gruppen unterteilt:

- (i) Mäuse, die vor der 30. Woche Tumore entwickelten und
- (ii) Mäuse, die später als 30 Wochen Tumoren entwickelten.

Der Anteil an Tieren mit frühzeitiger Gastrointestinaltumorentwicklung war bei den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen, die innerhalb der ersten 30 Wochen erkrankten deutlich, gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ defizienten Mäusen, erhöht. Mit insgesamt 71,5% (28,6 % gastrointestinaltumorentwickelnden und 42,9 % Tieren mit beiden Tumorereignissen), die nicht älter als 30 Wochen wurden, machten diese Gruppen mehr als die Hälfte aller Tiere aus. Bei den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren lag der Anteil bei 19 % (13 % gastrointestinale Tumoren und 6 % mit beidem, gastrointestinale und lymphoide Tumoren).

Die Gastrointestinaltumor-Entwicklung war gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -doppelt defizienten Tieren beschleunigt, bzw. der Anteil der Lymphomtiere im Vergleich zu den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen reduziert.

Die Unterschiede in den Gruppen, die älter als 30 Wochen wurden, waren bei den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - verglichen zu den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen kaum erkennbar. Der Prozentsatz an Tieren mit Doppelereignissen war hier um etwa 1/10 erhöht (Tab. 2.1.1.1.a).

Überleben	Tumorart	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$ (n = 38)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Jünger als 30 Wochen	Gastrointestinale Tumoren	26,7%	13,0%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	40,0%	6,0%
	Lymphoide Tumoren	33,3%	81,0%
		39,5%	46,8%
Älter (gleich) als 30 Wochen)	Gastrointestinale Tumoren	60,9%	74,0%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	26,1%	19,0%
	Lymphoide Tumoren	13,0%	7,0%
		60,5%	53,2%

Tab. 2.1.1.1.a: Einteilung der 38 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ und 62 $Mlh1^{-/-}$ -Mäuse nach Tieren, die früher und später als 30 Wochen erkrankten. Zusätzliche Untergliederung in Gastrointestinal- und Lymphom-Tiere, sowie Tiere mit beiden Tumoreignissen (Angaben in Prozent).

2.1.2. Charakterisierung der Lymphome in $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen

Die beschriebenen Ergebnisse machten deutlich, dass es zu einer Reduktion der Lymphomentwicklung in $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen kam, die defizient für $\beta 2$ Mikroglobulin waren. Um herauszufinden, welche Arten von Lymphomen in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen auftraten und welche Gruppen reduziert waren, wurden die Lymphome wie bei den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen bereits beschrieben charakterisiert.

Es fanden sich in moribunden Mäusen sowohl massiv vergrößerte (10-15 fach) Thymi, als auch vergrößerte Milzen und Lymphknoten. Ein Teil der Lymphome wurde histologisch charakterisiert. Morphologisch und histologisch unterschieden sich die lymphatischen Organe $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere nicht von denen der $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse.

2.1.2.1. Immunphänotypisierung der Lymphome

Um festzustellen, ob sich die Reduktion der Lymphome auf Subklasse beschränkte, wurden Lymphome der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere immunphänotypisch klassifiziert und mit den Lymphomen in $Mlh1$ defizienten Mäusen verglichen.

Insgesamt wurden 18 lymphoide Tumoren $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse mittels der bereits beschriebenen FACs-Analysen auf die Expression von Oberflächenmarkern untersucht. Von den untersuchten $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen entwickelten 12 T-Zell Lymphome (66,6%), 4 B-Zell Lymphome (22,3%) und 2 hämatopoetische Lymphome (11,1%). Eine Übersichtstabelle aller immunphänotypisierten Lymphome befindet sich im Anhang (Tabelle 4). Wie in Tabelle 2.1.2.1.a gezeigt, sind die Anteile der B und T Zell-Lymphome in $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen somit vergleichbar zu den $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen. Die weitere Unterteilung der B Zelllymphome in IgM+/IgD+ oder IgM+/IgD- ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Auch das Auftreten der hämatopoetischen Lymphome unterschied sich nicht von den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren. Interessanterweise konnten aber, durch die Bestimmung der Verhältnisse der vier T-Zell Lymphom-Gruppen untereinander, klare Unterschiede zu der $Mlh1^{-/-}$ -Population aufgezeigt werden. So fanden sich in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen keine doppelt negativen T-Zell-Lymphome und der Anteil der doppelt positiven T-Zell Lymphome war erhöht.

Lymphomart	Immunphänotypisierung	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$ (n = 18)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 34)
B-Zell Lymphome	CD 45R+ IgD- IgM-	16,67%	11,8%
	CD 45R+ IgD- IgM+	5,6%	14,7%
T-Zell Lymphome	DP T-Zell Lymphom	33,3%	14,7%
	CD 8+ T-Zell Lymphom	16,67%	14,7%
	DN T-Zell Lymphom	-	14,7%
	CD 4+ T-Zell Lymphom	16,67%	17,6%
hämatopoetische Lymphome	CD 24+ CD 45R- CD 3-	11,1%	11,8%

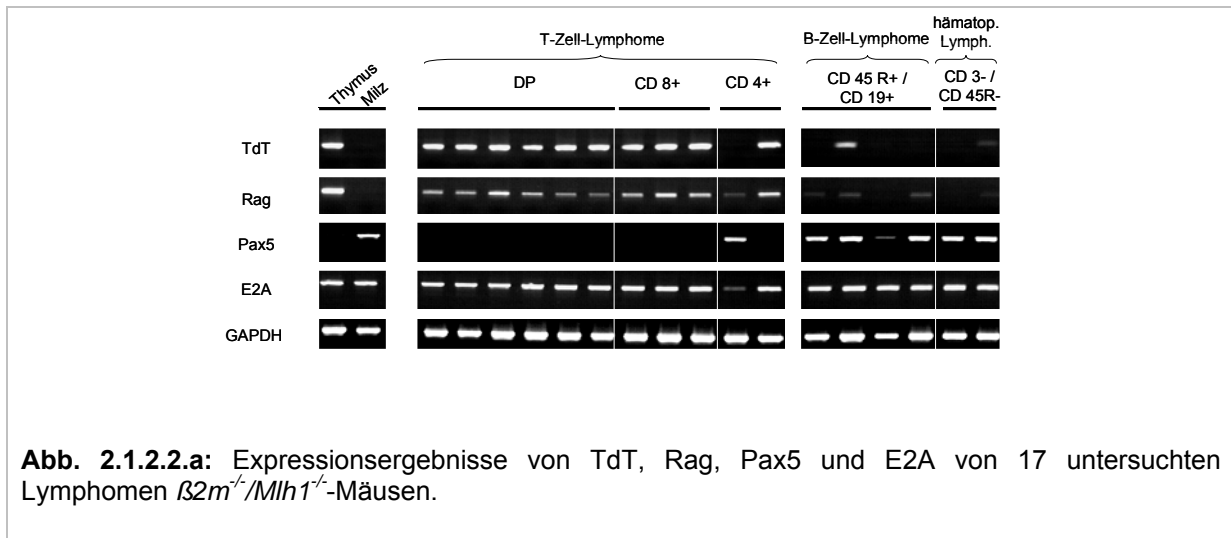
Tab. 2.1.2.1.a: Prozentuale Verteilung der durch Immunphänotypisierung charakterisierten Lymphome von $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen verglichen mit $Mlh1^{-/-}$ -Tieren.

2.1.2.2. Genexpressionsprofile der Lymphome anhand von Differenzierungsmarkern

Wie bereits in den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren gezeigt, konnten durch die Bestimmung der Expressionsprofile von Rag, TdT und Pax5 die Lymphome $Mlh1$ defizienter Mäuse in weitere Gruppen unterschieden werden. Zur weiteren Eingrenzung der Lymphome wurden daher auch die Expression von TdT, Rag, Pax5 und E2A auf RNA-Ebene in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren analysiert. Als Kontrollen dienten wiederum aus Thymus und der Milz isolierte RNA-Proben wildtypischer Geschwistertiere.

Es wurden 11 T-Zell Lymphome, 4 B-Zell Lymphome und 2 hämatopoetische Lymphome getestet (Abbildung 2.1.2.2.a). Von den T-Zell Lymphomen exprimierte nur ein CD 4 einfach positives T-Zell Lymphom Pax5, alle anderen exprimierten Rag, TdT und waren Pax5-negativ. Dagegen exprimierten alle B-Zell Lymphome, ebenso wie die hämatopoetischen Lymphome Pax5 und nur in Ausnahmefällen TdT oder Rag.

Wie bereits in der Immunphänotypisierung festgestellt kam es zu einer Reduktion in einer Untergruppe der T-Zell Lymphome: den doppelt negativen T-Zell Lymphomen. Aus der Genexpressionsuntersuchung der Entwicklungsmarker wurde darüber hinaus klar, dass in dieser Population der Anteil an TdT-/Rag-/Pax5+ T-Zell Lymphomen (verglichen zu den $Mlh1^{-/-}$ -Lymphomen) deutlich reduziert war. Die zusätzliche Defizienz von $\beta 2$ Mikroglobulin führt also in den $Mlh1$ defizienten Tieren zu einem verminderten Auftreten von doppelt negativen und CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphomen, die Rag-/TdT-/Pax5+ sind. Dagegen unterschieden sich die Expressionsergebnisse der B-Zell Lymphome und der hämatopoetischen Lymphome der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere nicht von denen der $Mlh1^{-/-}$ -Mäuse.



Die Expressionsergebnisse wurden in Tabelle 2.1.2.2.b zusammengefasst und zeigten, dass sich die Mehrzahl der T-Zell Lymphome (10 von 11 Tumoren) durch die Expression von TdT und Rag, bei fehlender Pax5-Expression, charakterisieren ließen. Die in den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren in einem ähnlichen Verhältnis, wie den TdT+/Rag+/Pax5- T-Zell Lymphomen auftretenden TdT-/Rag-/Pax5+ T-Zell Lymphome, waren bei den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren nahezu verschwunden (1 von 11).

$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	Anzahl	E2A	Pax 5	Rag	TdT
Lymphomart	(n)	exprimiert			
DP T-Zell-Lymphom	6	100%	0%	100%	100%
CD 8+ Lymphom	3	100%	0%	100%	100%
DN T-Zell-Lymphom	0	-	-	-	-
CD 4+ Lymphom	2	100%	50%	100%	50%
B-Zell-Lymphom	4	100%	100%	75%	25%
CD3- CD45R-	2	100%	100%	0%	0%

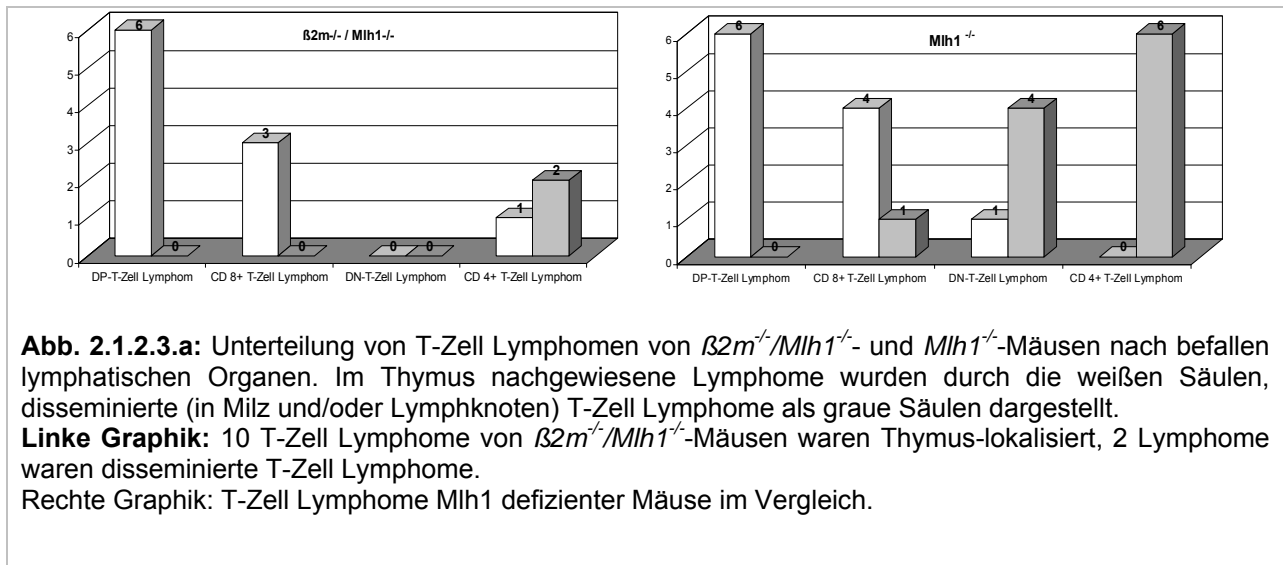
Tab. 2.1.2.2.b: Prozentuale Darstellung der Expressionsergebnisse für E2A, Pax5, Rag und TdT in den Lymphomen der 17 $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse.
n (Anzahl der untersuchten Lymphome je Subgruppe).

Die Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse legten nahe, dass sich die reduzierte Anzahl an Lymphomen speziell auf eine Reduktion in der Anzahl disseminierter T-Zell Lymphome zurückführen ließ. Um dies zu überprüfen, wurden die Entstehungsorte (Lokalisation) der Lymphome untersucht.

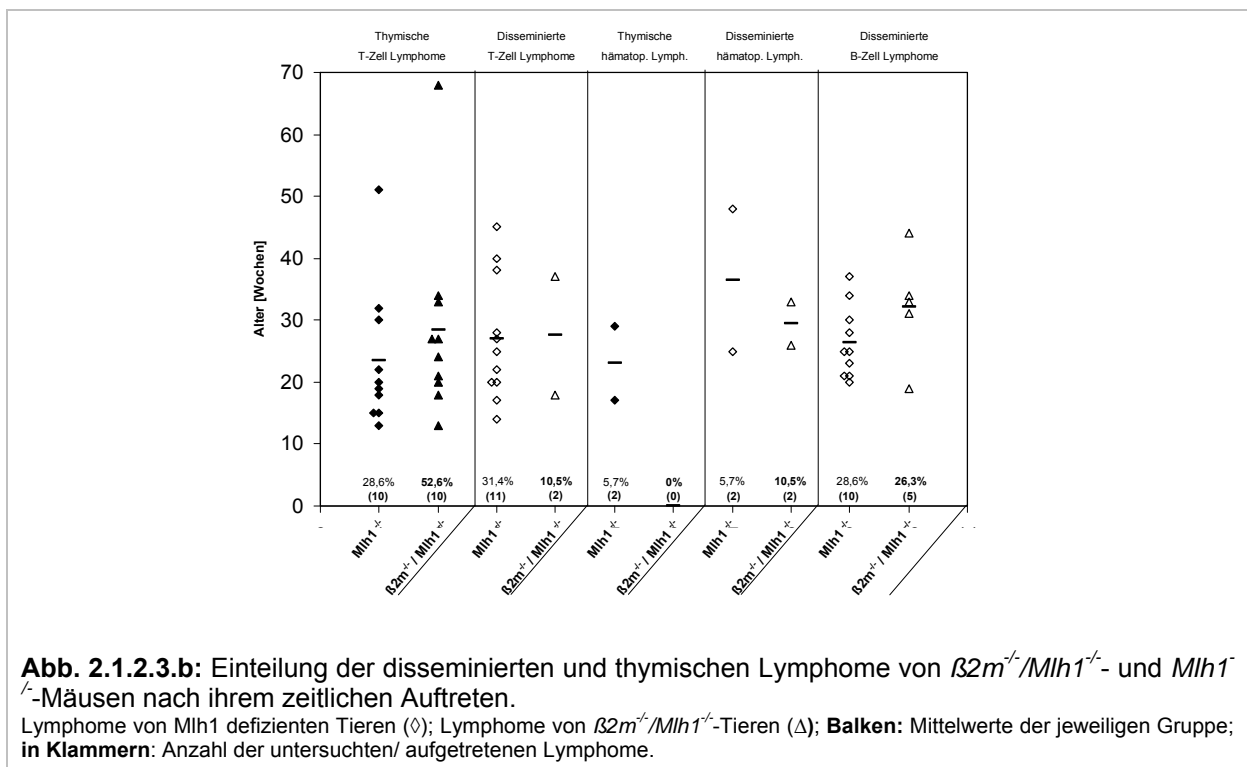
2.1.2.3. Lokalisation der Lymphome

In $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen konnte gezeigt werden, dass es sich bei sämtlichen Rag-/TdT-negativen T-Zell Lymphomen ausschließlich um disseminierten Tumoren handelte. In Abbildung 2.1.2.3.a wurde die Lokalisation des Tumoreignisses der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse den klassifizierten T-Zell Lymphomen gegenübergestellt. Bei den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren fand sich eine Reduktion in der Anzahl der disseminierten T-Zell Lymphome (TdT-/Rag-/Pax5+) verglichen zu den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren vor. Lediglich 2 von

12 der untersuchten T-Zell Lymphome von $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tiere waren disseminierte T-Zell Lymphome.



Das Verhältnis von disseminierten und thymischen Lymphomen sowie das durchschnittliche Erkrankungsalter der $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäuse vergleicht die Abbildung 2.1.2.3.b. Es ließ sich kein beschleunigtes Auftreten disseminierter oder thymischer T-Zell Lymphome in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren, gegenüber den $Mlh1^{-}$ -Tieren, nachweisen. Im Fall der thymischen Lymphome kam es jedoch zu einem verzögerten Auftreten der Tumorentstehung. Der durchschnittliche Entstehungszeitpunkt in $Mlh1^{-}$ -Mäusen lag bei etwa 24 Wochen, in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren bei etwa 28 Wochen. Bemerkenswert, dass die Anzahl der Mäuse mit disseminierten T-Zell Lymphomen und B-Zell Lymphomen in der $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Population, verglichen mit den $Mlh1^{-}$ -Mäusen, reduziert war.



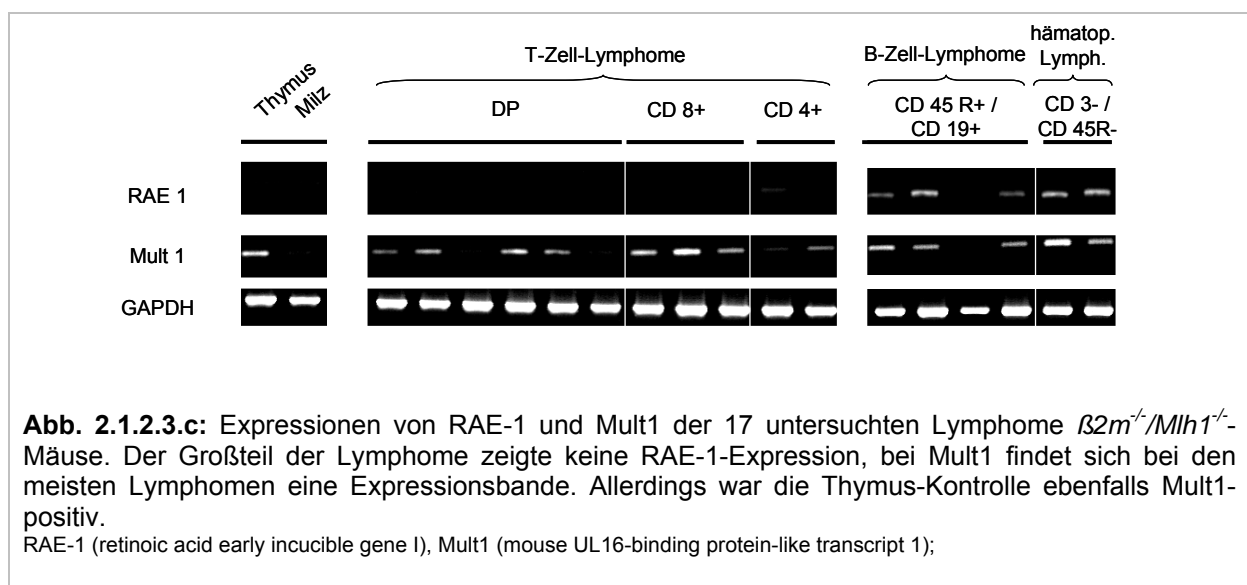
Von den 19 $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Lymphomen waren 52,6% thymische T-Zell Lymphome (gegenüber 28,6% bei $Mlh1$ defizienten Tieren), 10,5% disseminierte T-Zell Lymphome ($Mlh1^{-}$: 31,4%), keine thymischen hämatopoetischen Lymphome ($Mlh1^{-}$: 5,7%), 10,5% disseminierte hämatopoetische Lymphome ($Mlh1^{-}$: 5,7%) und 26,3% B-Zell Lymphome ($Mlh1^{-}$: 28,6%).

2.1.2.4. MHC Klasse I-Moleküle und streßinduzierte NK-Zell-aktivierende Liganden

Die Untersuchung der Lymphomentwicklung zeigte eine deutliche Reduktion des Auftretens der disseminierten (Rag-/TdT-/Pax5+) T-Zell Lymphome in $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen. Es stellte sich nun die Frage, welcher Mechanismus dem Rückgang in der Anzahl dieser Lymphome durch die Defizienz von $\beta 2$ Mikroglobulin zugrunde liegt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer verstärkten Abwehr dieser Lymphome durch immunkompetente Zellen vermutet werden. $\beta 2m^{-}$ -Mäuse sind durch den Verlust cytotoxischer T-Zellen und fehlender Expression von MHC I charakterisiert. Daher wurde die Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Molekülen und die Expression von RAE-1 auf RNA-Ebene untersucht.

MHC Klasse I-, RAE-1- und Mult1-Expression der Lymphome: Der immunphänotypische Nachweis der MHC Klasse I-Expression wurde bei den Lymphomen dieser Tiere durchgeführt (Tabelle 4 im Anhang). In keinem der untersuchten 17 Lymphome fanden sich, wie zu erwarten, MHC Klasse I-positive Zellen.

Abbildung 2.1.2.3.c stellte die Genexpressionen der 17 untersuchten Lymphome von $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen dar. In keinem der T-Zell Lymphome konnte eine Expression von RAE-1 beobachtet werden. Es fanden sich in den Gruppen der B-Zell Lymphome und der hämatopoetischen Lymphome RAE-1-Expressionsbanden. Der Großteil der Lymphome exprimierte Mult1, in zwei der doppelt positiven T-Zell Lymphome und einem B-Zell Lymphom war keine Mult1-Expressionsbande erkennbar.



Insgesamt 60,6% der Lymphome von $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren exprimierten kein RAE-1 (Tabelle 2.1.2.3.d). Keines der untersuchten T-Zell Lymphome wies eine

Überexpression von RAE-1 auf. Dagegen exprimierten 75% der B-Zell-Lymphome und beide hämatopoetischen Lymphome (100%) RAE-1. Eine Mult1-Expressionsbande fehlte bei 23,5% der untersuchten Lymphome.

$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	Anzahl	RAE 1	Mult 1
Lymphomart	(n)	exprimiert	
DP T-Zell-Lymphom	6	0%	67%
CD 8+ Lymphom	3	0%	100%
DN T-Zell-Lymphom	0	-	-
CD 4+ Lymphom	2	0%	50%
B-Zell-Lymphom	4	75%	75%
CD3- CD45R-	2	100%	100%

Tab. 2.1.2.3.d: Prozentuales Verhältnis der Expressionsergebnisse von RAE-1 und Mult1 in den 17 Lymphomen der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse. Keines der untersuchten T-Zell Lymphome wies eine Überexpression von RAE-1 auf. Dagegen exprimierten die Mehrzahl der B-Zell-Lymphome und die hämatopoetischen Lymphome (CD 3- / CD 45R-) RAE-1.

2.1.3. Gastrointestinaltumorentwicklung in $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen

Wie in den Kaplan-Maier-Überlebenskurven (Abb. 2.1.1.c) gezeigt werden konnte, kam es in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren zu einer Beschleunigung in der Entwicklung von gastrointestinalen Tumoren. Darüber hinaus resultierte aus der Reduktion in der Anzahl der auftretenden Lymphomtiere eine relative Zunahme von Gastrointestinaltumor-entwickelnden Mäusen. Morphologisch unterschieden sich die gastrointestinalen Tumoren nicht von denen in $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen gefundenen Tumoren. Dies zeigte die histologische Befundung einer Gruppe von Gastrointestinal-Tumoren der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere.

2.1.4. Tumorgenese in $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen

Um festzustellen, ob der Verlust eines $\beta 2$ Mikroglobulin-Allels bereits zu einer Veränderung der Tumorphänotyps in den MMR-defizienten Mäusen führt, wurden ebenfalls $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse analog, wie bei den vorausgegangenen Mausmodellen untersucht. Die daraus resultierenden Daten werden hier in Kürze zusammenfassend und im Vergleich zu den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - und $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen dargestellt.

Insgesamt wurden 26 $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse untersucht. Alle Tiere erkrankten innerhalb von 50 Wochen an der Ausbildung von gastrointestinalen und lymphoiden Tumoren. Die Überlebenskurven, eingeteilt in die verschiedenen $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tumorinzidenz-Gruppen (Abb. 2.1.4.a), stimmten mit denen der $Mlh1$ defizienten Mäuse weitestgehend überein. Das 50%-Überleben bei den Lymphom-entwickelnden Tieren lag bei 20 Wochen, bei 35 Wochen in Tieren, die sowohl gastrointestinale als auch lymphoide Tumoren entwickelten, und bei 37 Wochen bei den Tieren mit gastrointestinalen Tumoren.

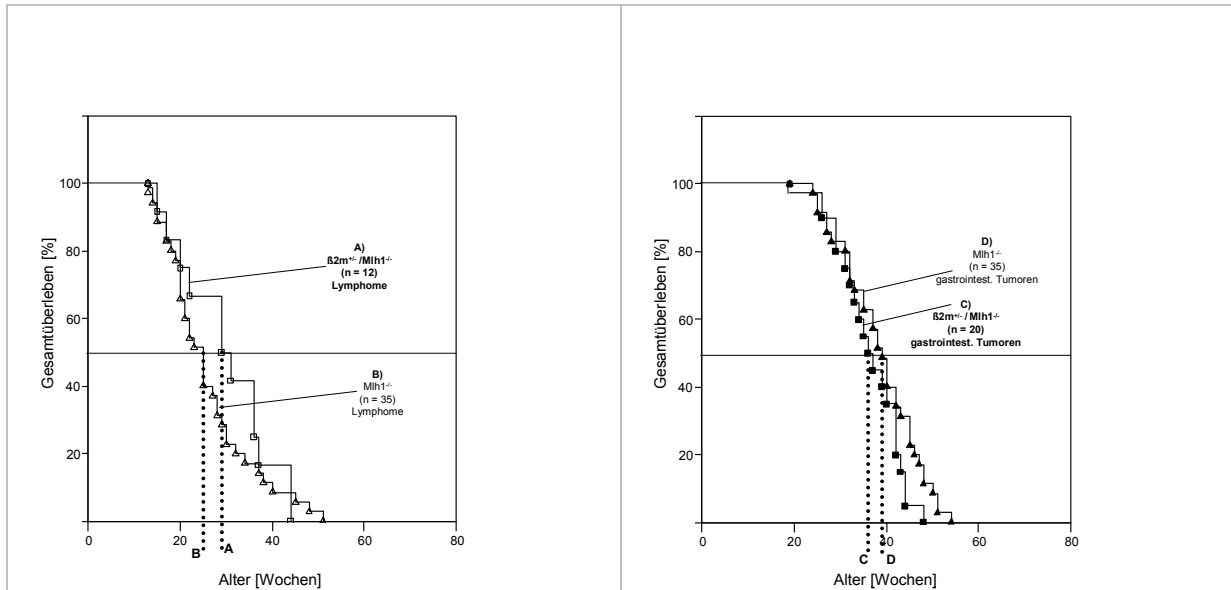


Abb. 2.1.4.a: Gegenüberstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse verglichen mit $Mlh1^{-/-}$ Tieren.

Gestrichelte Linien: 50 %-Überleben der entsprechenden Tiergruppen. **Linke Abbildung:** **A)** 12 $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ - Lymphomtiere (\square); **B)** 35 $Mlh1^{-/-}$ -Lymphomtiere (Δ). **Rechte Abbildung:** **C)** 20 $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ - Gastrointestinaltumortiere (\blacksquare); **D)** 35 $Mlh1^{-/-}$ -Gastrointestinaltumortiere (\blacktriangle).

Auch $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse wiesen eine Reduktion der Anzahl an Lymphom-Tieren (23,1 %) auf und zeigten einen Anstieg der Anzahl der Tiere, die beide Tumorarten (23,1 %) und gastrointestinale Tumore (53,8%) entwickelten (Tabelle 2.1.4.b).

Tumorart	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 38)	$\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ (n = 26)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Gastrointestinale Tumoren	47,4%	53,8%	43,5%
Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	31,6%	23,1%	13,0%
Lymphoide Tumoren	21,0%	23,1%	43,5%

Tab. 2.1.4.b: Verteilung von gastrointestinalen und lymphoiden Tumoren in $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen verglichen mit den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - und den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren.

2.1.4.1. Charakterisierung der Lymphome

Die Charakterisierung der in den $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren aufgetretenen Lymphome zeigte, dass es sich bei 44,4% der Lymphome um B-Zell Lymphome (CD 45R+ /CD 19+) und bei 55,6% T-Zell Lymphome (CD 3+) handelte (Tabelle 2.1.4.1.a). Unter den T-Zell Lymphomen der $\beta 2m^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren war die Anzahl der DN und CD 4+ T-Zell Lymphome reduziert. Gleichzeitig DN und CD 8+ T-Zell Lymphome vermehrt auf. Die B-Zell Lymphome entstanden (den Immunphänotypisierungsergebnissen zufolge) aus Ig M+/- / Ig D- / CD 45R+ B-Zellen.

Lymphomart	Immunphänotypisierung	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ (n = 18)	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{+/-}$ (n = 9)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 34)			
B-Zell Lymphome	CD 45R+ IgD- IgM-	16,67%	22,3 %	44,4 %	26,5 %		
	CD 45R+ IgD- IgM+	5,6%				33,3%	11,8%
T-Zell Lymphome	DP T-Zell Lymphom	33,3%	66,6 %	55,6 %	61,7 %		
	CD 8+ T-Zell Lymphom	16,67%				11,1%	14,7%
	DN T-Zell Lymphom	-				22,2%	14,7%
	CD 4+ T-Zell Lymphom	16,67%				-	17,6%
hämatopoetische Lymphome	CD 24+ CD 45R- CD 3-	11,1%	11,1 %	0 %	11,8 %		

Tab. 2.1.4.1.a: Verteilung von 9 immunphänotypisch untersuchten Lymphomen $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Mäusen verglichen mit $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{+/-}$ - und $Mlh1^{-/-}$ -Tieren. Die Anzahl an B-Zell Lymphomen war erhöht, wogegen sich keine CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphome und hämatopoetischen Lymphome in $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Mäusen nachweisen ließen.

Die Lokalisation der T-Zell Lymphome beschränkte sich weitestgehend auf den Thymus, es kam also auch bei den $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Tieren zu einer Reduktion in der Anzahl an disseminierten T-Zell Lymphomen wie auch bei den $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{+/-}$ -Tieren (Abb. 2.1.4.1.b).

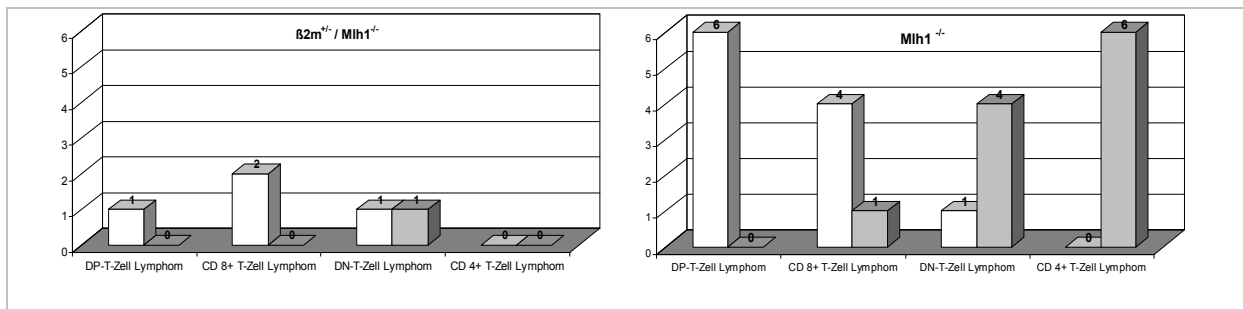


Abb. 2.1.4.1.b: Unterteilung von T-Zell Lymphomen von $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ - und $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen nach befallenen lymphatischen Organen. Im Thymus nachgewiesene Lymphome wurden durch die weißen Säulen, disseminierte (in Milz und/oder Lymphknoten) T-Zell Lymphome als graue Säulen dargestellt.

Linke Abbildung: 4 T-Zell Lymphome von $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Mäusen fanden sich im Thymus.

Rechte Abbildung: Die Anzahl der disseminierten T-Zell Lymphome war mit nur einem Fall gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren stark reduziert.

Hinsichtlich TdT-, Rag- und Pax5-Expression (Abb. 2.1.4.1.c) ergab sich folgendes Bild: TdT und Rag wurden von allen thymischen T-Zell Lymphomen (CD 8 einfach positiv und doppelt positiv) exprimiert; dagegen waren die disseminierten T-Zell Lymphome und die B-Zell Lymphome TdT- und Rag-negativ. Pax5 wurde nur von den B-Zell Lymphomen und einem disseminierten T-Zell Lymphom (schwach) exprimiert.

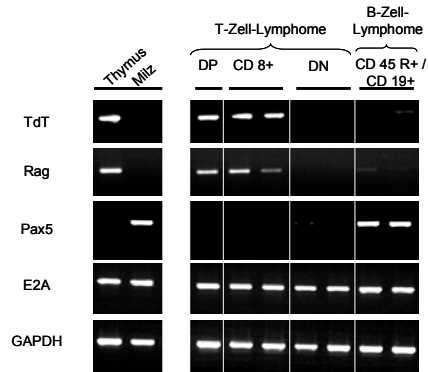


Abb. 2.1.4.1.c: Expressionsergebnisse von TdT, Rag, Pax5 und E2A von 7 untersuchten Lymphomen $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen

2.1.4.2. MHC Klasse I Moleküle und streßinduzierte NK-Zell-aktivierende Liganden

Um auch bei diesem Genotyp die Lymphome genauer zu charakterisieren, wurde die Expression von RAE-1 und Mult1 untersucht (Abb. 2.1.4.2.a).

Von 7 getesteten Lymphomen der $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse wies keines der T-Zell Lymphome eine RAE-1-Expressionsbande auf; beide untersuchten B-Zell-Lymphome waren dagegen RAE-1 positiv. Mult1 wurde von den Proben der doppelt positiven (DP) und CD 8 einfach positiven T-Zell Lymphomen sowie allen B-Zell-Lymphomen exprimiert. Die doppelt negativen (DN) T-Zell Lymphome waren als einzige Lymphome zudem Mult1-negativ.

Im Vergleich mit der MHC Klasse I-Expression (Immunphänotypisierung) fiel auf, dass nur die doppelt negativen (disseminierten) T-Zell Lymphome und die B-Zell Lymphome MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Den doppelt positiven und die CD 8 einfach positiven T-Zell Lymphomen fehlte die MHC Klasse I-Expression, außerdem zeigten sie keine RAE-1-Expression.

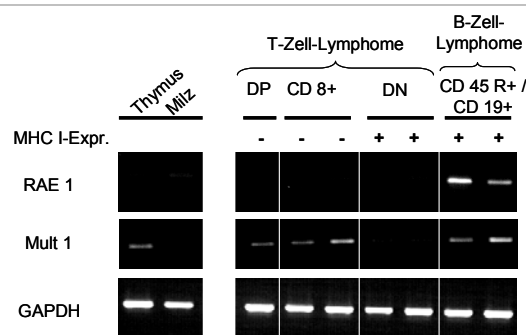


Abb. 2.1.4.2.a: Expressionen von RAE-1 und Mult1 der 7 untersuchten Lymphome $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zur MHC Klasse I-Expression (Immunphänotypisierung).

MHC I-Expr. (Immunphänotypisierung MHC Klasse I Expression), +/- (exprimiert / nicht exprimiert, RAE-1 (retinoic acid early inducible gene 1), Mult1 (mouse UL16-binding protein-like transcript 1)

Die tabellarische Übersicht (Tabelle 2.1.4.2.b) stellt nochmals die fehlende RAE-1-Expression in allen untersuchten T-Zell Lymphomen, sowie die RAE-1-Expression in den B-Zell Lymphomen, gegenüber. RAE-1-Expression fand sich ausschließlich in

den B-Zell-Lymphomen, keines der T-Zell-Lymphome exprimierte RAE-1. Mult1 wurde in den doppelt negativen T-Zell Lymphomen (DN) nicht exprimiert.

$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	Anzahl	RAE 1	Mult 1
Lymphomart	(n)	exprimiert	
DP T-Zell-Lymphom	1	0%	100%
CD 8+ Lymphom	2	0%	100%
DN T-Zell-Lymphom	2	0%	0%
CD 4+ Lymphom	0	-	-
B-Zell-Lymphom	2	100%	100%
CD3- CD45R-	0	-	-

Tab. 2.1.4.2.b: Verhältnis der Expressionsergebnisse von RAE-1 und Mult1 in den 7 Lymphomen der $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Mäuse. n (Anzahl der untersuchten Lymphome je Subgruppe)

2.1.4.3. Gastrointestinaltumorgnese

Die Entstehung von gastrointestinalen Tumoren in $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Tieren war gegenüber den *Mlh1* defizienten Mäusen nur geringfügig beschleunigt (linke Abbildung 2.1.4.a). Histologisch wiesen die untersuchten Tumoren ebenfalls keinen Unterschied zu den in *Mlh 1* defizienten Tieren gefundenen Tumoren auf.

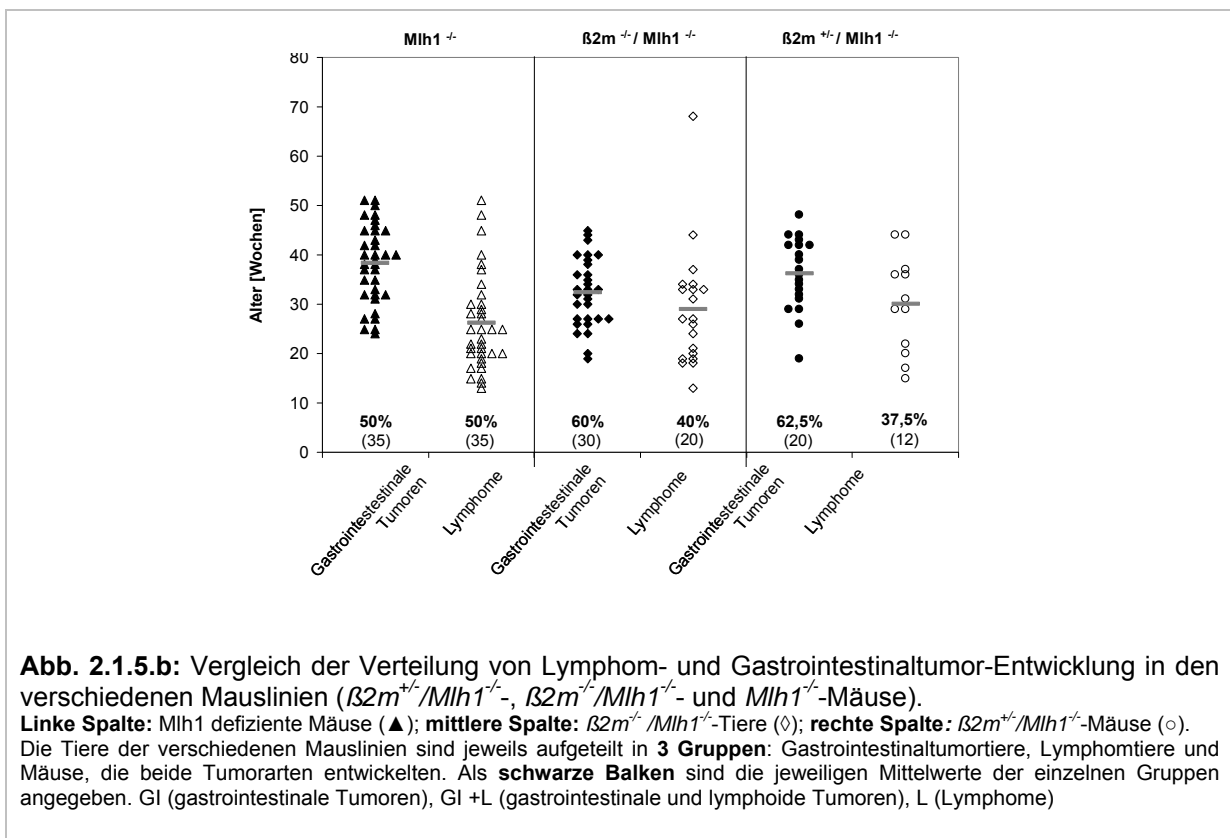
2.1.5. Vergleich der $\beta 2m / Mlh1$ - und *Mlh1*-Mauspopulationen

Unterschiede in der Gruppe „Tiere älter als 30 Wochen“ waren bei den $\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$ - und $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Tieren, verglichen zu den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen, kaum erkennbar. Der Prozentsatz an Tieren mit Doppelereignissen war bei homozygot und heterozygot defizienten $\beta 2$ Mikroglobulin-Tieren um etwa 1/10 erhöht (Tabelle 2.1.5.a). Betrachtet man jedoch den Anteil an Tieren mit frühzeitiger Gastrointestinaltumorentwicklung wird ein Unterschied erkennbar. Bei den $\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$ -Mäusen in der Tiergruppe, die innerhalb der ersten 30 Wochen erkrankten ist die Anzahl der Tiere mit Gastrointestinaltumorentwicklung gegenüber den *Mlh1* defizienten Mäusen deutlich erhöht. Mit 26,7 % gastrointestaltumorentwickelnden und 40,0 % Tieren mit beiden Tumorereignissen in der Tiergruppe, die nicht älter als 30 Wochen wurden, machten diese Gruppen mehr als die Hälfte der Tiere aus. Bei den *Mlh1*^{-/-}-Tieren lag der Anteil bei 19 % (13 % gastrointestinale Tumoren und 6 % mit gastrointestinalen und lymphoiden Tumoren). Bei den $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Tieren war dieser Effekt schwächer ausgeprägt (insgesamt 44,4%), aber ebenfalls erkennbar.

Überleben	Tumorart	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$ (n = 38)	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ (n = 26)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Jünger als 30 Wochen	Gastrointestinale Tumoren	26,7%	33,3%	13,0%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	40,0%	11,1%	6,0%
	Lymphoide Tumoren	33,3%	55,5%	81,0%
Älter (gleich) als 30 Wochen	Gastrointestinale Tumoren	60,9%	64,7%	74,0%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	26,1%	29,4%	19,0%
	Lymphoide Tumoren	13,0%	5,9%	7,0%

Tab. 2.1.5.a: Einteilung der Gesamtpopulationen $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$, $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ und $Mlh1^{-/-}$ -Mäuse in erkrankte Tiere, die früher und später als 30 Wochen erkrankten. Verteilung der unterschiedlichen Tumorarten (in Prozent).

In der Abbildung 2.1.5.b wurden die einzelnen Gruppen tumorausbildender Tiere, sowie das zeitliche Auftreten der Erkrankung gegenübergestellt. Die Gastrointestinaltumorentstehung war bei den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren gegenüber den $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ - und $Mlh1^{-/-}$ -Tieren beschleunigt (die grauen Balken illustrieren den Mittelwert der jeweiligen Gruppen). Das Auftreten der Lymphome fand bei den $Mlh1^{-/-}$ defizienten Mäusen früher als bei beiden $\beta 2$ Mikroglobulin/ $Mlh1$ -Populationen statt.



Der abschließende Vergleich der verschiedenen Lymphom-Subgruppen der T-Zell-Lymphome von $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$, $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ und $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen (Abb. 2.1.5.c) zeigte, dass in beiden $\beta 2$ Mikroglobulin/ $Mlh1$ -Mausmodellen eine deutliche Reduktion der Anzahl auftretender disseminierter T-Zell Lymphome gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen vorlag.

So fehlte beispielsweise den $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren die Gruppe der CD 4 einfach positiven (CD 4+) T-Zell Lymphome und in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen ließen sich keine doppelt negativen T-Zell Lymphome nachweisen.

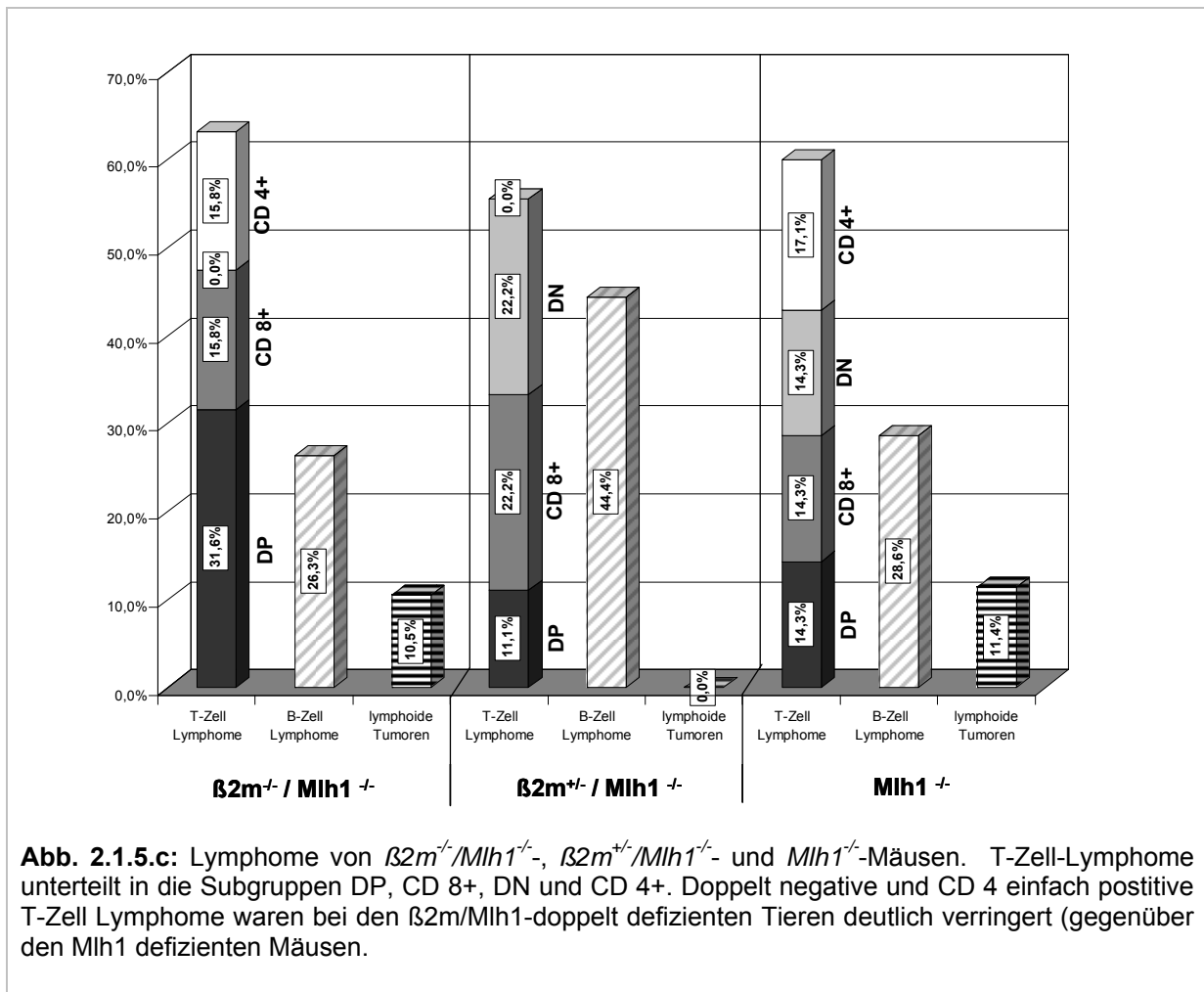


Abb. 2.1.5.c: Lymphome von $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -, $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ - und $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen. T-Zell-Lymphome unterteilt in die Subgruppen DP, CD 8+, DN und CD 4+. Doppelt negative und CD 4 einfach positive T-Zell Lymphome waren bei den $\beta 2m/Mlh1$ -doppelt defizienten Tieren deutlich verringert (gegenüber den $Mlh1$ defizienten Mäusen).

2.2. Die Bedeutung der Perforin-vermittelten Zell-Lyse für die Entstehung MLH1 defizienter Tumore (*pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere)

Die Perforin-vermittelte Zielzell-Lyse ist ein wichtiger Mechanismus der Tumorabwehr durch cytotoxische T-Zellen oder NK-Zellen. Fehlt Perforin, sind cytotoxische Zellen (CTL) nicht mehr in der Lage über diesen „sekretorischen Pathway“ potentielle Zielzellen zu eliminieren. Um nachzuweisen, ob der Verlust der disseminierten T-Zell Lymphome in den *β2m*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen tatsächlich auf einer Immunzell-vermittelten Tumorerkennung basierte, wurden durch Einkreuzen von Perforin-Defizienz (*pfp*^{-/-}) Perforin- und Mlh1-doppelt defiziente (*pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}) Tiere generiert und mit der Tumorentstehung der Mlh1 defizienten Mäuse verglichen.

2.2.1. Tumorinzidenz und Überlebenskurven von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren

In die Mlh1 defiziente Mauspopulation wurden *pfp*^{-/-}-Mäuse (auf reinem C57BL6-Hintergrund) eingekreuzt. Insgesamt wurden 32 *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere über einen Zeitraum von 15 Monaten untersucht. Als Kontrollgruppen dienten 19 *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{+/-}-, 21 *pfp*^{+/-}/*Mlh1*^{+/-}-Geschwistertiere. Alle in die Untersuchung eingegangenen Tiere der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Population wurden in den Tabelle 9 im Anhang aufgelistet. Auch in dieser Population wurden die (nach dem Mendelschen Verteilungsgesetz) erwarteten Anteile der der jeweiligen Genotypen erreicht.

Sämtliche 32 *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere erkrankten innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Die vergleichende Gegenüberstellung in einer Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigte, dass die *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere früher als die *Mlh1*^{-/-}-Mäuse erkrankten (Abb. 2.2.1.a). Das 50%-Überleben war bei den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren mit 27 Wochen, gegenüber den *Mlh1*^{-/-}-Tieren mit etwa 32 Wochen, verringert.

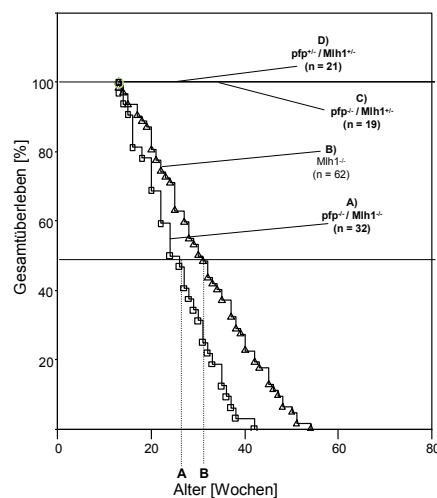


Abb. 2.2.1.a: Gegenüberstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven **A:** *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-} Mäuse (□) verglichen mit **B:** *Mlh1*^{-/-}-Tieren (Δ) und den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{+/-}- und *pfp*^{+/-}/*Mlh1*^{+/-}- Kontrollgruppen (**D + C**). Die Tiere der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Population erkrankten früher als die *Mlh1*^{-/-}-Tiere. Die **gestrichelten Linien** von A und B zeigen das 50%-Überleben der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}- und der *Mlh1*^{-/-}-Population.

Auch die $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse entwickelten Lymphome und/oder Tumoren im GI-Trakt. Wie Tabelle 2.2.1.b zeigt, entstanden in der $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mauspopulation in der Mehrzahl der Mäuse Lymphome oder Lymphome und Gastrointestinaltumoren gleichzeitig. Es erkrankten über 80% aller Tiere an Lymphomen. 6 der 32 $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere entwickelten gastrointestinale Tumoren (18,8%), 17 Tiere Lymphome (53,1%) und 9 gastrointestinale und lymphoide Tumoren gemeinsam (28,1%). Dies zeigte, dass es durch den Verlust von Perforin in $Mlh1$ defizienten Mäusen zu einer verstärkten Entwicklung von Lymphomen kam.

Tumorart	$pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 32)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Gastrointestinale Tumoren	18,8 %	43,5%
Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	28,1 %	13,0%
Lymphoide Tumoren	53,1 %	43,5%

Tab. 2.2.1.b: Prozentuales Auftreten der unterschiedlichen Tumorarten in der $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Population verglichen mit den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen.
n (Anzahl der untersuchten Tiere).

In Abb. 2.2.1.c wurden die Überlebenskurven der $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Gesamtpopulation nach der entwickelten Tumorart (gastrointestinale und lymphoide Tumoren) unterteilt. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurden die Gruppe der Tiere mit beiden Tumoreignissen (gastrointestinale und lymphoide Tumoren) in Abb.2.2.1.c beiden Einzelgruppen zugeordnet dargestellt.

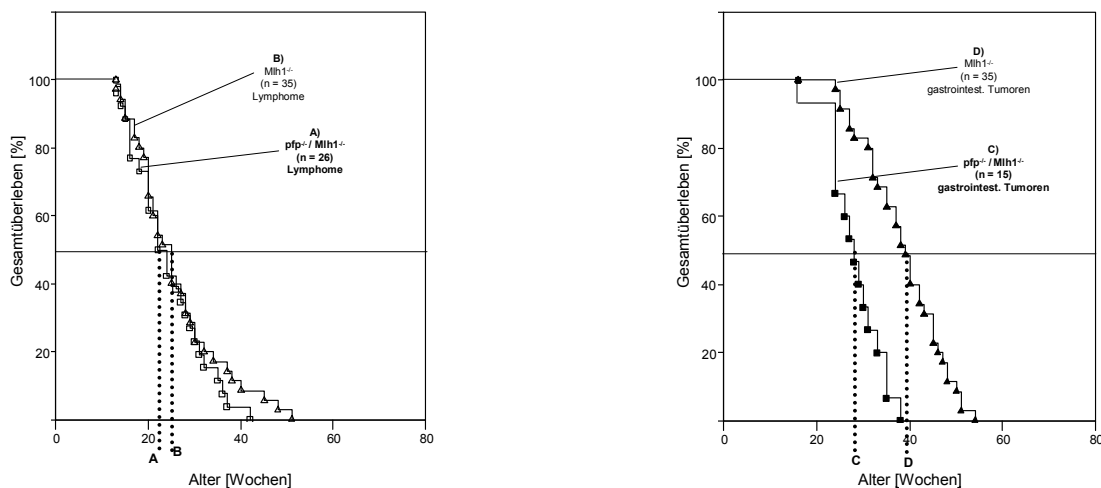


Abb. 2.2.1.c: Gegenüberstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse ($\blacktriangle, \triangle$) verglichen mit $Mlh1^{-/-}$ -Tieren (\blacksquare, \square).

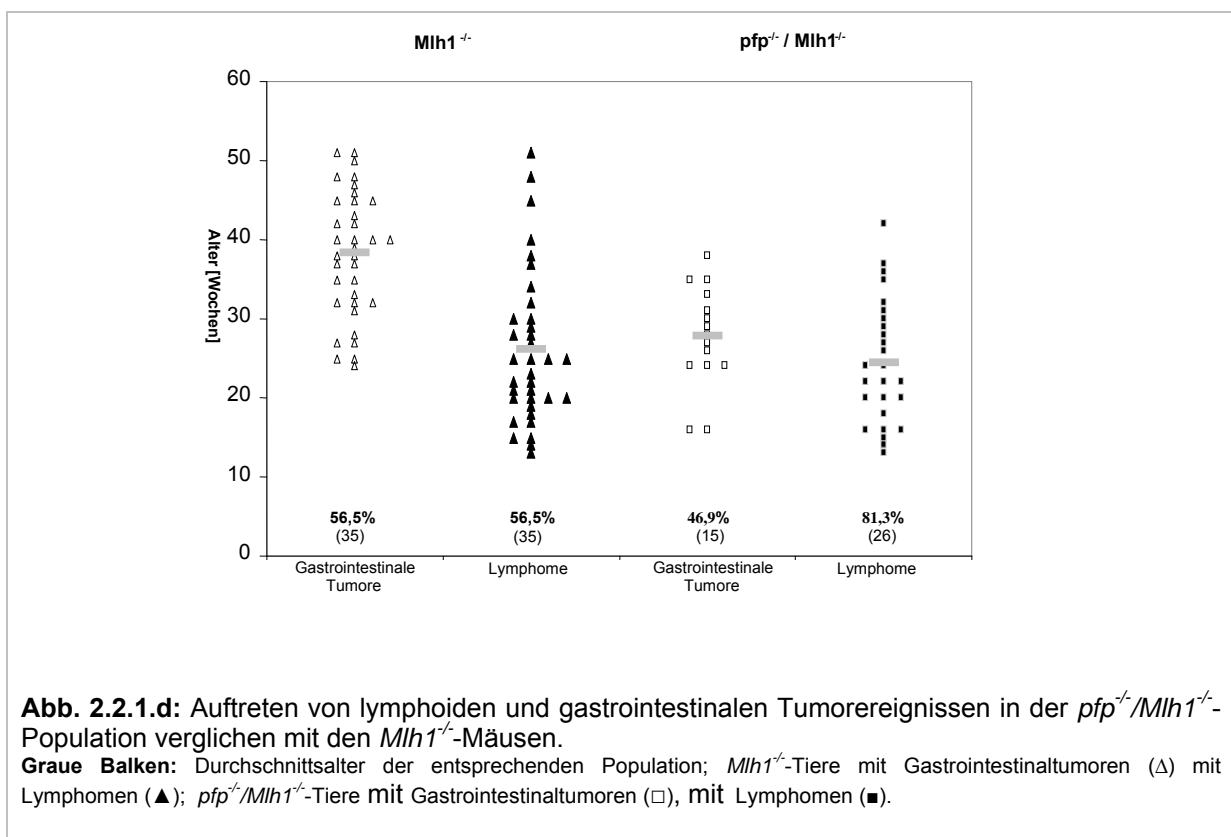
Gestrichelte Linien: 50 %-Überleben der entsprechenden Tiergruppen. **Linke Abbildung:** **A)** 26 $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Lymphomtiere; **B)** 35 $Mlh1^{-/-}$ -Lymphomtiere. **Rechte Abbildung:** **C)** 15 $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - Gastrointestinaltumortiere; **D)** 35 $Mlh1^{-/-}$ -Gastrointestinaltumortiere.

Zu den GI-Tieren und den Lymphom-Tieren wurden auch in beiden Fällen die Tiere gezählt, bei denen beide Tumoreignisse auftraten.

Trotz einer erhöhten Anzahl an Lymphomtieren war ihr zeitliches Auftreten gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen nur geringfügig beschleunigt (50%-Überleben: 22

Wochen in den $pfp^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren zu 26 Wochen in den $Mlh1^{-}$ -Tieren). Weiterhin zeigte sich ein frühzeitigeres Auftreten von gastrointestinalen Tumoren. Die 50%-Überlebensrate der Gastrointestinaltumor-entwickelnden Tiere lag bei den $pfp^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren bei 29 Wochen, bei den $Mlh1^{-}$ -Mäusen bei 39 Wochen. Der Vergleich mit der entsprechenden $Mlh1^{-}$ -Population machte deutlich, dass es zu einer beschleunigten Entwicklung von gastrointestinalen Tumoren bei den $pfp^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren kam.

Der direkte Vergleich der Tumorinzidenzen (Gastrointestinaltumoren, Lymphome und Tiere mit beiden Tumorarten, Lymphomen und Gastrointestinaltumoren) in den verschiedenen untersuchten Mauslinien (Abb. 2.2.1.d) zeigte, dass Perforindefiziente Mauslinien vermehrt lymphoide Tumoren entwickelten, ihr zeitliches Auftreten blieb jedoch unverändert, verglichen mit der entsprechenden $Mlh1^{-}$ -Population. Die Perforin defizienten Tiere entwickelten deutlich früher Gastrointestinaltumoren als die $Mlh1$ defizienten Mäuse.



Vergleich man die Tumorinzidenzen der $pfp^{-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere mit den $pfp^{+/+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen nach dem Kriterium „älter oder jünger als 30 Wochen“ (Abbildung 2.2.1.e), ließ sich Folgendes feststellen:

- (i) mehr Tiere erkrankten innerhalb von 30 Wochen an Tumoren (65% gegenüber 46%),
- (ii) ein höherer Anteil von Tieren mit Gastrointestinaltumoren unter den innerhalb von 30 Wochen erkrankten Tieren (42,8% gegenüber 19%) und
- (iii) ein höherer Anteil an Lymphomen in beiden Altersgruppen (älter und jünger als 30 Wochen).

Die Tiere, die gastrointestinale Tumoren entwickelten, erkrankten deutlich früher als die der *Mlh1*^{-/-}-Population. Histologische Unterschiede bei den gastrointestinalen Tumoren zu *Mlh1*^{-/-}-Mäusen wurden jedoch nicht festgestellt.

Überleben	Tumorart	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} (n = 32)	<i>Mlh1</i> ^{-/-} (n = 62)
Jünger als 30 Wochen	Gastrointestinale Tumoren	9,5 %	13,0%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	33,3 %	6,0%
	Lymphoide Tumoren	57,1 %	81,0%
		65,6 %	46,8 %
Älter (gleich) als 30 Wochen)	Gastrointestinale Tumoren	36,4 %	74,0%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	18,2 %	19,0%
	Lymphoide Tumoren	45,5 %	7,0%
		34,4 %	53,2 %

Tab. 2.2.2.e: Einteilung der Gesamtpopulation der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere verglichen mit den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen nach dem Erkrankungszeitpunkt: Tiere, die innerhalb der ersten 30 Wochen und solche, die nach 30 Wochen erkrankten.

Zusammengefasst ließ sich in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren eine beschleunigte Gastrointestinaltumor-Entstehung und ein vermehrtes Auftreten an Lymphomtieren beobachten.

2.2.2. Lymphomagenese in *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen

2.2.2.1. Charakterisierung der Lymphome von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen

Um festzustellen, in wie weit sich das Spektrum der Lymphome in *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen gegenüber dem der *Mlh1*^{-/-}-Tiere verändert hat, wurden Lymphome der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere analysiert. Hierzu wurden zum einen Expressionsprofile der bereits beschriebenen Oberflächenmoleküle (Immunphänotypisierung), zum anderen die Expressionen von Differenzierungsgenen auf transkriptioneller Ebene (RT-PCR) untersucht. Desweiteren wurde die Lokalisation und Histologie der Lymphome bewertet.

Morphologie der Lymphome: Neoplastisch veränderte lymphatische Organe waren bei den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen Thymi, die Milzen und Lymphknoten der Tiere. Von 26 untersuchten Mäusen fanden sich bei 2 Tieren der Thymus, bei 8 Mäusen der Thymus und die peripheren lymphatischen Organe und bei 16 Tieren nur die peripheren lymphatischen Organe (Milz und/oder Lymphknoten) neoplastisch verändert. Die histologisch befundeten lymphatischen Organe ließen sich als Non Hodgkin Lymphome charakterisieren.

Immunphänotypisierung: Das immunphänotypische Profil (siehe Tab. 13 und 14 im Anhang) der insgesamt 23 Lymphome von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}- Mäusen ähnelte dem der *Mlh1*^{-/-}-Mäuse. Es fanden sich 14 T-Zell Lymphome (60,9%), 6 B-Zell Lymphome (26,1%) und 3 hämatopoetische Lymphome (13,0%). Die T-Zell Lymphome ließen sich durch die Expression von CD 3, CD 4 und CD 8 weiter subklassifizieren. Von den 14 T-Zell Lymphomen waren 5 doppelt positive, 3 CD 8 einfach positive, 4

doppelt negative und 2 CD 4 einfach positive T-Zell Lymphome. Zwei der T-Zell Lymphome wiesen eine intermediäre Expression des T-Zell-Rezeptors CD 3 auf, kennzeichneten sich allerdings durch die Expression eines bzw. beider Co-Rezeptoren CD 4 und/oder CD 8. Keines der 6 untersuchten B-Zell Lymphome exprimierte Ig D oder Ig M.

Die prozentuale Verteilung aller Lymphome der *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäuse wurde in Tabelle 2.2.2.1.a den *Mlh1^{-/-}*-Tieren vergleichend gegenübergestellt. Betrachtete man die Subgruppen der T-Zell Lymphome *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäuse, fiel eine geringe Reduktion in der auftretenden Anzahl an CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphomen (8,7% gegenüber 17,6%) und eine vermehrte Anzahl an DP T-Zell Lymphomen (21,7% gegenüber 14,7%) bei den *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Tieren auf. Ebenso exprimierte keines der untersuchten B-Zell Lymphome Ig M auf der Zelloberfläche (0% gegenüber 14,7% bei den *Mlh1^{-/-}*-Tieren).

<i>Lymphomart</i>	<i>Immunphänotypisierung</i>	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-}</i> (n = 23)	<i>Mlh1^{-/-}</i> (n = 34)
B-Zell-Lymphome	CD 45R+ IgD- IgM -	26,1%	11,8%
	CD 45R+ IgD- IgM+	-	14,7%
T-Zell-Lymphome	DP: CD 4+ CD 8+ CD 3+	21,7%	14,7%
	CD 8+: CD 4- CD 8+ CD 3+	13,0%	14,7%
	DN: CD 4- CD 8- CD 3+	17,4%	14,7%
	CD 4+: CD 4+ CD 8- CD 3+	8,7%	17,6%
Hämatop. Lymphome	CD 24+ CD 45R - CD 3-	13,0	11,8%

26,1 % (für B-Zell-Lymphome)
60,9 % (für T-Zell-Lymphome)
13,0 % (für Hämatop. Lymphome)
26,5 % (für B-Zell-Lymphome)
61,7 % (für T-Zell-Lymphome)
11,8 % (für Hämatop. Lymphome)

Tab. 2.2.2.1.a: Zusammenfassung der Immunphänotypisierungsergebnisse der Lymphome von 23 *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}*- und 34 *Mlh1^{-/-}*-Mäusen im Vergleich.

Lokalisation der Lymphome: Wurden die verschiedenen T-Zell Lymphome im Hinblick auf ihre Lokalisation sortiert, zeigte sich, dass alle CD 8 einfach positiven und die doppelt positiven T-Zell Lymphome thymischen Ursprunges waren (siehe Tabelle 12 im Anhang). Dagegen war keines der CD 4 einfach positiven und doppelt negativen T-Zell Lymphome im Thymus nachweisbar; sie wurden somit als disseminierte Lymphome charakterisiert.

Das in Abbildung 2.2.2.1.b dargestellte zeitliche Auftreten der einzelnen Lymphomgruppen der *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäuse und der *Mlh1^{-/-}*-Mäuse verdeutlichte, dass die disseminierten und thymischen T-Zell Lymphome und hämatopoetischen Lymphome bei den *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäusen früher auftraten. Dagegen entwickelten sich die B-Zell Lymphome nahezu zeitgleich zu denen der *Mlh1^{-/-}*-Vergleichspopulation. Zudem konnte eine relative Zunahme in der Anzahl an Mäusen festgestellt werden, die thymische Lymphome entwickelten.

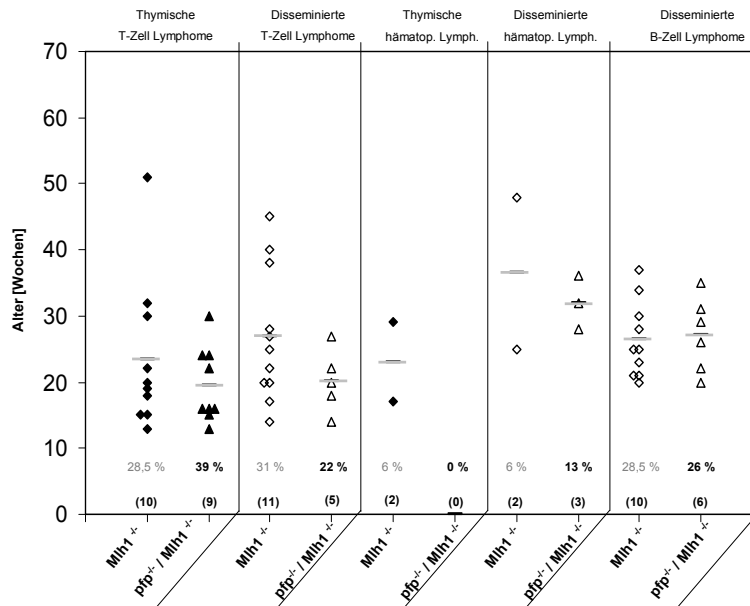


Abb. 2.2.2.1.b: Verteilung disseminierter Lymphome und im Thymus entstandener Lymphome von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen (Δ) verglichen mit *Mlh1*^{-/-}-Tieren (◇).

Graue Balken: Durchschnittsalter der jeweiligen Gruppe; **Prozentangaben:** Anteil der jeweiligen Lymphomart bezogen auf alle untersuchten Lymphome der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere (schwarze Prozentzahlen) und der *Mlh1*^{-/-}-Tiere (graue Prozentzahlen).

Eingeklammert: Anzahl an Mäusen der jeweiligen Tiergruppe.

Genexpressionsprofile anhand von Differenzierungsmarkern: Wie bereits in den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen beschrieben, liessen sich die T-Zell Lymphome durch die Expression von TdT, Rag und Pax5 in zwei Gruppen einteilen: (i) TdT+/Rag+/Pax5- T-Zell Lymphome und (ii) TdT-/Rag-/Pax5+ T-Zell Lymphome. Die Abbildung 2.2.2.1.c zeigt die Expression dieser Gene in Lymphomen der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse.

Insgesamt wurden 18 Lymphome von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen, darunter 10 T-Zell Lymphome, 6 B-Zell Lymphome und 2 hämatopoetische Lymphome untersucht. Kontrollen waren Isolate aus Thymus und Milz von C57/Bl6 wildtypischen Geschwistertieren. Die Expression von TdT, Rag, Pax5, E2A und GAPDH (als Referenz-Gen) wurde somit auf transkriptioneller Ebene durchgeführt.

TdT wurde von der Thymus-Kontrolle und den meisten (4 von 6) thymischen T-Zell Lymphomen exprimiert. Dagegen zeigten die disseminierten T-Zell Lymphome, die hämatopoetischen Lymphome sowie sämtliche B-Zell Lymphome keine TdT-Expressionsbande.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Expression von Rag; sowohl die Thymus-Kontrolle als auch sämtliche thymischen T-Zell Lymphome exprimierten Rag, wogegen keines der disseminierten Lymphome, hämatopoetischen Lymphome und B-Zell Lymphome (2 Ausnahmen) dieses Gen exprimierten.

Pax5 fand sich in keinem der thymischen T-Zell Lymphome, wurde jedoch von sämtlichen anderen untersuchten Lymphomen (sowie der Milz-Kontrolle) exprimiert.

In allen Lymphomen, ebenso wie in den Kontrollen war eine E2A-Expression erkennbar.

Die Gruppierung der beiden Subgruppen der T-Zell Lymphome (in DP und CD 8+ gegenüber DN und CD 4+), die bei den *Mlh1*-Lymphomtieren aufgrund ihres unterschiedlichen Expressionsprofils vorgenommen wurde, konnte auch bei dieser Mauspopulation durchgeführt werden (Abb. 2.2.2.1.c). Alle untersuchten doppelt

positiven (DP) und CD 8 einfach positiven (CD 8+) T-Zell Lymphome zeigten die Expression von Rag und (in der Mehrzahl) TdT, wogegen kein Pax5 in diesen Subgruppen exprimiert wurde (TdT+/Rag+/Pax5-). Sämtlichen doppelt negativen (DN) und CD 4 einfach positiven (CD 4+) T-Zell Lymphomen fehlte eine TdT- und Rag-Expression, exprimierten jedoch Pax5 (TdT-/Rag-/Pax5+).

Alle B-Zell Lymphome und hämatopoetischen Tumoren exprimierten Pax5 und waren in keinem Fall gleichzeitig TdT- und Rag-positiv.

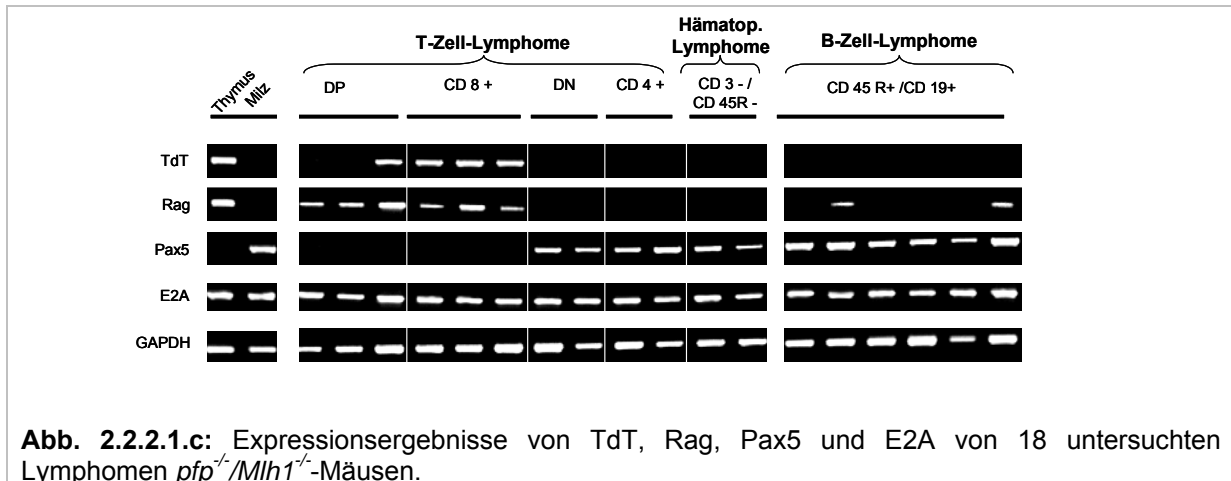


Abb. 2.2.2.1.c: Expressionsergebnisse von TdT, Rag, Pax5 und E2A von 18 untersuchten Lymphomen *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen.

2.2.2.2. Expression von MHC Klasse I-Molekülen und stressinduzierten Liganden bei Lymphomen der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere

MHC Klasse I-Molekülexpression: Die Expression von MHC Klasse I-Molekülen von insgesamt 23 Lymphomen wurde mittels FACS-Analyse durchgeführt, die Ergebnisse in Tabelle 2.2.2.2.a zusammengefasst. In allen B-Zell- und hämatopoetischen Lymphomen konnte auf der Zelloberfläche der Lymphome eine MHC Klasse I-Molekülexpression nachgewiesen werden. Eine fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression fand sich ausschließlich bei den T-Zell Lymphomen. Alle doppelt positiven und CD 8 einfach positiven T-Zell Lymphome waren MHC Klasse I-negativ, ebenso wie 25% der doppelt negativen und 50% der CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphome.

<i>Lymphomart</i>	<i>Anzahl [n]</i>	<i>MHC Klasse I positiv</i>	<i>MHC Klasse I negativ</i>	
B-Zell Lymphome	6	100%	0%	
T-Zell Lymphome	DP T-Zell Lymphome	5	0%	100%
	CD 8+ T-Zell Lymphome	3	0%	100%
	DN T-Zell Lymphome	4	75%	25%
	CD 4+ T-Zell Lymphome	2	50%	50%
hämatopoetische Lymphome	3	100%	0%	
Gesamt	23			

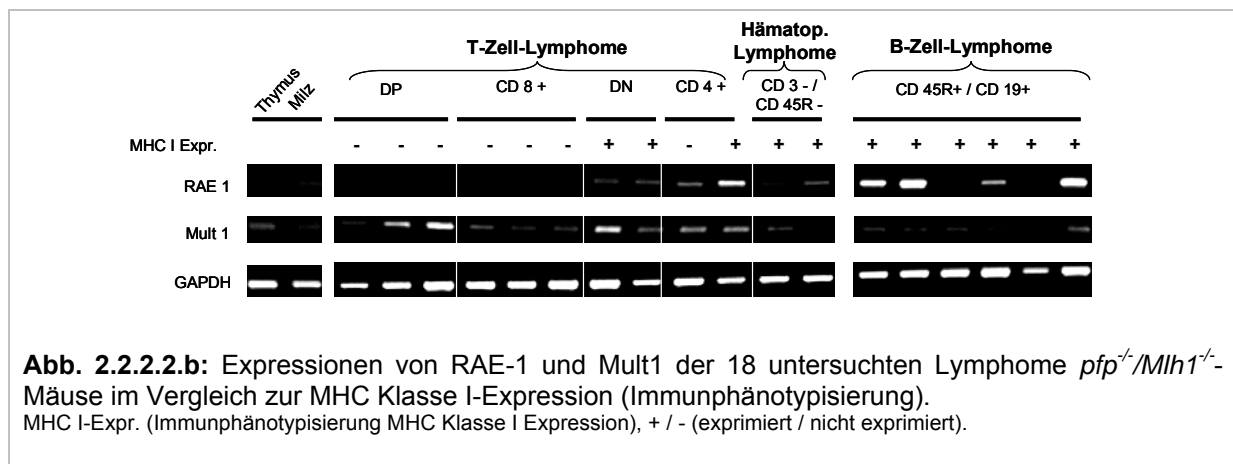
Tab. 2.2.2.2.a: MHC Klasse I Expression auf der Zelloberfläche von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Lymphomen. DN (doppelt negativ für CD 4 und CD 8), DP (doppelt positiv für CD 4 und CD 8); n.d. (nicht durchgeführt)

RAE-1- und Mult1-Expression der Lymphome: Die 18 Lymphome von *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäusen wurden auf die Expression der stressinduzierten Liganden RAE-1 und Mult 1 untersucht und mit der immunphänotypisch ermittelten MHC Klasse I-Molekülexpression verglichen (Abbildung 2.2.2.2.b). Als Kontrollen dienten ebenfalls die Thymus- und Milz-RNA wildtypischer Geschwistertiere.

Eine RAE-1-Expression ließ sich bei allen disseminierten T-Zell Lymphomen (4 von 4), einem hämatopoetischen Lymphom (1 von 2) und der Mehrzahl B-Zell Lymphomen (4 von 6) nachweisen. Keines der 6 untersuchten thymischen T-Zell Lymphome exprimierte RAE-1.

Der Vergleich der MHC I-Expression (aus der Immunphänotypisierung) zeigte, dass die fehlende RAE-1-Expression in Lymphomen mit einer fehlenden einer MHC Klasse I-Molekülexpression einherging. Die einzige Ausnahme bildete ein CD 4 einfach positives T-Zell Lymphom, das trotz fehlender MHC Klasse I-Expression eine schwache Expressionsbande für RAE-1 zeigte. Sämtliche hämatopoetischen Tumoren und B-Zell Lymphome exprimierten MHC Klasse I-Moleküle und verhielten sich hinsichtlich der RAE-1-Expression divergent.

Eine Mult1-Expression lag in der Mehrzahl der Lymphome vor, die CD 8 einfach positiven T-Zell Lymphome, die B-Zell Lymphome und die hämatopoetischen Tumoren waren jedoch nur schwache Expressionsbanden sichtbar. Hinsichtlich ihrer Intensität unterschieden sich diese kaum von denen der Wildtypkontrolle.



In der tabellarischen Übersicht (Tabelle 2.2.2.2.c) erkennt man ebenfalls die fehlende RAE-1-Expression der doppelt positiven (DP) und CD 8 einfach positiven (CD 8+) T-Zell Lymphomen gegenüber den anderen T-Zell Lymphomen (DN und CD 4+).

Bei den B-Zell Lymphomen fehlte in 33% der Fälle die RAE-1-Expression, wogegen von den hämatopoetischen Lymphomen nur eines (von 2 Fällen) kein RAE-1 exprimierte.

Eine Mult1 Expression konnte bei der Mehrzahl aller T-Zell Lymphome (eine Ausnahme) nachgewiesen werden. 33% der B-Zell Lymphome und 50% der hämatopoetischen Lymphome exprimierten kein Mult1.

<i>Lymphomart</i>	<i>Anzahl</i> (<i>n</i>)	<i>RAE 1</i>	<i>Mult 1</i>
		<i>exprimiert</i>	
DP T-Zell-Lymphom	3	0%	100%
CD 8+ Lymphom	3	0%	100%
DN T-Zell-Lymphom	2	100%	100%
CD 4+ Lymphom	2	100%	100%
B-Zell-Lymphom	6	67%	67%
CD3- CD45R-	2	50%	50%

Tab. 2.2.2.2.c: Verhältnis der Expressionsergebnisse MHC Klasse I-ähnlicher Moleküle (RAE-1 und Mult1) in 18 untersuchten Lymphomen von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen.
n (Anzahl der untersuchten Lymphome je Subgruppe).

Verglichen zu den gewonnenen Erkenntnissen aus der *Mlh1*^{-/-}-Mauspopulation ähnelten die in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen untersuchten Lymphome denen der *Mlh1*^{-/-}-Tiere. Die thymischen (Rag+/TdT+/Pax5-) T-Zell Lymphome besaßen keine MHC Klasse I-Expression und exprimierten kein RAE-1. Dagegen exprimierten die disseminierten (Rag-/TdT-/Pax5+) T-Zell Lymphome, die B-Zell Lymphome und die hämatopoetischen Lymphome zumeist MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche und RAE-1 auf transkriptioneller Ebene.

2.3. Tumorgenese in $pfp^{-/-}/\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren

Um die gewonnenen Erkenntnisse aus den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - und $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mausmodellen zu verifizieren wurde Perforin-Defizienz ($pfp^{-/-}$) in $\beta 2m/Mlh1$ doppelt defiziente Mäuse ($\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$) eingekreuzt. Die perforin-vermittelte Zielzellyse ist ein Haupt-Abwehrmechanismus von cytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen bei der Eliminierung von –als fremd/pathologisch erkannten- Zielzellen.

2.3.1. Tumorinzidenz und Überlebenskurven

Ausgehend von der $Mlh1$ defizienten Mauslinie wurden $\beta 2$ Mikroglobulin- und Perforin-Defizienz eingekreuzt. Insgesamt konnten 29 $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$, 32 $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{+/+}$ -Tiere über einen Zeitraum von 15 Monaten beobachtet werden. Als Kontrollgruppen dienten 32 $pfp^{-/-}/Mlh1^{+/+}/\beta 2m^{+/+}$ -, 21 $pfp^{+/+}/Mlh1^{+/+}/\beta 2m^{+/+}$ -, 38 $pfp^{-/-}/Mlh1^{+/+}/\beta 2m^{-/-}$ - und 12 $pfp^{+/+}/Mlh1^{+/+}/\beta 2m^{-/-}$ -Tiere.

Alle $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Tiere erkrankten innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Sie wurden in einer Überlebenskurve (Abb. 2.3.1.a) den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren vergleichend gegenübergestellt.

Ein früheres Erkranken der $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Tiere gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren war beim Vergleich der Überlebenskurven erkennbar.

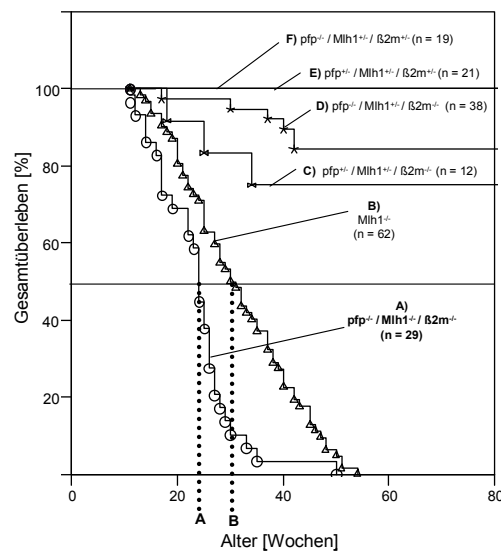


Abb. 2.3.1.a: Gegenüberstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven von **A:** 29 $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen (\circ) und **B:** 62 $Mlh1^{-/-}$ -Tieren (Δ). **C-F** Kontrollgruppen.

Gestrichelte Linien: 50%-Überleben der $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Mäuse (**A**) und der $Mlh1^{-/-}$ -Tiere (**B**)

Sämtliche erkrankten Tiere wurden schmerzlos getötet und auf ihre Erkrankungsursache und ebenso wie die vorangegangenen Mausmodelle untersucht. Alle Tiere entwickelten gastrointestinale und/oder lymphoide Tumoren. Tabelle 2.3.1.b zeigte, dass in den beiden Perforin/ $Mlh1$ defizienten Mauspopulationen in der

Mehrzahl Lymphome oder beide Tumorarten (Lymphome und Gastrointestinaltumoren in ein und demselben Tier) auftraten. Sowohl in den $pdf^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ - als auch den $pdf^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen erkrankten über 80% der Tiere an der Ausbildung von Lymphomen.

Tumorart	$pdf^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ (n = 29)	$pdf^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 32)	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 38)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Gastrointestinale Tumoren	10,4 %	18,8 %	47,4%	43,5%
Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	17,2 %	28,1 %	31,6%	13,0%
Lymphoide Tumoren	72,4 %	53,1 %	21,0%	43,5%

Tab. 2.3.1.b: Prozentuale Verteilung von Lymphomen und Gastrointestinaltumoren in $pdf^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ - Mäusen verglichen mit $pdf^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{+/+}$ -, $Mlh1^{-/-}$ - und $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren.
n (Anzahl der untersuchten Tiere).

Bei den $pdf^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Tieren (Abb. 2.3.1.c) war eine beschleunigte Entwicklung von Gastrointestinaltumoren nachweisbar. Das zeitliche Auftreten von Tieren, die an Lymphomen erkrankten, war weitestgehend unverändert gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren.

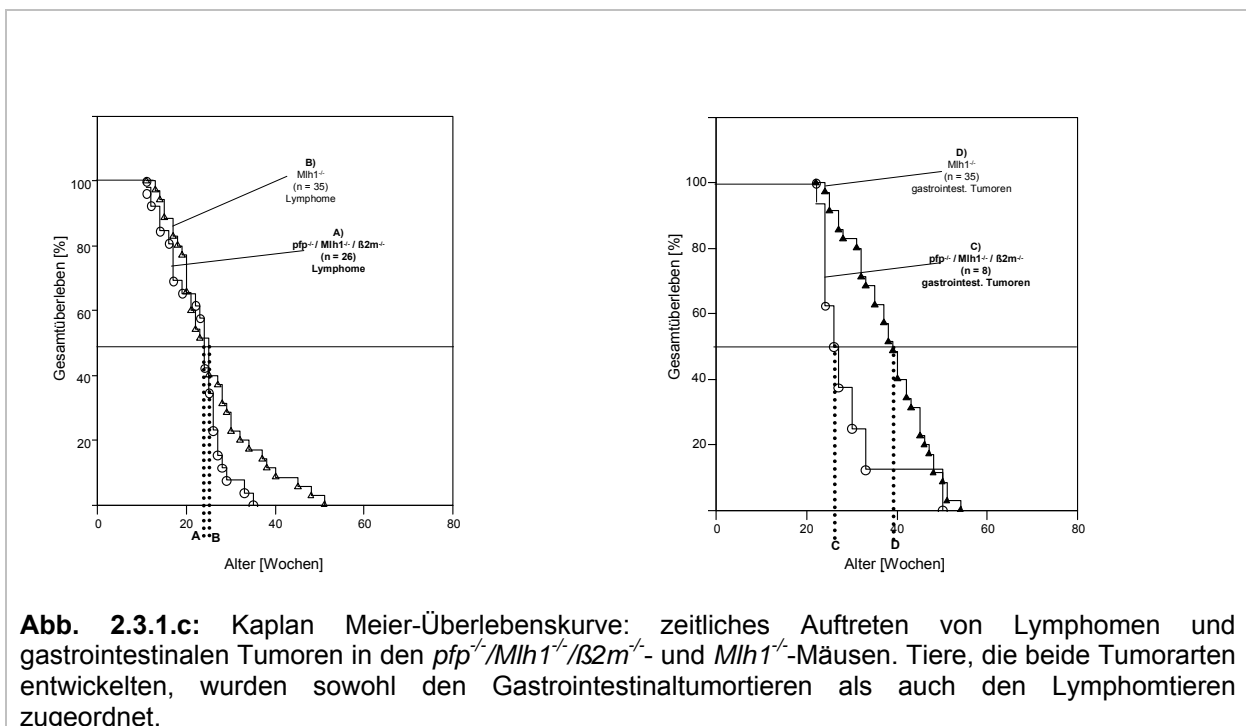
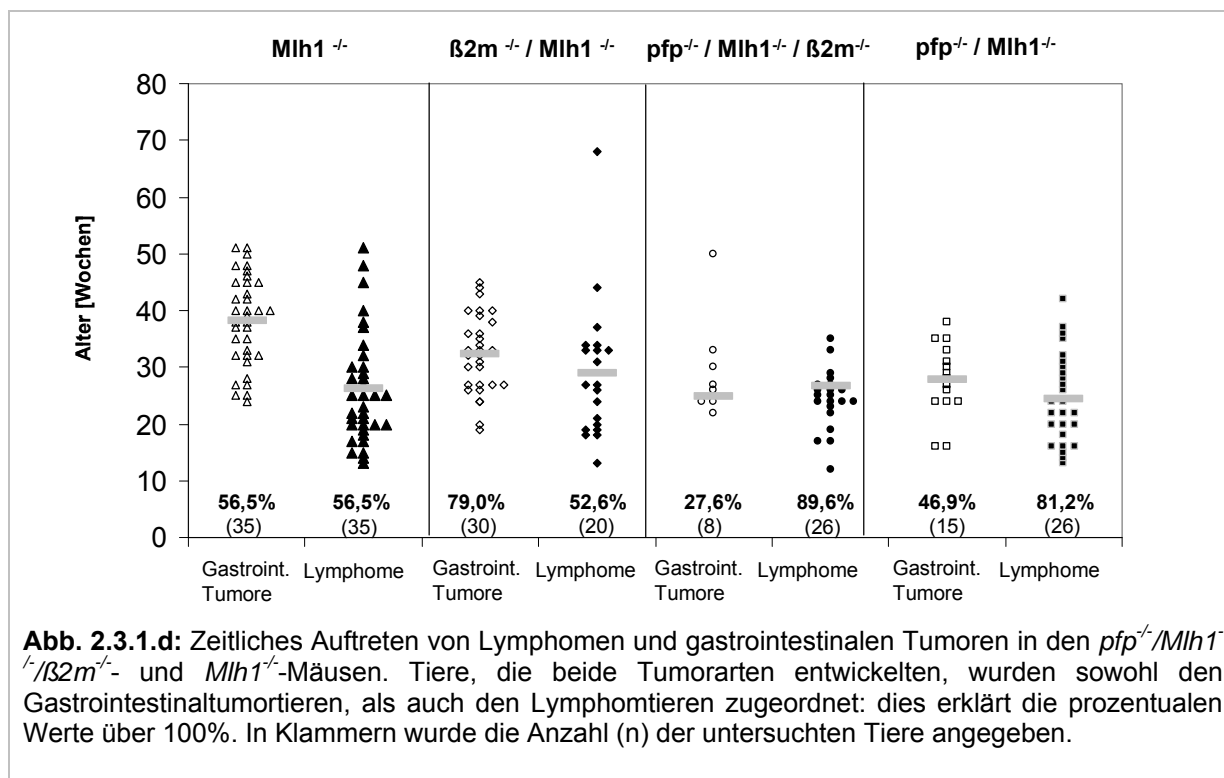


Abb. 2.3.1.c: Kaplan Meier-Überlebenskurve: zeitliches Auftreten von Lymphomen und gastrointestinalen Tumoren in den $pdf^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ - und $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen. Tiere, die beide Tumorarten entwickelten, wurden sowohl den Gastrointestinaltumortieren als auch den Lymphomtieren zugeordnet.

Der direkte Vergleich des Auftretens von Gastrointestinaltumoren und Lymphomen in den verschiedenen Mauslinien (Abbildung 2.3.1.d) zeigte, dass in beiden perforin defizienten Mauslinien vermehrt lymphoide Tumoren auftraten. Das zeitliche Auftreten der Lymphomereignisse erschien jedoch unverändert.

Die Gastrointestinaltumorentstehung in den perforin defizienten Tieren fand also früher als bei den $Mlh1$ defizienten und $Mlh1^{-/-}/\beta 2m$ doppelt-defizienten Mäusen statt.



Während es in den $\beta2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen zu einer Reduktion in der Anzahl an Lymphom-Mäusen kam, trat diese Gruppe in den $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - aber auch in den $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta2m^{-/-}$ -Tieren stark vermehrt auf.

Aus Tabelle 2.3.1.e wurde ersichtlich, dass deutlich weniger Tiere als bei den $\beta2m/Mlh1$ - und $Mlh1$ -Populationen älter als 30 Wochen wurden. Die Mehrzahl aller Mäuse stellten mit 96% die Gruppen der Doppelereignis- und Lymphomtiere „innerhalb der ersten 30 Wochen erkrankt“ dar. Neben der Erhöhung in der Anzahl der lymphomausbildenden Tiere war auch die beschleunigte Gastrointestinaltumorentwicklung bei perforindefizienten Tieren erkennbar.

Überleben	Tumorart	$pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta2m^{-/-}$ (n = 29)	$pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 32)	$\beta2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 38)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Jünger als 30 Wochen	Gastrointestinale Tumoren	4,0 %	9,5 %	26,7 %	13,0 %
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	16,0 %	33,3 %	40,0 %	6,0 %
	Lymphoide Tumoren	80,0 %	57,1 %	33,3 %	81,0 %
		86,2 %	65,6 %	39,5 %	46,8 %
Älter (gleich) als 30 Wochen)	Gastrointestinale Tumoren	50,0 %	36,4 %	60,9 %	74,0 %
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	25,0 %	18,2 %	26,1 %	19,0 %
	Lymphoide Tumoren	25,0 %	45,5 %	13,0 %	7,0 %
		13,8 %	34,4 %	60,5 %	53,2 %

Tab. 2.3.1.e: Einteilung der Gesamtpopulationen $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta2m^{-/-}$ - und $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere verglichen mit den $Mlh1^{-/-}$ - und $\beta2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen nach dem Erkrankungszeitpunkt: Tiere, die innerhalb der ersten 30 Wochen und solche, die nach 30 Wochen erkrankten. Die Mehrzahl in den $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta2m^{-/-}$ - und $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - Gruppen erkrankten innerhalb der ersten 30 Wochen, wogegen die Mehrzahl der $Mlh1^{-/-}$ - und der $\beta2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere älter als 30 Wochen wurden.

Alle in die Untersuchung eingegangenen Tiere der 29 $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -, 32 $pfp^{-}/Mlh1^{-}$ -Populationen wurden in den folgenden Tabellen (Tab. 9,10 und 11 im Anhang) aufgelistet. Von den $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Tieren wiesen 3 gastrointestinale und 21 lymphoide Tumoren auf. 5 Tiere entwickelten beide Tumorarten (gastrointestinale und lymphoide Tumoren).

2.3.2. Charakterisierung der Lymphome in $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Mäusen

Bei den $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Tieren ließ sich ein gehäuftes Auftreten lymphoider Tumoren feststellen. Die Lymphome wurden, wie bei den vorangegangenen Genotypen, auf morphologischer und molekularer Ebene charakterisiert. Die Verteilung der einzelnen Lymphomarten aber auch die Organlokalisierung der Tumoren war hierbei von besonderem Interesse. Die Ergebnisse wurden denen der $Mlh1^{-}$ -Tiere, der $pfp^{-}/Mlh1^{-}$ - und der $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren vergleichend gegenübergestellt.

Morphologie der lymphatischen Organe: Neoplastisch veränderte lymphatische Organe waren (ebenso wie bei den zuvor untersuchten anderen Genotypen auch) der Thymus, die Milz und die Lymphknoten. Von 26 Tieren mit Neoplasien war bei 14 der Tiere der Thymus bis zu 10-15 fach vergrößert (thymische Lymphome), in 12 Fällen waren nur Milz und/oder Lymphknoten vergrößert (disseminierte Lymphome). Auffällig war bei den $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Tieren, dass bei 8 der 14 Tiere mit vergrößerten Thymi die peripheren lymphatischen Organe (wie Milz und/oder Lymphknoten) ebenfalls neoplastisch vergrößert waren. Im Thymus entwickelte Lymphome besaßen also bei Tieren mit diesem Genotyp offensichtlich die Möglichkeit, verstärkt in die Peripherie (Milz und/oder Lymphknoten) zu disseminieren.

Histologisch konnten in den neoplastisch veränderten lymphatischen Organen Non Hodgkin-Lymphome, also lymphoblastische Lymphome vom B- oder T-Zelltyp nachgewiesen werden.

Immunphänotypisierung der Lymphome: Insgesamt wurden 23 $pfp^{-}/Mlh1^{-}$ -Tiere immunphänotypisch charakterisiert und die Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 2.3.2.a dargestellt. Es fanden sich in den $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Tieren CD 3+ T-Zell-, CD 45R+ B-Zell- und hämatopoetische Lymphome (CD 24+, CD 45+ oder TER+). Von den 24 $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Lymphomen waren insgesamt 13 T-Zell Lymphome, 5 hämatopoetische Lymphome und 6 B-Zell Lymphome (siehe Tabelle 10 im Anhang).

Die T-Zell Lymphome konnten durch Verwendung der Antikörper für die Co-Rezeptoren CD 4 und CD 8 in doppelt positive (7 von 13), CD 8 einfach positive (4 von 13), doppelt negative (1 von 13), sowie CD 4 einfach positive (1 von 13) T-Zell Lymphome subgruppiert werden. Einige der T-Zell Lymphome wiesen eine intermediäre Expression von CD 3 auf (5 von 13). Ebenso ließen sich durch Ig D- und Ig-M-Antikörper die B-Zell Lymphome subklassifizieren. Alle B-Zell Lymphome waren Immunglobulin D-negativ und nur eines von ihnen exprimierte Immunglobulin M auf der Zelloberfläche.

In Tabelle 2.3.2.a wurde die prozentuale Verteilung der untersuchten Lymphomgruppen der $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Tieren den $Mlh1^{-}$ -, $pfp^{-}/Mlh1^{-}$ - und $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren gegenübergestellt. Mit einem Anteil von 54,2% T-Zell Lymphomen,

25% B-Zell Lymphomen und 20,8% hämatopoetischen glichen diese Obergruppen-Verteilungen weitestgehend denen der anderen Genotypen ($Mlh1^{-/-}$, $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ und $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere).

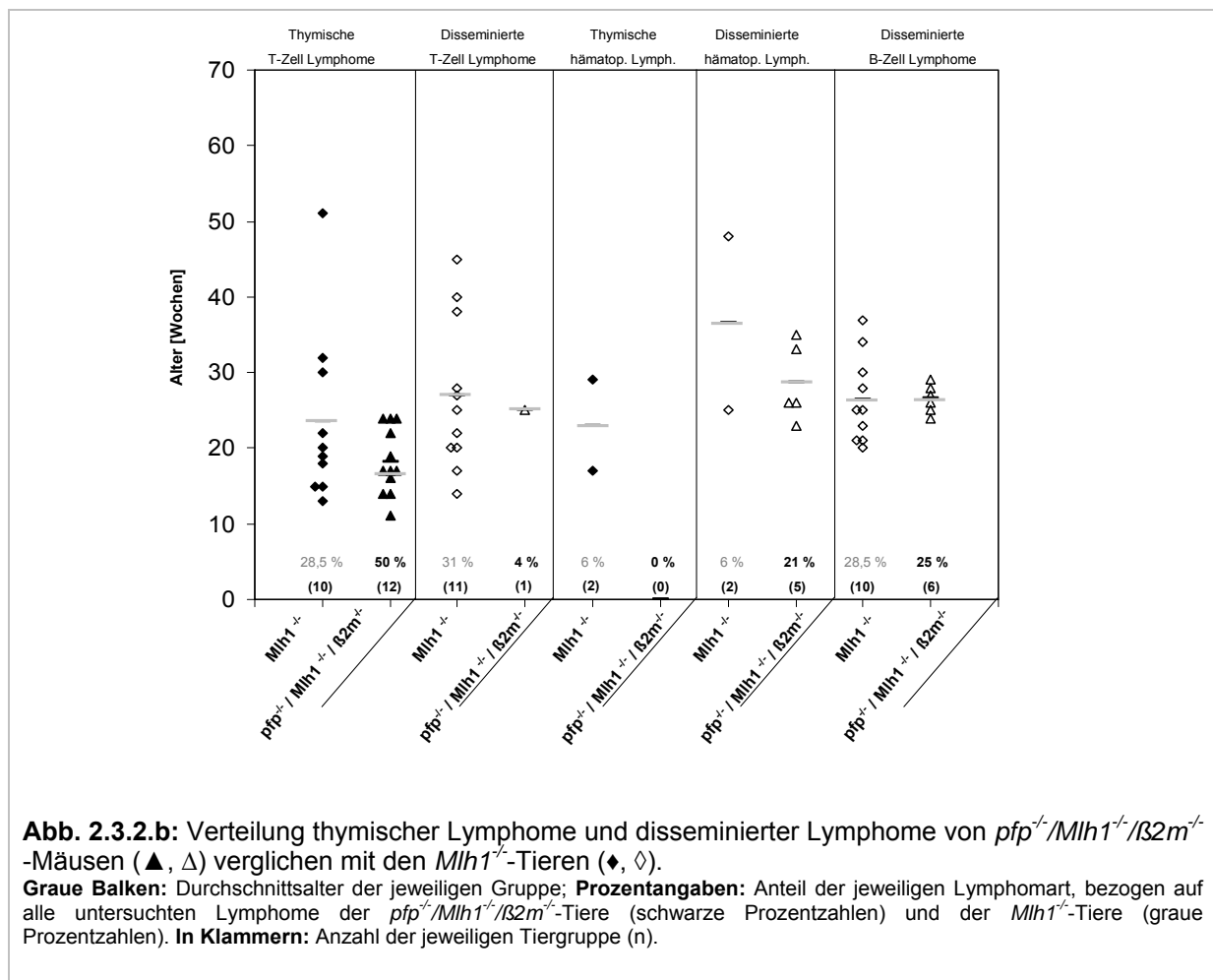
Die Betrachtung der Gruppe der T-Zell Lymphome ließ eine Reduktion in der Anzahl der doppelt negativen (DN) und CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphome erkennen. Ihr Anteil lag bei den $pfp^{-/-}/\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren bei 8,2 %, der bei den $Mlh1^{-/-}$ -Lymphomtieren 32,3% ausmachte. Eine Reduktion der doppelt negativen (DN) und CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphome war mit 15,8% auch bei den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren erkennbar.

Lymphomart	Immunphänotypisierung	$pfp^{-/-}/\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 24)	$pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 23)	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 18)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 34)
B-Zell-Lymphome	CD 45R+ IgD- IgM -	20,8%	26,1%	16,67%	11,8%
	CD 45R+ IgD- IgM+	4,2%	-	5,6%	14,7%
T-Zell-Lymphome	DP: CD 4+ CD 8+ CD 3+	29,1%	21,7%	33,3%	14,7%
	CD 8+: CD 4- CD 8+ CD 3+	16,7%	13,0%	16,67%	14,7%
	DN: CD 4- CD 8- CD 3+	4,2%	17,4%	-	14,7%
	CD 4+: CD 4+ CD 8- CD 3+	4,2%	8,7%	16,67%	17,6%
Hämatop. Lymphome	CD 24+ CD 45R - CD 3-	20,8%	13,0%	11,1%	11,8%

Tab. 2.3.2.a: Zusammenfassung der Immunphänotypisierung von $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ - und $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - und $Mlh1^{-/-}$ -Tieren. Auffällig war die Reduktion der Anzahl an der doppelt negativen und CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphomen gegenüber den $Mlh1$ defizienten Mäusen.

Lokalisation der Lymphome: Bei den $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Mäusen (Abb. 2.3.2.b) ließen sich fast alle T-Zell Lymphome im Thymus der Mäuse nachweisen, nur bei einem T-Zell Lymphom war der Thymus unauffällig (disseminiertes Lymphom). Die hämatopoetischen Lymphome und die B-Zell Lymphome entwickelten sich in der Peripherie, d.h. in Milz und/oder den Lymphknoten.

Das zeitliche Auftreten der Lymphome im Vergleich zu dem $Mlh1$ defizienter Tieren (Abb. 2.3.2.b) war in den T-Zell Lymphomen und den hämatopoetischen Lymphomen beschleunigt. Lediglich die Entstehung der B-Zell Lymphome erschien unverändert gegenüber den $Mlh1$ defizienten Mäusen.



Entsprechend der bereits vorliegenden Daten aus den vorangegangenen Mausmodellen, handelte es sich nur bei den doppelt positiven oder CD 8 einfach positiven T-Zell Lymphomen um thymische T-Zell Lymphome. In den $pfp^{-}/Mlh1^{-}/\beta 2m^{-}$ -Mäusen ließ sich nur ein disseminiertes T-Zell Lymphom nachweisen, die restlichen CD 4 einfach positiven und doppelt negativen T-Zell Lymphome waren im Thymus lokalisiert, so dass auch diese als thymische T-Zell Lymphome eingestuft werden konnten. Betrachtete man das zeitliche Auftreten der thymischen T-Zell Lymphome im Vergleich zu den $Mlh1^{-}$ -Mäusen, ließ sich ein früheres Auftreten der Gruppe der thymischen T-Zell Lymphome und der disseminierten hämatopoetischen Lymphome feststellen.

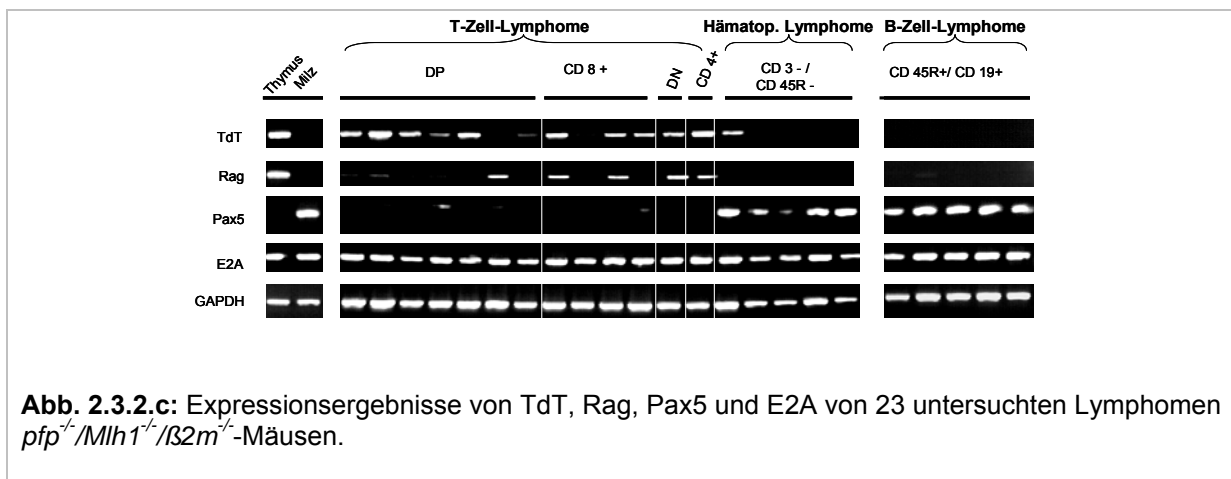
Genexpressionsprofile der Lymphome anhand von Differenzierungsmarkern:

Wie gezeigt, waren die Lymphome *Mlh1* defizienter Mäuse durch die Expression von TdT, Rag, Pax5 und E2A (auf transkriptioneller Ebene mittels RT-PCR) weiter unterteilbar. Daher wurden diese Genexpressionsanalysen auch bei den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}/*β2m*^{-/-}-Lymphomen durchgeführt.

Von den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}/*β2m*^{-/-}-Tieren wurden 13 T-Zell Lymphome (darunter 7 doppelt positive, 4 CD 8 einfach positive, 1 doppelt negatives und 1 CD 4 einfach positives T-Zell Lymphom), 5 B-Zell Lymphome und 5 hämatopoetische Lymphome untersucht. Als Kontrollen dienten Thymus- und Milz-Isolate von wildtypischen Geschwistertieren. GAPDH wurde als Referenz-Gen (housekeeping-gene) verwendet. Alle Genexpressionsergebnisse der Lymphome von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}/*β2m*^{-/-}-Mäusen wurden im Anhang in Tabelle 11 dargestellt.

Die Abbildung 2.3.2.c zeigte, dass alle B-Zell Lymphome und die hämatopoetischen Lymphome Pax5 exprimierten und (mit Ausnahme eines hämatopoetischen Lymphomes mit zusätzlicher TdT-Expression) keine Expression von TdT und Rag aufwiesen. In den untersuchten T-Zell Lymphomen fehlte (abgesehen von einem doppelt positiven und einem CD 8 einfach positiven T-Zell Lymphom) eine Pax5-Expression. 9 der 11 untersuchten T-Zell Lymphome exprimierten dagegen TdT. Eine Rag-Expressionsbande fand sich in 6 der 11 untersuchten T-Zell Lymphome. Alle untersuchten T-Zell-, B-Zell- und hämatopoetischen Lymphome exprimierten, wie auch die Thymus- und die Milzkontrolle E2A.

Die Genexpressionsergebnisse deuteten darauf hin, dass sich fast alle untersuchten *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}/*β2m*^{-/-}-Lymphome aus unreifen/frühen Lymphozyten entwickelt haben. Lediglich ein CD 8 einfach positives T-Zell Lymphom ließ sich mit den verwendeten Markern nicht eingrenzen, es zeigte keine Genexpression von TdT, Rag oder Pax5.



T-Zell Lymphome: Nur ein CD 8+ T-Zell Lymphom exprimierte weder TdT, Rag oder Pax5, alle anderen Lymphome waren TdT- und/oder Rag-negativ, bei gleichzeitig fehlender Expression von Pax5. Diese in den *Mlh1*^{-/-}-T-Zell Lymphomen stark vertretene Gruppe der disseminierten TdT-/Rag-/Pax5+ Lymphome kamen in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}/*β2m*^{-/-}-Tieren nicht vor.

2.3.3. Expression von MHC I und streßinduzierten NK-Zell aktivierenden Liganden in *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/β2m^{-/-}*-Lymphomen

Aus den vorangegangenen Untersuchungen wurde ersichtlich, dass die *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/β2m^{-/-}*-Population eine erhöhte Anzahl an Lymphomtieren aufwies.

Trotz fehlender cytotoxischer T-Zellen und der zusätzlichen Perforin-Defizienz in den *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/β2m^{-/-}*-Mäusen kam es zu einer Reduktion in der Anzahl an disseminierten T-Zell Lymphomen. Lediglich ein disseminiertes (doppelt positives) T-Zell Lymphom war nachweisbar, dieses wies jedoch nicht das, für diese Gruppe typische Expressionsmuster (TdT-/Rag-/Pax5+), auf. Fast alle T-Zell Lymphome waren im Thymus lokalisiert und exprimierten TdT und/oder Rag, bei gleichzeitiger Abwesenheit von Pax5.

Um herauszufinden warum es zu dieser Reduktion in den disseminierten doppelt negativen und CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphomen kam, wurden die MHC Klasse I-Molekülexpression und die Expression streßinduzierter NK-Zell aktivierender Liganden untersucht.

MHC Klasse I-ähnliche Moleküle: Obwohl die *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/β2m^{-/-}*-Mäuse aufgrund ihrer β2Mikroglobulin-Defizienz keine MHC Klasse I-Moleküle exprimieren können, wurde die MHC Klasse I-Molekülexpression auf der Oberfläche der Lymphomzellen immunphänotypisch untersucht. Von 24 der so getesteten Lymphome exprimierte (wie erwartet) keines MHC Klasse I-Oberflächenmoleküle (Tabelle 11 im Anhang). Hierdurch ließ sich bestätigen, dass die β2Mikroglobulin-Defizienz zum vollständigen Verlust der MHC Klasse I-Molekülexpression führt.

RAE-1 und Mult1-Expression der Lymphome: Die Abbildung 2.3.3.a zeigt, dass keines der T-Zell Lymphome ebenso wie die Thymus- und Milz-Wildtypkontrollen RAE-1, exprimierte. Lediglich in 2 von 5 hämatopoetischen Tumoren sowie 2 von 5 B-Zell Lymphomen war eine deutliche RAE-1-Expression (Abbildung 3.2.3.a. und Tabelle 3.2.3.b) erkennbar.

Mult1-Expression fand sich in fast allen Lymphomgruppen, besonders die doppelt positiven (DP) und die CD 8 einfach positiven T-Zell Lymphome und die B-Zell Lymphome exprimierten dieses Gen. Allerdings fand sich sowohl in der Wildtyp-Kontrolle des Thymus und der Milz eine schwache Mult1-Expressionsbande, so dass diese Ergebnisse in den Lymphomen nur eine begrenzte Aussagekraft haben.

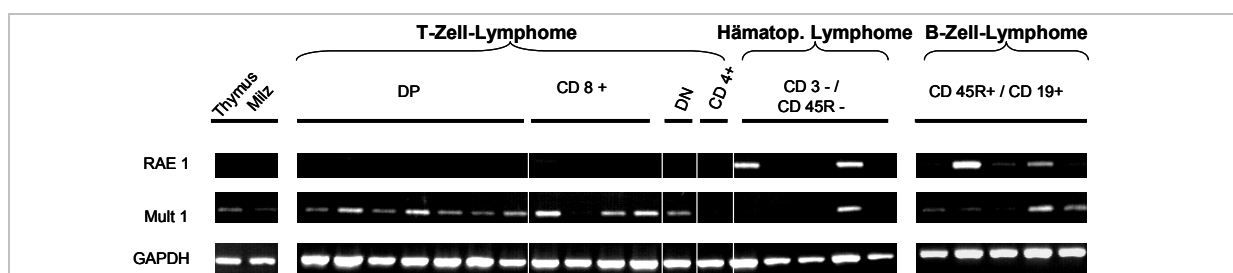


Abb. 2.3.3.a: Expressionen von RAE-1 und Mult1 der 23 untersuchten Lymphome *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/β2m^{-/-}*-Mäuse. Keines der T-Zell Lymphome exprimierte RAE-1, in den Gruppen der B-Zell Lymphome und hämatopoetischen Lymphome waren jeweils zwei RAE-1 positive Lymphome nachweisbar.

<i>Lymphomart</i>	<i>Anzahl</i>	<i>RAE 1</i>	<i>Mult 1</i>
	<i>(n)</i>	<i>exprimiert</i>	
DP T-Zell-Lymphom	7	0%	100%
CD 8+ Lymphom	4	0%	75%
DN T-Zell-Lymphom	1	0%	100%
CD 4+ Lymphom	1	0%	0%
B-Zell-Lymphom	5	60%	80%
CD3- CD45R-	5	40%	20%

Tab. 2.3.3.b: Verhältnis der Expressionsergebnisse von RAE-1 und Mult1 bei den 23 Lymphomen $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Mäuse. Keines der getesteten T-Zell Lymphome exprimierte RAE-1.
n (Anzahl der untersuchten Lymphome je Subgruppe).

2.4. Tumorgenese in $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren

Ein weiteres Modell mit dem sich der Einfluß des Immunsystems auf die Erkennung und die Abwehr von Tumoren in MMR-defizienten Mäusen untersuchen ließ, waren die $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse. $Rag^{-/-}$ -Mäuse entwickeln keine reifen T- und B-Lymphozyten, ihr Immunsystem ist demzufolge funktionell stark eingeschränkt. Durch Einkreuzen Rag defizienter Tiere in die $Mlh1^{-/-}$ -Mauslinie, liegt bei den $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren, neben dem Tumorprädispositionsphänotyp eine zusätzliche Immundefizienz vor. Spielt die Erkennung und Abwehr von $Mlh1^{-/-}$ -Tumoren durch das Immunsystem eine Rolle, wäre eine beschleunigte Tumorgenese in den $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren zu erwarten.

2.4.1. Tumorzinzidenz und Überlebenskurven

Insgesamt wurden 42 $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -defiziente Mäuse über einen Zeitraum von 13 Monaten beobachtet. Als Kontrollgruppen dienten 22 $Rag^{-/-}/Mlh1^{+/+}$ -Tiere sowie 28 $Rag^{+/+}/Mlh1^{+/+}$ -Mäuse.

Alle 42 $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere erkrankten innerhalb der ersten 42 Wochen (Abb. 2.4.1.a). Die Sektion der erkrankten Tiere zeigte, dass alle Tumoren entwickelten (es wurden gastrointestinale, lymphoide- oder Hauttumoren gefunden). Eine Gesamtübersicht aller Tiere befindet sich im Anhang (Tabelle 16).

Tiere der $Rag^{-/-}/Mlh1^{+/+}$ -Kontrollgruppe entwickelten zum Teil eitrig Abszesse, was sich durch die Abwesenheit eines intakten (adaptiven) Immunsystems erklären lässt und für diesen Genotyp bereits beschrieben wurde.

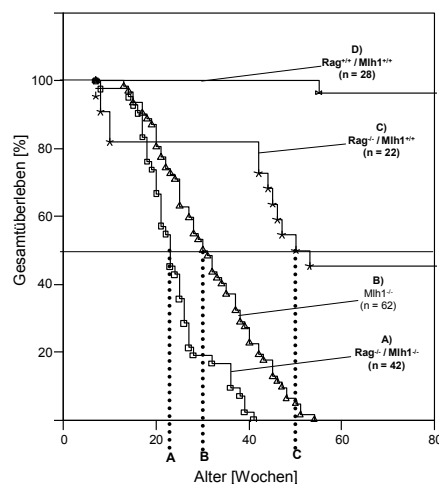
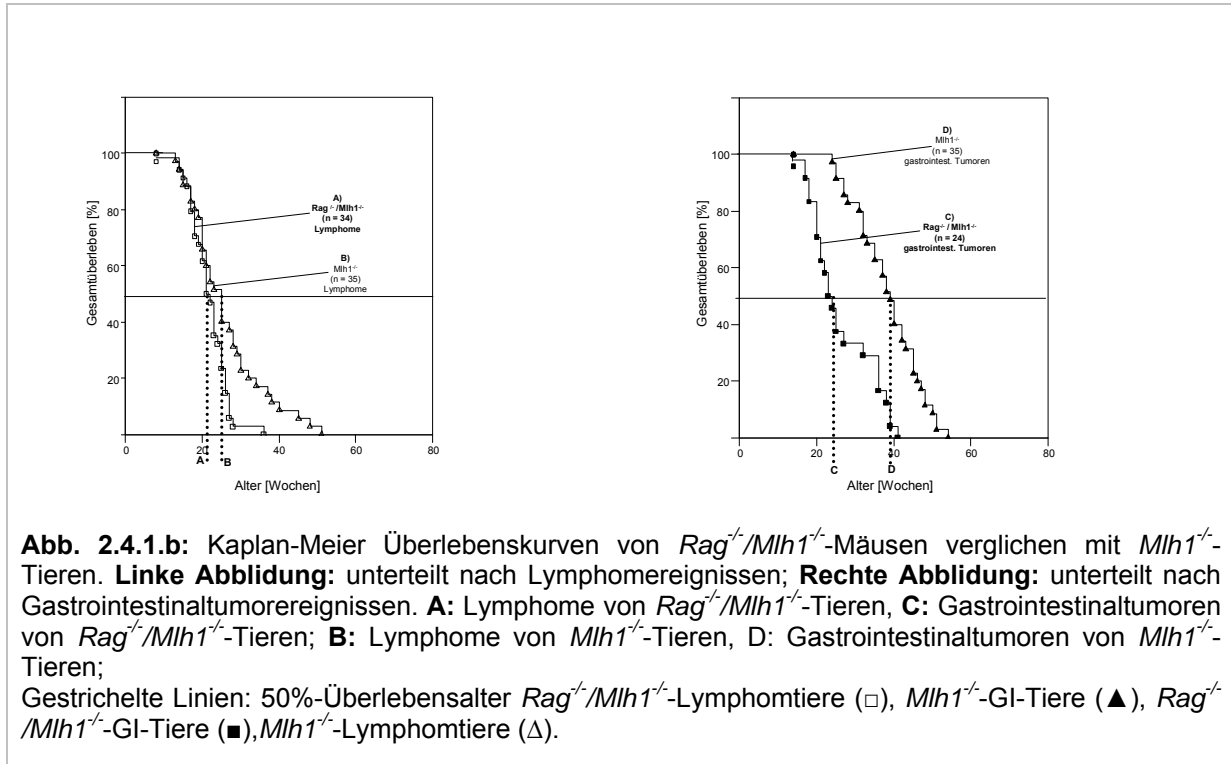


Abb. 2.4.1.a: Kaplan-Meier Überlebenskurve von $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen (ohne die unklaren Fälle) verglichen mit $Mlh1$ homozygoten Tieren, sowie $Rag^{-/-}/Mlh1^{+/+}$ - und $Rag^{+/+}/Mlh1^{+/+}$ -Tieren als Kontrollgruppen.

Die gesamte $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Population erkrankte innerhalb von 42 Wochen, wesentlich früher als die $Mlh1^{-/-}$ -Population mit 55 Wochen. (\square : $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$)($*$: $Rag^{-/-}$)(Δ : $Mlh1^{-/-}$)

Die vergleichenden Überlebenskurven (Abb. 2.4.1.b) unterteilt die $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ - und die $Mlh1^{-/-}$ -Populationen nach der Art der aufgetretenen Tumorereignisse (Lymphom oder Gastrointestinaltumor). An Lymphomen erkrankte $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse wiesen häufig eine Paralyse der Hinterbeine auf, was durch eine massive Infiltration lymphoider Tumorzellen im Bereich der Wirbelsäule erklären ließ (siehe histologische Befundung). Dieser Phänotyp war in keinem der erkrankten Tiere der $Mlh1^{-/-}$ -Populationen feststellbar.



Vergleich man das Tumorspektrum der $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere mit dem der $Mlh1^{-/-}$ -Mäuse war eine deutliche Reduktion in der Anzahl der Tiere mit gastrointestinalen Tumoren feststellbar (Tab. 2.4.1.c). Das Verhältnis der lymphomausbildenden Tiere ähnelt mit 43,5% dem der der $Mlh1^{-/-}$ -Population (45,2 %). Einen auffällig starken Anstieg ließ sich in der Gruppe der Tiere, die beide Tumorereignisse (gastrointestinale und lymphoide Tumoren) entwickelten, verzeichnen. 35,7% aller $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse entwickelten gastrointestinale Tumore und Lymphome, bei den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen lag der Anteil bei 13,0 %.

Tumorart	$Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 42)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Gastrointestinale Tumoren	19,1%	43,5%
Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	35,7%	13,0%
Lymphoide Tumoren	45,2%	43,5%

Tab. 2.4.1.c: Prozentuale Verteilung von Tumorereignissen in $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen, verglichen mit $Mlh1^{-/-}$ -Tieren.

Der Anteil an Tieren mit ausschließlich gastrointestinalen Tumoren ist bei den $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen niedriger. Die Anzahl der Tiere mit beiden Tumorarten (gastrointestinale und lymphoide Tumoren) war verglichen zu den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren erhöht.

2.4.1.1. Unterteilung des Gesamtüberlebens nach dem zeitlichen Auftreten der Tumorereignisse

Tabelle 2.4.1.1.a zeigt, dass 81% der gesamten $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Population innerhalb der ersten 30 Wochen erkrankten, wogegen bei den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren der Anteil bei 46,8% lag. Um herauszufinden, worin sich das frühere Erkranken bei den $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren begründet, wurde (neben der Tumorart) eine Unterteilung nach dem Erkrankungszeitpunkt in (i) Tiere, die älter als 30 Wochen und (ii) Tiere, die innerhalb der ersten 30 Wochen erkrankten, vorgenommen (Tab. 2.4.1.1.a). Von der Gesamtpopulation entwickelten 44,1 % der $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tiere beide Tumorarten innerhalb der ersten 30 Wochen. Diese Gruppe war damit deutlich, gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren mit 6,9%, erhöht.

Überleben	Tumorart	$Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ (n = 42)	$Mlh1^{-/-}$ (n = 62)
Jünger als 30 Wochen	Gastrointestinale Tumoren	2,9%	13,0%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	44,1%	6,0%
	Lymphoide Tumoren	53,0%	81,0%
		81,0%	46,8%
Älter (gleich) als 30 Wochen	Gastrointestinale Tumoren	87,5%	74,0%
	Gastrointestinale Tumoren und lymphoide Tumoren	12,5%	19,0%
	Lymphoide Tumoren	0,0%	7,0%
		19,0%	53,2%

Tab. 2.4.1.1.a: Verteilung von Tumorereignissen in $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen verglichen mit $Mlh1$ homozygoten Tieren unterteilt in Tiere, die innerhalb der ersten 30 Wochen erkrankten und solche, die älter als 30 Wochen wurden.

Es fiel also bei den $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren eine vermehrte Anzahl an Tieren mit Lymphomen und beiden Tumorarten auf (Tab. 16 im Anhang). Von insgesamt 41 untersuchten Tieren entwickelten 8 gastrointestinale Tumoren, 16 Tiere beide Tumorarten (gastrointestinale und lymphoide Tumoren, ein Tier hiervon wies einen Hauttumor und Lymphom auf) und 17 Tiere erkrankten an Lymphomen.

2.4.2. Lymphomagenese in *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen

2.4.2.1. Charakterisierung der Lymphome

Um die aufgetretenen Lymphome der *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Population zu charakterisieren wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Neben der immunphänotypischen Charakterisierung der lymphoiden Tumoren war auch MHC Klasse I-Expression auf der Zelloberfläche der Lymphome von Interesse.

2.4.2.1.1. Morphologie und Histologie der lymphatischen Organe

Vermeehrt waren Milz und Lymphknoten in den *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren neoplastisch verändert (Tab. 2.4.2.1.1.a). Diese Tiere wiesen zudem häufig eine Paralyse der Hinterbeine auf. Tiere mit, auf den Thymus beschränkten Lymphomereignis, zeigten diesen Phänotyp nicht.

Genotyp	Anzahl Tiere gesamt	Anteil Tiere mit Lymphomen an Gesamtpopulation	Thymus (und/oder periphere lymphatische Organe) neoplastisch verändert		Periphere lymphatische Organe neoplastisch verändert	
	[n]		[n]	[n]		
<i>Rag</i>^{-/-}/<i>Mlh1</i>^{-/-}	42	81 %	30,6 %	7	76,5 %	26
<i>Mlh1</i>^{-/-}	62	56,5 %	34,3 %	12	65,7 %	23

Tab. 2.4.2.1.1.a: Prozentuale Verteilung der neoplastisch veränderten lymphatischen Organe und Anteil der Lymphomereignisse in *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}- und *Mlh1*^{-/-}-Tieren (in Prozent).

Histologisch wurden die Neoplasien von 14 untersuchten Tieren als Non Hodgkin Lymphome beurteilt. Die Hinterbeinparalyse wurde durch eine starke Infiltration lymphoider Zellen in die Muskulatur im Bereich der Wirbelsäule hervorgerufen. Diese trat ausschließlich bei Tieren mit neoplastisch veränderten Lymphknoten, insbesondere im Bereich der unteren Wirbelsäule auf.

2.4.2.1.2. Immunphänotypisierung der Lymphome

Insgesamt wurden 30 Lymphome *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse immunphänotypisch untersucht (Tab. 17 im Anhang).

Es ließen sich 20 B-Zell Lymphome, 6 T-Zell Lymphome und 4 hämatopoetische Lymphome (CD 3- / CD 45R-) charakterisieren. Unter den 6 T-Zell Lymphomen befanden sich 5 doppelt positive (DP) T-Zell Lymphome und 1 CD 8 einfach positives (CD 8+) T-Zell Lymphom. Keines der T-Zell Lymphome exprimierte CD 3 (CD 3-), den B-Zell Lymphomen fehlte die Expression der Immunglobuline D und M (Ig D / Ig M negativ). Bei den Lymphomen *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse handelte es sich also ausschließlich um aus unreifen T- oder B-Zellen entstandene Lymphome. Eine

Klassifizierung von doppelt negativen (DN) T-Zell Lymphomen war mit den verwendeten Antikörpern nicht möglich, da in Rag defizienten Mäusen genotypbedingt keine reifen (CD 3 exprimierenden) T-Zellen vorkommen. Eine Unterscheidung zwischen doppelt negativen T-Zell Lymphomen und hämatopoetischen Lymphomen war daher mit den verwendeten Antikörpern nicht möglich.

Die Paralyse der Hinterbeine wurde ausschließlich in Tieren beobachtet, die B-Zell Lymphome oder hämatopoetische Lymphome entwickelten.

Hinsichtlich des Ausgangsorgans (Primärtumors) entstanden die T-Zell Lymphome im Thymus, die B-Zell Lymphome waren in der Peripherie (Milz und Lymphknoten) nachweisbar. Von den hämatopoetischen Lymphomen entwickelte sich eines im Thymus, 3 entwickelten sich in der Peripherie.

Die prozentuale Verteilung der einzelnen Lymphomarten zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zu den *Mlh1*^{-/-}-Tieren (Tab. 2.4.2.1.2.a). Die Anzahl an auftretenden B-Zell Lymphomen lag mit 66,7% höher als bei den *Mlh1* defizienten Mäusen (mit 28,6%). Demzufolge umgekehrt war das Verhältnis bei den T-Zell Lymphomen; von den Lymphomen *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse waren nur 20% T-Zell Lymphome, gegenüber 60% bei den *Mlh1*^{-/-}-Lymphomtieren. Unter den T-Zell Lymphomen fanden sich nur doppelt positive (DP) und CD 8 einfach positive (CD 8+) T-Zell Lymphome. Doppelt negative (DN) und CD 4 einfach positive T-Zell Lymphome kamen in den untersuchten *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren nicht vor. Verglichen zu den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen war der Anteil an hämatopoetischen Lymphomen nur geringfügig erhöht.

<i>Lymphomart</i>	<i>Immunphänotypisierung</i>	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-} (n = 30)	<i>Mlh1</i> ^{-/-} (n = 34)	
B-Zell Lymphome	CD 45R+ IgD- IgM-	66,7%	11,8%	} 26,5 %
	CD 45R+ IgD- IgM+	-	14,7%	
T-Zell Lymphome	DP T-Zell Lymphom	16,7%	14,7%	} 61,7 %
	CD 8+ T-Zell Lymphom	3,3%	14,7%	
	DN T-Zell Lymphom	-	14,7%	
	CD 4+ T-Zell Lymphom	-	17,6%	
hämatopoetische Lymphome	CD 24+ CD 45R- CD 3-	13,3%	11,8%	} 11,8 %

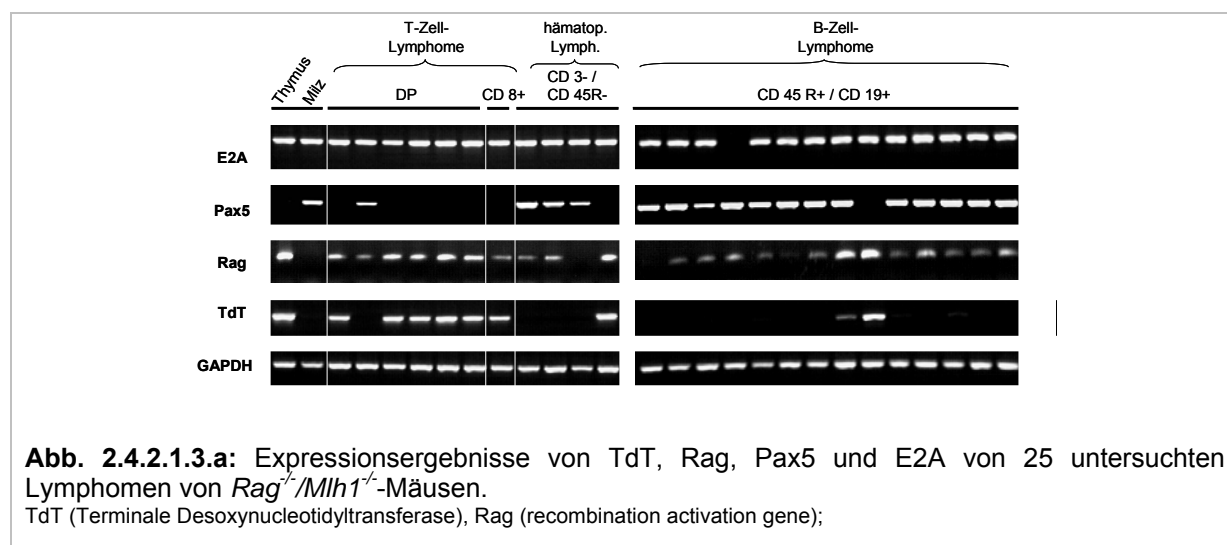
Tab. 2.4.2.1.2.a: Prozentuale Darstellung der Immunphänotypisierungsergebnisse aller untersuchten Lymphome der *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse.

2.4.2.1.3. Genexpressionsprofile anhand von Differenzierungsmarkern

Genotypbedingt war das Auftreten von -aus reifen lymphoiden Zellen entstandenen-Lymphomen in den $Rag^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen nicht zu erwarten.

Wie bereits in der Immunphänotypisierung gezeigt, fehlten den T-Zell Lymphomen die Expression des T-Zell-Rezeptors (CD 3), den B-Zell Lymphomen die Expressionen der Immunglobuline Ig D und Ig M auf ihrer Zelloberfläche.

Die Resultate der RT-PCR (Abb. 2.4.2.1.3.a und Tab.2.4.2.1.3.b) zeigten, dass die Mehrzahl der $Rag^{-}/Mlh1^{-}$ -Lymphome Charakteristika unreifer lymphoider Zellen aufwiesen. Alle T-Zell Lymphome exprimierten Rag, 100% der CD 8 einfach positiven T-Zell Lymphome und 83,3% der doppelt positiven T-Zell Lymphome exprimierten TdT. 92,9% der untersuchten B-Zell Lymphome zeigten eine Pax5-Expressionsbande, ebenso wie 75% der hämatopoetischen Lymphome und 16,7% der doppelt positiven T-Zell Lymphome. E2A wurde von sämtlichen T-Zell Lymphomen und hämatopoetischen Lymphomen exprimiert, ebenso wie 92,9% der B-Zell Lymphome.

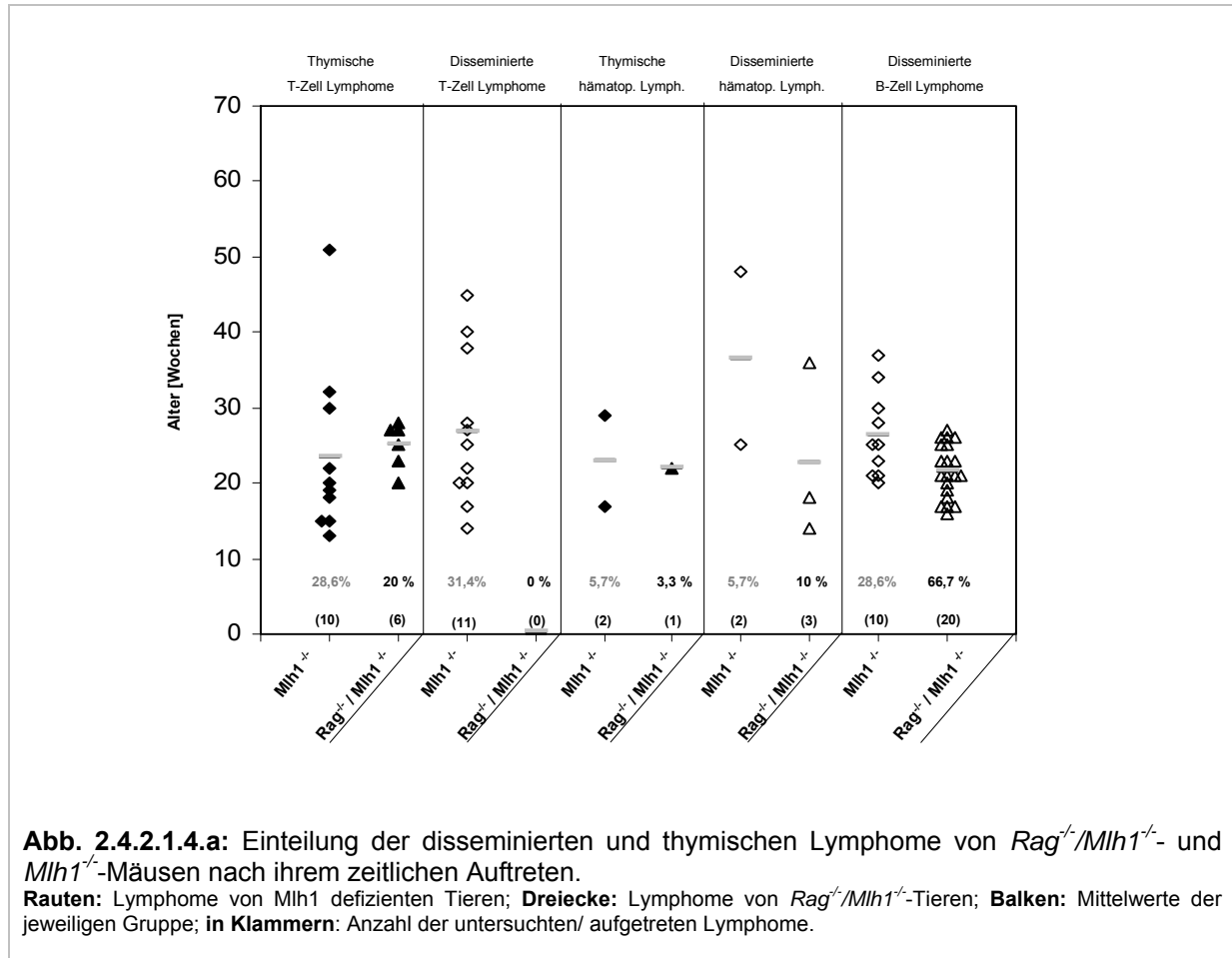


Lymphomart	Anzahl (n)	E2A	Pax 5 exprimiert	Rag	TdT
DP T-Zell-Lymphom	6	100%	16,7%	100%	83,3%
CD 8+ Lymphom	1	100%	0%	100%	100%
DN T-Zell-Lymphom	0	-	-	-	-
CD 4+ Lymphom	0	-	-	-	-
B-Zell-Lymphom	14	92,9%	92,9%	85,7%	14,3%
CD3- CD45R-	4	100%	75%	75%	25%

Tab. 2.4.2.1.3.a: Verhältnis der Expressionsergebnisse von E2A, Pax5, Rag und TdT von 25 untersuchten Lymphomen $Rag^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäuse. Angaben in Prozent Gen exprimiert / nicht exprimiert; n (Anzahl der untersuchten Lymphome je Subgruppe)

2.4.2.1.4. Lokalisation der Lymphome

Von 30 untersuchten Lymphomen waren alle 6 T-Zell Lymphome im Thymus nachweisbar. Keines der 20 B-Zell Lymphome infiltrierte den Thymus, sondern fand sich in Milz und Lymphknoten der Tiere. Von 4 hämatopoetischen Lymphomen waren ebenfalls 3 in der Peripherie (Milz und/oder Lymphknoten) und eines im Thymus nachweisbar (Abb. 2.4.2.1.4.a).



2.4.2.2. Mikrosatelliteninstabilität in Lymphomen von $Rag^{+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen

Bei den $Rag^{+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen war (genotypbedingt) eine frühere Form von auftretenden Lymphomen zu erwarten. Von Interesse war daher, ob das Charakteristikum der Mikrosatelliteninstabilität auch für diese Tiere von diagnostischer Relevanz ist.

Es wurden 17 Lymphome von $Rag^{+}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen auf Mikrosatelliteninstabilität getestet (Tab. 2.4.2.2.1.a). Darunter befanden sich zwei T-Zell Lymphome (1 DP und 1 CD 8+ T-Zell Lymphom), 3 hämatopoetische Lymphome (CD 3- / CD 45R-) und 12 B-Zell Lymphome.

Nur 3 der getesteten Lymphome wiesen Mikrosatellitenstabilität (MSS) auf. Es waren also 82,3 % der untersuchten Lymphome mikrosatelliteninstabil (23,5 % L-MSI; 58,8 % H-MSI), wohingegen sich 17,7 % der Lymphome als mikrosatellitenstabil erwiesen.

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	MSI
32	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	23	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus (Hals-LK)	H-MSI
19	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	27	CD 8+ Lymphom	NHL	Thymus	MSS
40	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	27	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	H-MSI
18	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	25	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	L-MSI
16	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	24	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	H-MSI
15	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	23	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	L-MSI
39	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	21	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	H-MSI
12	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	21	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	H-MSI
11	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	20	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	H-MSI
30	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	19	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	L-MSI
28	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	18	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	MSS
10	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	18	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	H-MSI
21	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	17	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	L-MSI
25	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	8	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	H-MSI
23	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	18	CD 3- / CD 45R-	NHL	Peripherie	H-MSI
9	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	14	CD 3- / CD 45R-	NHL	Peripherie	H-MSI
20	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	CD 3- / CD 45R-	n.d.	Peripherie	MSS

Tab. 2.4.2.2.1.a: Mikrosatelliteninstabilität in von Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}- Lymphomen.

MSS (Mikrosatellitenstabil), L-/H-MSI (niedrig-/hoch- Mikrosatelliteninstabil).

Eine Probe wurde als Mikrosatellitenstabil (MSS) bezeichnet, wenn keiner der 7 getesteten Mikrosatelliten Unterschiede zur tumorfreien Kontroll-DNA aufwies. Niedrige Mikrosatelliteninstabilität (L-MSI; low microsatellite instability) lag vor, wenn nicht mehr als 2 der getesteten Mikrosatelliten in der Tumor-DNA verändert waren. Hohe Mikrosatelliteninstabilität lag vor, bei mehr als 2 veränderten Mikrosatelliten (H-MSI; high microsatellite instability).

2.4.2.3. MHC Klasse I-Moleküle und streßinduzierte NK-Zell-aktivierende Liganden

2.4.2.3.1. MHC Klasse I-Molekülexpression der Lymphome

Das verstärkte Auftreten von B-Zell Lymphomen und das Fehlen der Subgruppen der doppelt negativen und CD 4 einfach positiven T-Zell Lymphome in Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}- Mäusen warf die Frage auf, ob ein Zusammenhang zwischen der MHC Klasse I-Molekülexpression und dem Fehlen von cytotoxischen T-Zellen in diesem Model bestand.

Von insgesamt 27 auf MHC Klasse I-Molekülexpression getestete Lymphome (Tab. 2.4.2.3.1.a) exprimierten 22 MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche (81,5 %) 5 der Lymphome besaßen keine MHC Klasse I-Molekülexpression. Alle untersuchten B-Zell Lymphome exprimierten MHC Klasse I-Moleküle.

Lymphome denen die MHC Klasse I-Expression fehlte, waren ausnahmslos T-Zell Lymphome und hämatopoetische Lymphome. 2 der 4 doppelt positiven (DP), das einzige untersuchte CD 8 einfach positive (CD 8+) T-Zell Lymphom und 2 der 4 hämatopoetischen Lymphome, waren MHC Klasse I negativ.

<i>Lymphomart</i>		<i>Anzahl (n)</i>	<i>MHC Klasse I positiv</i>	<i>MHC Klasse I negativ</i>
B-Zell Lymphome		18	100%	0%
T-Zell Lymphome	DP T-Zell Lymphome	4	50%	50%
	CD 8+ Lymphome	1	0%	100%
	DN T-Zell Lymphome	0	-	-
	CD 4+ Lymphome	0	-	-
hämatopoetische Lymphome		4	50%	50%
Gesamt		27		

Tab. 2.4.2.3.1.a: MHC Klasse I Expression auf der Zelloberfläche von *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Lymphomen. In 5 von 27 Lymphomen der *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäuse war eine fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression auf der Zelloberfläche feststellbar.

DN (doppelt negativ für CD 4 und CD 8), DP (doppelt positiv für CD 4 und CD 8); n.d. (nicht durchgeführt)

2.4.2.3.2. RAE-1- und Mult1-Expression der Lymphome

Die Expressionsdaten für Mult1 und RAE-1 wurden mit den MHC Klasse I-Expressionen (aus der Immunphänotypisierung) verglichen (Abb. 2.4.2.3.2.a).

Keines der untersuchten T-Zell Lymphome wies eine RAE-1-Expressionsbande auf, wogegen in fast allen B-Zell Lymphomen (eine Ausnahme) und in 3 von 4 hämatopoetischen Lymphomen RAE-1 exprimiert wurde.

In allen untersuchten Lymphomen fand sich eine Expressionsbande für Mult1, allerdings waren auch die Thymus- und die Milz-Kontrolle positiv und unterschieden sich in ihren Intensitäten kaum von denen der Lymphome.

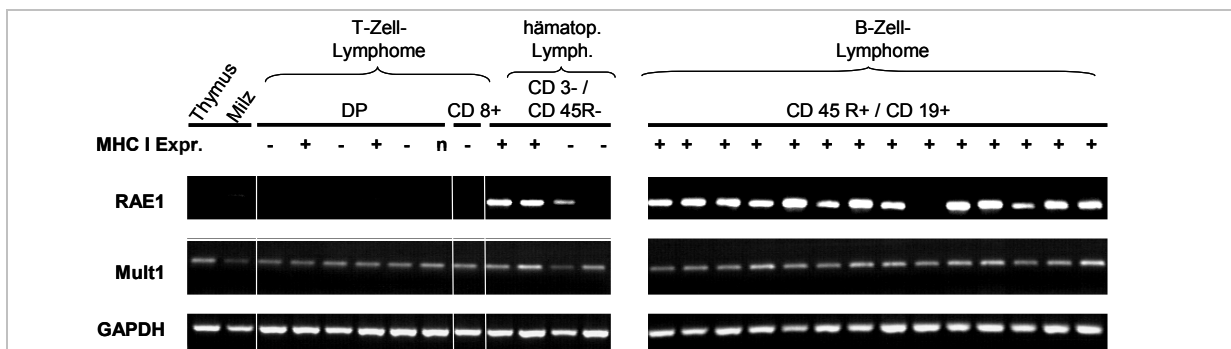


Abb. 2.4.2.3.2.a: Expressionen von RAE-1 und Mult1 von 25 untersuchten *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Lymphomen verglichen mit der MHC Klasse I-Expression (Immunphänotypisierung).

MHC I-Expr. (Immunphänotypisierung MHC Klasse I Expression), + / - (exprimiert / nicht exprimiert); RAE-1 (retinoic acid early inducible gene 1), Mult1 (mouse UL16-binding protein-like transcript 1)

Die tabellarische Darstellung (Tab. 2.4.2.3.2.b) spiegelt die prozentualen Verhältnisse der Expression von RAE-1 und Mult1 in den verschiedenen Lymphomgruppen wider. 100% der T-Zell Lymphome exprimierten kein RAE-1,

wogegen 92,9% der B-Zell Lymphome und 75% RAE-1-positiv waren. Alle untersuchten Lymphome exprimierten Mult1.

<i>Lymphomart</i>	<i>Anzahl</i>	<i>RAE 1</i>	<i>Mult 1</i>
	<i>(n)</i>	<i>exprimiert</i>	
DP T-Zell-Lymphom	6	0%	100%
CD 8+ Lymphom	1	0%	100%
DN T-Zell-Lymphom	0	-	-
CD 4+ Lymphom	0	-	-
B-Zell-Lymphom	14	92,9%	100%
CD3- CD45R-	4	75%	100%

Tab. 2.4.2.3.2.b: Verhältnis der Expressionsergebnisse MHC Klasse I-ähnlicher Moleküle (RAE-1 und Mult1) in 25 Lymphomen der *Rag^{-/-}/Mh1^{-/-}*-Mäuse.
n (Anzahl der untersuchten Lymphome je Subgruppe); RAE-1 (retinoic acid early inducible gene 1), Mult1 (mouse UL16-binding protein-like transcript 1).

Es lagen also bei den untersuchten T-Zell Lymphomen keine Tumoren vor, die bei fehlender MHC Klasse I-Molekülexpression RAE-1 exprimierten. Die beiden MHC Klasse I-positiven T-Zell Lymphomen waren ebenfalls RAE-1-negativ. Einzig ein hämatopoetisches Lymphom exprimierte RAE-1 bei gleichzeitiger Anwesenheit von MHC Klasse I-Molekülen. Alle B-Zell Lymphome exprimierten MHC Klasse I-Moleküle und (mit einer Ausnahme) RAE-1.

2.4.3. Gastrointestinaltumorentwicklung in *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäusen

2.4.3.1. Histologische Charakterisierung der gastrointestinalen Tumoren

Hinsichtlich der Invasivität erschienen die *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Gastrointestinaltumoren harmloser als die der *Mlh1^{-/-}*-Mäuse. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass diese Tumoren deutlich früher und in größerer Anzahl in den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Tieren auftraten.

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Histologie
7	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT3
7	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA zumindest pT2
8	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	41	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
16	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
16	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
10	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	18	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
9	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	14	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
12	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	21	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
3	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
16	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
6	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2
18	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	25	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA (Invasionstiefe nicht beurteilbar)
1	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	20	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1
19	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	27	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1
3	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1
8	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	41	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1
20	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1
6	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1
15	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	23	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1
20	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	36	Adenom	flaches tubulöses Adenom mit schweren Atypien
20	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	36	Adenom	tubulöses villöses Adenom mit mäßigen Atypien (polypös)
3	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	36	Adenom	flaches tubulöses Adenom mit schweren Dysplasien
6	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	39	Adenom	tubulovillöses Adenom
11	<i>Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}</i>	20	Adenom	flaches Adenom

Tab.2.4.3.1.a: Histologische Charakterisierung von Gastrointestinaltumoren der *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäuse.

2.4.3.2 Mikrosatelliteninstabilität Gastrointestinaltumoren von *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäusen

Um festzustellen, ob Mikrosatelliteninstabilität ein Kriterium für *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Gastrointestinaltumoren ist oder diese erst später im Laufe der Tumorgenese auftritt, wurde ein Teil dieser Tumoren auf ihre Mikrosatelliteninstabilität getestet (Tab. 2.4.3.2.a). Insgesamt 27 Gastrointestinaltumoren und 17 Lymphome *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäuse wurden auf Mikrosatelliteninstabilität (sieben verschiedene Loci) hin untersucht.

Von insgesamt 27 gastrointestinalen Tumoren waren 4 mikrosatellitenstabil (14,8% MSS), 14 wiesen niedrige Mikrosatelliteninstabilität (51,9% L-MSI) und 9 Tumoren hohe Mikrosatelliten Instabilität (33,3% H-MSI) auf. Ein Zusammenhang zwischen Aggressivität des Tumors (oder dem Erkrankungszeitpunkt) und der Mikrosatelliteninstabilität war nicht feststellbar.

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Histologie	MSI
7	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT3	L-MSI
7	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA zumindest pT2	L-MSI
8	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	41	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	H-MSI
16	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	MSS
16	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	L-MSI
10	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	18	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	H-MSI
9	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	14	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	MSS
12	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	21	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	H-MSI
3	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	L-MSI
16	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	H-MSI
6	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	L-MSI
18	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	25	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA (Invasionstiefe nicht beurteilbar)	L-MSI
1	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	20	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	MSS
19	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	27	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
3	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
8	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	41	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
20	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
6	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	H-MSI
15	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	23	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
20	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adenom	flaches tubulöses Adenom mit schweren Atypien	L-MSI
20	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adenom	tubulöses villöses Adenom mit mäßigen Atypien (polypös)	MSS
3	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adenom	flaches tubulöses Adenom mit schweren Dysplasien	H-MSI
6	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adenom	tubulovillöses Adenom	H-MSI
11	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	20	Adenom	flaches Adenom	L-MSI
13	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	21	n.d.	n.d.	H-MSI
13	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	21	n.d.	n.d.	H-MSI
21	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	17	n.d.	n.d.	L-MSI

Tab. 2.4.3.2.a: Mikrosatelliteninstabilität in gastrointestinalen Tumoren von Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-Mäusen.

MSS (mikrosatellitenstabil), L-/H-MSI (niedrig-/hoch- mikrosatelliteninstabil).

Eine Probe wurde als Mikrosatellitenstabil (MSS) bezeichnet, wenn keiner der 7 getesteten Mikrosatelliten Unterschiede zur tumorfreien Kontroll-DNA aufwies. Niedrige Mikrosatelliteninstabilität (L-MSI; low microsatellite instability) lag vor, wenn nicht mehr als 2 der getesteten Mikrosatelliten in der Tumor-DNA verändert waren. Hohe Mikrosatelliteninstabilität lag vor, bei mehr als 2 veränderten Mikrosatelliten (H-MSI; high microsatellite instability).

Im Vergleich zu den Untersuchungen an Mlh1 defizienten Tieren (Tab. 2.4.3.2.b) zeigte sich, dass der Grad der Mikrosatelliteninstabilität in den Gastrointestinaltumoren der Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-Mäuse von den Mlh1^{-/-}-Mäusen unterscheidet. Während sich bei den Mlh1^{-/-}-Mäusen keine mikrosatellitenstabile Gastrointestinaltumoren fanden, lag bei den Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-Mäusen der Anteil bei 14,8%.

Genotyp	Anzahl [n]	MSS	L-MSI	H-MSI
Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-Lymphome	17	17,7%	23,5%	58,8%
Rag ^{-/-} /Mlh1 ^{-/-} -Gastrointestinaltumoren	27	14,8%	51,9%	33,3%
Mlh1^{-/-}-Lymphome	19	10,5%	31,6%	57,9%
Mlh1 ^{-/-} -Gastrointestinaltumoren	9	0,0%	55,6%	44,4%

Tab.2.4.3.2.b: Mikrosatelliteninstabilität in Lymphomen und Gastrointestinaltumoren von Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}- und Mlh1^{-/-}-Tieren.

IV Diskussion

1. MLH1 defiziente Mäuse als *in vivo* Modell für auf MMR-Defizienz basierende Tumorgenese

1.1. Tumorgenese in Mlh1 defizienten Mäusen

Um die Bedeutung der auf MMR-Defizienz basierenden Tumorentstehung besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit die Lymphome der Mlh1 Mäuse untersucht. Obwohl MMR Defekte in Lymphomen bei Menschen nur sehr selten in Lymphomen beschrieben wurden, ist die Relevanz dieses Modellsystems –wie im Folgenden gezeigt werden soll- für humane Lymphomerkrankungen trotzdem gegeben. So finden sich beispielsweise einige Fälle von Lymphomerkrankungen in Familien mit HNPCC-Prädisposition (Ricciardone, Ozcelik et al. 1999; Wang, Lasset et al. 1999; Whiteside, McLeod et al. 2002). Mutationen in MMR-Genen, wie in *Mlh1* und/oder *Msh2* treten bei verschiedenen humanen Tumorerkrankungen, insbesondere von epithelialen Tumoren (Karzinomen) auf. Das Hereditäre Nicht-polypöse Kolorektale Karzinom (HNPCC) ist häufig durch Mutationen im *Mlh1*- und/oder *Msh2*-Gen und einer damit einhergehenden Mikrosatelliteninstabilität (MSI) charakterisiert. MSI dient daher als diagnostischer Marker zum Nachweis von Defekten im Mismatch Reparatur System (Yamamoto, Perez-Piteira et al. 1999). In den Mlh1 defizienten Mäusen ließ sich die spontane Entwicklung lymphoider und gastrointestinaler Tumoren zeigen.

Wie bereits gezeigt wurde, sind Mlh1 defiziente Mäuse durch einen starken Tumorphänotyp charakterisierbar. Edlmann et al. analysierten die auf einen gemischten genetischen Hintergrund (C57/BI-6 x 129SV) gezüchteten Mlh1 defizienten Mäuse. Alle Mäuse dieser Kohorte erkrankten innerhalb eines Jahres an Tumoren. Neben gastrointestinalen und lymphoiden Tumoren traten mit geringer Inzidenz auch andere Tumoren, wie z.B. Magen-, Kolon- und Schweißdrüsen-Karzinome auf (Edlmann, Yang et al. 1999). Die Lymphome entstanden wahrscheinlich aus B- und T-Ursprungszellen. Es wurden sowohl Non Hodgkin Lymphome als auch Hodgkin Lymphome diagnostiziert.

Es ist bekannt, dass Mäuse in Abhängigkeit ihres genetischen Hintergrunds eine Prädisposition für die Entwicklung bestimmter Tumorarten besitzen. Um die Frage zu klären, in wie weit sich der genetische Hintergrund auf die Tumorgenese in diesem Mausmodell auswirkt, wurden die Mlh1 defizienten Mäuse durch zehnfache Rückkreuzung mit C57/BI-6 Mäusen auf einen reinen genetische BI-6-Hintergrund gebracht. Diese Mlh1 defiziente Mauslinie wurde auf Zeitpunkt und Inzidenz von Tumoren untersucht und für weitere Züchtungen/Kreuzungen verwendet.

Die Lymphome traten i.d.R. früher als Gastrointestinaltumore auf. Die auf einen reinen Black6-Hintergrund zurückgekreuzten *Mlh1*^{-/-}-Mäuse erkrankten ebenfalls innerhalb von 13 Monaten an lymphoiden und/oder gastrointestinalen Tumoren. Bei den von uns untersuchten *Mlh1*^{-/-}-Mäusen lag das Verhältnis lymphoider zu gastrointestinalen Tumore bei 43,5% zu 43,5%, in 13% aller Fälle traten beide

Tumorarten auf (Tab.1.1.1.b). Der Vergleich mit den auf einem gemischten genetischen Hintergrund (C57/Bl-6 x 129SV) gezüchteten *Mlh1*^{-/-}-Tieren zeigte, dass hinsichtlich der Überlebenskurven oder Tumorinzidenzen keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Dieses Ergebnis konnten inzwischen auch durch Untersuchungen an (C57/Bl-6 x 129SV) *Mlh1*^{-/-}-Tieren, die ebenfalls im Mausstall des Biozentrums an der Universität Würzburg gezüchtet wurden, bestätigt werden (mündliche Mitteilung Dr. B. Kneitz). Dies bedeutet, dass sich der in *Mlh1* defizienten Mäusen beschriebene Tumorphänotyp weitestgehend unabhängig vom genetischen Hintergrund entwickelt. Die beobachtete Lymphomentwicklung in der Maus scheint somit nicht in direktem Zusammenhang mit einer genetischen Prädisposition der verwendeten Inzuchtmauslinie zu stehen.

Lymphomentwicklung und Gastrointestinaltumorentstehung wurden getrennt voneinander beurteilt. Im Alter zwischen 3-5 Monaten kam es zu einem progressiven Auftreten der lymphoiden Tumoren, wogegen später nur noch vereinzelt Tiere Lymphom entwickelten (Tab.1.1.d). Die Lymphome entstanden in verschiedenen lymphatischen Organen, wie Thymus, Milz und/oder Lymphknoten. Es konnten verschiedenste Gruppierungen hinsichtlich der lymphoiden Vorläufer/Ursprungszelle vorgenommen werden. Die *Mlh1* defiziente Maus stellt somit ein geeignetes Modellsystem für *in vivo* Studien einer durch Mismatch-Reparatur(MMR-)-Defizienz hervorgerufenen Tumorgenese dar.

1.2. HNPCC-ähnliche Gastrointestinaltumorgenese in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen

Die Gastrointestinaltumoren ähnelten morphologisch und molekularbiologisch denen der an HNPCC erkrankten Menschen. Die Gastrointestinaltumorentstehung fand i.d.R. spät, d.h. nach etwa 9-13 Monaten statt. Es handelte sich mehrheitlich um ulzerierte Adenokarzinome der Intestinum-Mucosa mit hoher Invasivität, jedoch geringer Metastasierungsneigung. Sie ähnelten morphologisch und histologisch den in humanen HNPCC-Patienten auftretenden kolorektalen Karzinomen. Alle der von uns untersuchten gastrointestinalen Tumoren *Mlh1* defizienter Tiere waren mikrosatelliteninstabil (MSI).

Vergleichende Studien über die Entstehung von Gastrointestinaltumoren in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen (und anderen MMR-defizienten Mäusen) zeigen die Bedeutsamkeit dieser Mauslinien als *in vivo* HNPCC-Modell. Tendenzen zur Metastasierung der gastrointestinalen *Mlh1*^{-/-}-Tumoren wurden selten beobachtet, was der Situation von HNPCC-Patienten entspricht. Bei der Erkennung und Reparatur postreplikativ auftretender DNA-Schäden (Fehlpaarungen, wie Insertionen oder Deletionen) spielt das MMR-System eine entscheidende Rolle.

Lymphozytäre Infiltrationen als Hinweis einer Immunantwort des Organismus auf das Tumoreignis waren in dem von uns verwendeten murinen Modell nicht nachweisbar. Das Fehlen lymphozytärer Infiltrationen in Tumornähe widerspricht nicht der aufgestellten Hypothese, dass das Immunsystem einen Einfluss auf die Tumorabwehr in MMR-defizienten Mäusen hat. Es bedeutet vielmehr, dass die Tumorzellen anscheinend eine Möglichkeit gefunden haben, einer Erkennung durch das Immunsystem auszuweichen. Ein solcher möglicher Ausweichmechanismus ist die fehlende bzw. die herunterregulierte Expression von MHC Klasse I-Molekülen

auf der Tumorzelloberfläche. Dies wurde auch bei an Kolorektalem Karzinom erkrankten Menschen beschrieben (Imanishi, Kamigaki et al. 2006).

1.3. Genomische Instabilität in MMR-defekten Lymphomen

Der Einfluss von MMR-Defizienz auf die Entstehung von humanen Lymphomen ist ein strittig diskutierter Punkt. Inwiefern Mikrosatelliteninstabilität als Charakteristikum lymphoider Tumoren von Relevanz ist, sollte an den Lymphomen der *Mlh1* defizienten Mäuse ebenfalls untersucht werden.

Die histologisch als Non Hodgkin Lymphome befundenen Tumoren waren mehrheitlich (89,5%) mikrosatelliteninstabil (Tab.1.2.1.2.b). Insbesondere bei der Subgruppe thymischer T-Zell Lymphome lag ein hoher Grad an Mikrosatelliteninstabilität vor.

Somit erscheint die MSI-Analyse auch für den Nachweis von MMR-Defizienz lymphoider Tumoren geeignet, wie auch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigen (de Wind, Dekker et al. 1998; Edelmann, Yang et al. 1999). Insgesamt 45% der von Edelmann et al. untersuchten Lymphome von *Mlh1*^{-/-}-Tieren waren mikrosatelliteninstabil (MSI). Alle *Msh2* defizienten lymphoiden Tumoren wiesen einen durch Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichneten RER+-Phänotyp auf (de Wind, Dekker et al. 1998). Darüber hinaus haben einige Arbeitsgruppen MSI in humanen Lymphomen nachgewiesen (Hangaishi, Ogawa et al. 1997; Zhu, Das-Gupta et al. 1999).

In anderen Studien wird die Bedeutung der MSI in immunprofizienten Menschen auftretende Lymphome jedoch nur als gering bewertet. Lymphome, erblich vorbelasteter Patienten (an HNPCC erkrankte Eltern), wurden ebenfalls auf Mikrosatelliteninstabilität getestet. In keinem der untersuchten Fälle war MSI nachweisbar (Teruya-Feldstein, Greene et al. 2002). Eine Erklärung wäre, dass die MSI nur in fortgeschrittenen Stadien der Tumorentwicklung klar detektierbar ist und somit bei den verhältnismäßig aggressiv und schnell wachsenden hämatopoetischen Lymphomen nicht in dem Ausmaß zur Ausprägung kommt, wie beispielsweise in klassischen HNPCC der Fall ist.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass eine Erkennung und Eliminierung dieser Tumoren durch das Immunsystem beim Menschen effektiver abläuft, als bei Mismatch Repair defizienten Mäusen. Die molekulare Charakterisierung der Lymphome schloss daher auch die Untersuchung einiger Gene ein, die für die Immunantwort von Relevanz sind.

1.4. Charakterisierung der Lymphome

Die hohe Lymphominzidenz in der *Mlh1* defizienten Mauspopulation wird in Tabelle 1.1.1.b dargestellt. Die Hälfte aller *Mlh1* defizienten Mäuse erkrankten an Lymphomen. In allen transgenen Mausmodellen, mit Null-Mutationen in MMR-Genen, die eine Inaktivierung des mitotischen MMR Systems aufwiesen, lag ebenfalls eine hohe Entstehungsrate an Lymphomen vor (Edelmann, Yang et al. 1999; Wei, Kucherlapati et al. 2002). Eine Charakterisierung von –auf MMR-Defizienz basierenden- murinen Lymphomen wurde bisher nur bei *Msh2*^{-/-}-Mäusen

durchgeführt. Die *Msh2*^{-/-}-Mäuse entwickelten Tumoren innerhalb von 55 Wochen. Mehr als 2/3 der Tiere zeigten die Entstehung lymphoider Tumoren, ausschliesslich thymischer T-Zell Lymphome. Morphologische und molekulare Untersuchungen zeigten, dass diese typische Charakteristika lymphoblastischer Lymphome trugen, wie sie auch beim Menschen beschrieben sind.

Um die Bedeutung der Mlh1-Defizienz für die Entstehung von Lymphomen besser verstehen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit eine weiterführende Charakterisierung der Lymphome Mlh1 defizienter Mäuse vorgenommen. Dies diente der Klärung folgender Fragen: Welche Charakteristika/Entitäten zeigen die in Mlh1 defizienten Mäusen entstandenen Lymphome? Welchen Einfluß hat die Mlh1-Defizienz auf die Tumorentwicklung in den Mäusen, verglichen mit anderen MMR-defizienten Mausmodellen? Gibt es Analogien zur Lymphomagenese im Menschen?

Oberflächenmolekülexpressions- und Genexpressions-Studien zeigten das Auftreten von Lymphomen, die von Vorläuferzellen der B- und T-Zelllinie oder von hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen. Es ließen sich vier verschiedene Hauptformen von Lymphomen durch die Immunphänotypisierung und aufgrund der spezifischen Tumorlokalisierung unterscheiden:

- (i) disseminierte vorwiegend CD 4 / CD 8 doppelt negative oder CD 4 einfach positive T-Zell Lymphome;
- (ii) thymus-lokalisierte CD 4 / CD 8 doppelt positive oder CD 8 einfach positive T-Zell Lymphome;
- (iii) B-Zell Lymphome sowie
- (iv) hämatopoetische Lymphome (disseminiert oder thymus-lokalisiert).

Eine Unterteilung der T-Zell Lymphome nach Lokalisation und Expression verschiedener Gene, die während der Zellreifung differentiell exprimiert werden, ermöglichte eine weitere Subklassifizierung dieser Lymphome:

- i) Die thymischen T-Zell Lymphome (CD 8 einfach positiv oder CD 4 / CD 8 doppelt positiv) exprimierten TdT und Rag waren auf transkriptioneller Ebene und Pax5 negativ.
- ii) Den disseminierten T-Zell Lymphomen (CD 4 einfach positiv oder CD 4 / CD 8 doppelt negativ) fehlte eine Expression von TdT und Rag. Viele dieser Lymphome waren Pax5-positiv.

Aufgrund der Expressionsprofile, dem histologischen Erscheinungsbild und ihrer Lokalisation können die **thymischen T-Zell Lymphome** als Gegenstücke zu der im Menschen beschriebenen Entität der lymphoblastischen T-Zell Lymphome eingestuft werden. Ausgangszelle war vermutlich eine unreife thymische pro T Zelle, da diese Tumoren Rag und TdT exprimierten. Der Ursprung der disseminierten T-Zell Lymphome ist unklar, sie sind histologisch nicht von den thymischen T-Zell Lymphomen unterscheidbar. Oberflächenexpressions- und Genexpressions-Analysen ermöglichten jedoch eine eindeutige Abgrenzung zur Gruppe der thymischen T-Zell Lymphome. Das Fehlen der Expression von Rag und TdT basiert möglicherweise auf einer Selektion durch Manifestierung aus der Ursprungszelle einer nicht eindeutig definierten T-Zellpopulation. Atypische Pax5-Expressionen in T-Zell Lymphomen wurden ebenfalls beim Menschen beschrieben (Willenbrock, Ichinohasama et al. 2002).

Während in *Msh2* defizienten Mäusen keine B-Zell Lymphome auftraten (de Wind, Dekker et al. 1998), zeigten etwa 1/3 aller Lymphome *Mlh1* defizienter Mäuse die Expression B-zellspezifischer Gene. Die Immunphänotypisierung der Lymphome (IgM+/IgD+) charakterisierte diese Lymphome als Gegenstücke zu im Knochenmark reifenden B-Zellen. Da sämtliche **B-Zell Lymphome** ebenfalls Pax5 exprimierten spricht dafür, dass diese Lymphome von unreifen B-Zellen und nicht von Plasmazellen abstammen. Die B-Zell Lymphome zeigten in histologischen Schnitten die Charakteristika lymphoblastischer Lymphome. Somit konnten diese Lymphome als Gegenstücke zu der im Menschen auftretenden Entität der lymphoblastischen B-Zell Lymphome zugeordnet werden.

Die als **hämatopoetischen Lymphome** definierten Tumoren (fehlende Expression B- bzw. T zellspezifischer Oberflächenmoleküle) kamen sowohl im Thymus als auch in peripheren lymphatischen Organen vor. Eine TdT- und Rag-Expression zeigte sich nur bei den im Thymus entstandenen Lymphomen. Pax5-positive hämatopoetische Lymphome waren dagegen nur in peripheren lymphatischen Organen nachweisbar, d.h. in Milz und/oder Lymphknoten aufgetretenen Tumoren. Eine Zuordnung zu einer humanen Tumorentität ist bei dieser Gruppe lymphoblastischer Lymphome jedoch nicht möglich.

Zusammengefasst führt *Mlh1* Defizienz also nicht nur zur Entstehung, eines breiten Lymphomspektrums. Neben den bei *Msh2*^{-/-}-Mäusen beschriebenen thymischen T-Zell Lymphomen, kommt es bei den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen darüber hinaus zur Entwicklung weiterer Lymphomarten, wie disseminierten T-Zell Lymphomen und von Vorläufer-B-Zellen abstammenden disseminierten B-Zell Lymphomen. Sämtliche nachgewiesenen Lymphomtypen weisen die typischen histologischen Merkmale lymphoblastischer Lymphome auf.

Das in den *Msh2* defizienten Mäusen disseminierte (in peripheren lymphatischen Organen auftretende) T-Zell Lymphome und B-Zell Lymphome nicht vor kamen deutet darauf hin, dass - neben der Mismatch-Reparatur -Defekte in *Mlh1* und *Msh2*-Genen unterschiedlich starke Auswirkungen auf weitere Prozesse/Funktionsabläufe in der Zelle haben.

Wie erklärt sich also der Unterschied in der Lymphomagenese zwischen *Mlh1* und *Msh2* defizienten Mäusen? Eine Möglichkeit ist, dass der Verlust von *Msh2* bzw. *Mlh1* zu unterschiedlich ausgeprägten Mutationsphänotypen führt. In der Tat gibt es Untersuchungen, die eine erhöhte Mutationsfrequenz in *Msh2* defizienten Zellen im Vergleich zu *Mlh1* defizienten Zellen nachweisen. Der moderate Mutationsphänotyp der *Mlh1* defizienten Maus führt zu einem erweiterten Spektrum von Lymphomen. In *Msh2*^{-/-}-Mäusen würden demzufolge nur thymische Lymphome auftreten können, da diese die höchste Penetranz besitzen. Interessanterweise kommt es in *Msh2* defizienten Mäusen auch aus diesem Grund nur in Einzelfällen zur Ausbildung von Gastrointestinaltumoren. Eine zweite Möglichkeit könnte in einer bisher unbekanntem Funktion von *Mlh1* in der Differenzierung von reifenden Lymphozyten oder in der Eliminierung von geschädigten Zellen liegen. Es wurde gezeigt, dass *Msh2* und *Mlh1* sowohl in der somatischen Rekombination und dem Isotypen Switching in B Zellen eine Rolle spielen (Schrader, Vardo et al. 2002).

Die abweichende Entwicklung von Lymphomen zwischen in beiden MMR-defekten Mäuslinien könnte also auf einer unterschiedlich starken Mutationsfrequenz basieren.

Der Vergleich der *Msh2*^{-/-}-Mäuse (de Wind, Dekker et al. 1998) zeigte, das sich zeitliche Auftreten und die Morphologie der gastrointestinalen Tumoren den von uns untersuchten murinen *Mlh1*^{-/-}-Tumoren ähnelt. Die deutlichen Unterschiede in der Lymphomagenese beider Modelle, wirft Fragen hinsichtlich der Relevanz für die humane Situation auf. Die aus MMR-Defizienz basierende Lymphomentstehung, wie in verschiedenen Mausmodellen gezeigt, wurde beim Menschen bisher nicht häufig beschrieben.

Es sind jedoch Fälle aus HNPCC-Familien bekannt, in denen die Nachkommen (von, für *MLH1/MSH2* heterozygot mutierten Eltern) Leukämien und Lymphome entwickelten (Ricciardone, Ozcelik et al. 1999; Wang, Lasset et al. 1999). Darüber hinaus liegen Studien über verschiedene (teilweise mit HNPCC-assoziierte) Syndrome mit Fällen von Lymphomentwicklung vor (Pratt, Parham et al. 1988; Cohen 1992; Paraf, Jothy et al. 1997; Wang, Lasset et al. 1999; Grips, Wentzensen et al. 2002).

Es mehren sich die Studien, welche einen möglichen Einfluß von Mismatch Reparatur Defizienz in humanen hämatopoetischen Tumoren in immunprofizienten Patienten diskutieren. Die hier untersuchten humanen hämatopoetischen Tumoren zeigten ebenfalls Mikrosatelliteninstabilität, was auf ein defektes MMR-System hindeutet (Hangaishi, Ogawa et al. 1997; Lowsky, DeCoteau et al. 1997; Brimmell, Mendiola et al. 1998).

In immundefizienten Patienten HIV Patienten (Immundeficiency Related Lymphoma, ID-RL) und immunsuprimierten Posttransplantationspatienten ist diese Relevanz augenscheinlicher. Hier kommt es häufig zur Entwicklung von Lymphomen, die Mikrosatelliteninstabilität aufweisen (Duval, Raphael et al. 2004). Solche Beobachtungen stützen die Annahme, dass ein intaktes Immunsystem essentiell für die Erkennung und Eliminierung von insbesondere diesen lymphoiden Tumoren sein kann.

Mit ihrem breiten Spektrum an auftretenden Lymphomarten und der hohen Frequenz an Lymphomereignissen ist die *Mlh1* defiziente Maus daher ein geeignetes *in vivo* Modell für Studien einer -auf MMR-Defizienz basierenden- Lymphomagenese.

1.5. Der Einfluss der Expression von MHC Klasse I-Molekülen und MHC Klasse I-ähnlichen Molekülen auf die Immunogenität MMR-defizienter Lymphome

Die Untersuchung der MHC Klasse I-Molekülexpression bei Lymphomen *Mlh1* defizienter Mäuse sollte klären, welche Bedeutung das Immunsystem auf die Erkennung und Abwehr der in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen auftretenden Lymphome hat. Desweiteren ermöglichen Expressionsstudien von RAE-1 gemeinsam mit den Daten der MHC Klasse I-Molekülexpression Aussagen über die reaktiven Komponenten des Immunsystems.

In Studien an verschiedenen humanen Tumorarten wurde gezeigt, dass Veränderungen in der Expression von MHC Klasse I-Molekülen ein notwendiger Schritt in der Tumorentwicklung ist, durch den Tumorzellen einer Tumorantigenpräsentation und damit einer Erkennung durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) ausweichen. Für uns war es nun wichtig zu charakterisieren, in wieweit die murinen Lymphome durch herunterregulieren der MHC Klasse I-Molekülexpression einer Abwehr durch CTLs ausweichen und wie die Erkennung

und Abwehr durch die „Nicht-MHC Klasse I-abhängigen“ Komponenten des Immunsystems verhindert wird.

In den von uns untersuchten Lymphomgruppen war die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen, bzw. RAE-1 unterschiedlich. So exprimierten sämtliche untersuchten B-Zell Lymphome MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche und RAE-1 auf transkriptioneller Ebene (Abb.1.2.1.7.a und Abb.1.2.1.7.c).

In beiden T-Zell Lymphom-Subgruppen (thymisch/disseminiert) lag dagegen ein heterogenes Muster vor. Die disseminierten T-Zell Lymphome exprimierten (ähnlich wie die B-Zell Lymphome) zumeist MHC Klasse I-Moleküle und RAE-1. Dagegen war die Mehrzahl der thymischen T-Zell Lymphome MHC Klasse I-negativ, nur 12,5% thymischer T-Zell Lymphome exprimierten MHC Klasse I Moleküle (bei gleichzeitig fehlender RAE-1-Expression). Sämtlichen MHC-Klasse I-negativen T-Zell Lymphomen (thymischen und disseminierten) fehlte die Expression des stimulatorischen NK-Zell-Liganden RAE-1.

Diese Resultate weisen auf mögliche Selektionsmechanismen MMR-defizienter Tumore durch das Immunsystem hin. Eine fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression (z.B. hervorgerufen durch Mutationen im $\beta 2$ Mikroglobulin-Gen) wurde auch bei einigen anderen Tumorarten, wie zum Beispiel bei dem Kolorektalen Karzinom gezeigt (Bicknell, Rowan et al. 1994). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Tumorzellen in der Lage sind einer Immunantwort durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zu entgehen.

Die fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression macht eine (Tumor-) Antigenpräsentation unmöglich. Dieses, für die Zielzellerkennung durch cytotoxische T-Zellen entscheidende Signal entfällt somit. Im Gegensatz zu den cytotoxische T-Lymphozyten stellt die MHC Klasse I-Antigenpräsentation für andere Zellen des Immunsystems ein inhibitorisches Signal der Zielzellerkennung dar. Natürliche Killerzellen und die $\gamma\delta$ -T-Zellen können Zielzellen ohne eine MHC Klasse I-Molekülexpression erkennen. Bei gleichzeitiger Präsenz stimulatorischer Signale auf der Zielzelle (RAE-1, Mult1) ist eine Zielzelleeliminierung möglich.

In *Mlh1*^{-/-}-Tieren auftretende Lymphome mit herunterregulierter MHC Klasse I-Expression müssten also auch einen Weg gefunden haben einer NK-Zell vermittelten (und/oder den $\gamma\delta$ -T-Zell-vermittelten) Immunantwort entgehen zu können. Daher wurden sämtliche Lymphome auf die Expression von stimulatorischen NK-Zell aktivierenden Liganden, wie RAE-1 (und Mult1) getestet. Zur Erkennung durch NK-Zellen müssen neben einem fehlenden inhibitorischen Signal (MHC Klasse I-Molekülexpression) auch diese stimulatorischen Liganden auf der Zielzelle exprimiert sein. Im Falle eines Ungleichgewichtes inhibitorischer und stimulatorischer Liganden (Disbalance) auf der Zielzelle, können die NK-Zellen in der Lage eine perforin-vermittelte Lyse auslösen (Diefenbach and Raulet 2002).

Tatsächlich war keines der untersuchten MHC Klasse I-negativen thymischen T-Zell Lymphome RAE-1-positiv. Die hier vorliegende „Balance-Situation“ verhindert somit eine NK-Zell vermittelte Zielzellerkennung und Eliminierung. Wir konnten in (fast) allen untersuchten T-Zell Lymphomfällen eben diese Balance-Situation nachweisen.

Die disseminierten T-Zell Lymphome exprimierten zumeist MHC Klasse I-Moleküle. Lediglich ein Fall war MHC Klasse I-negativ, exprimierte allerdings auch keinerlei RAE-1, so dass trotzdem eine balancierte Situation zwischen stimulatorischen und

inhibitorischen Signalen vorlag. Warum diese Lymphome (und auch die disseminierten B-Zell Lymphome) nicht durch die CTLs eliminiert werden, ist unklar. Der einzige Fall eine Disbalance fand sich in einem der untersuchten hämatopoetischen Lymphome: hier fehlte die MHC Klasse I-Molekülexpression, bei einer gleichzeitigen –wenn auch schwachen- RAE-1-Expression. Dieses disseminierte Lymphom exprimierte ausserdem Pax5.

Sämtliche B-Zell Lymphome trugen MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche und waren RAE-1-positiv. Auch diese Lymphomgruppe ist offensichtlich in der Lage, sich einer Erkennung und Eliminierung durch CTLs zu entziehen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse unserer Studien an den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen den Schluss zu, dass eine durch MMR-Defizienz hervorgerufene Lymphomagenese durchaus der Kontrolle durch das Immunsystem unterliegen und dass unterschiedliche Zellkompartimente des Immunsystems für die Lymphomabwehr verantwortlich sein könnten.

2. Tumorgenese immuninkompetenter Mäuse mit MMR-Defizienz

Die Ergebnisse der *Mlh1* defizienten Mäuse zeigen, dass das körpereigene Immunsystem einen Einfluß auf die MMR-defizienten Tumoren hat. In der Gruppe der T-Zell Lymphome fehlte den Tumoren die, für die Erkennung durch CTLs notwendige MHC Klasse I-Molekülexpression. Insbesondere die thymischen T-Zell Lymphome zeigten zudem eine Herunterregulation des NK-Zell-stimulatorischen Gens *Rae-1*.

Durch die fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression umgehen solche Tumoren einer Erkennung durch sind cytotoxische T-Zellen. Ein ausbalanciertes Verhältnis von MHC Klasse I-Expression und RAE-1 (beide herunterreguliert) verhindert ebenfalls die Zielzellerkennung durch andere Komponenten des Immunsystems, wie z.B. den NK-Zellen.

Um diese Prozesse bei der Immunantwort in MMR-defizienten Tumoren genauer zu verstehen und festzustellen durch welche Mechanismen die Lymphome einer Immunantwort ausweichen (und welche Komponenten des Immunsystems hierfür bedeutsam sind), wurden immundefiziente Mäuse sowie Tiere mit partiellen Immunsystemdefekten in die *Mlh1*^{-/-}-Mauspopulation, eingekreuzt. Analysiert wurden Kreuzungen von *Mlh1*^{-/-}-Mäusen mit β 2Mikroglobulin (*β 2m*^{-/-})-, Perforin (*pfp*^{-/-})- und Rag-defizienten (*Rag*^{-/-}) Tieren. Desweiteren wurden auch dreifachdefiziente Tiere, *β 2m*^{-/-} / *pfp*^{-/-} / *Mlh1*^{-/-}-Mäuse untersucht.

2.1. Tumoren von *Mlh1*^{-/-}-Mäusen scheinen einer Immunantwort auszuweichen

Mlh1 defiziente Mäuse entwickelten lymphoide Tumoren, die im Vergleich zu normalen Lymphozyten Expressionsunterschiede hinsichtlich der –für die Immunantwort relevante- Moleküle aufwiesen. In humanen HNPCC-Tumoren war vielfach eine herunterregulierte MHC Klasse I Molekülexpression feststellbar, die ein notwendiges Signal für die Immunantwort durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) darstellt. Wieso entstehen in den MMR-defizienten Mäusen Lymphome und warum lässt sich diese Beobachtung so selten in der humanen Situation feststellen? Um welche Immunzellkomponenten handelt es sich? Wie können die aufgetretenen verschiedenen Tumorentitäten durch unterschiedliche Zellen des Immunsystems kontrolliert, bzw. eliminiert werden?

Neben dem breiten Spektrum auftretender Lymphome in MMR defizienten Mäusen wurde auch die Gastrointestinaltumorentstehung dieser Tiere bewertet. Wie gezeigt, sind die Ähnlichkeiten zum HNPCC-Syndrom augenscheinlich, was durch Vergleiche morphologischer Charakteristika, Mikrosatelliteninstabilität und andere Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene belegt wurde (Reitmair, Redston et al. 1996; Edelmann, Yang et al. 1999). An HNPCC leidende Menschen haben eine bessere Überlebensprognose gegenüber Patienten mit sporadischen Kolorektalen Karzinomen. Dies erklärt sich nicht zuletzt durch die geringere Metastasierungstendenz MMR-defizienter Tumoren. Ansammlungen von TILs (Tumor Infiltrierende Lymphozyten) die in direkter Umgebung zum Tumor nachgewiesen wurden, sprechen zudem für eine körpereigene Immunantwort durch cytotoxische T-Zellen (Ropponen, Eskelinen et al. 1997). Desweiteren war in vielen gastrointestinalen Tumoren eine fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression

nachweisbar, was sich als möglichen Ausweichmechanismus der Tumorzellen interpretieren lässt, durch den diese der CTL-Abwehr entgehen.

β 2Mikroglobulin-Mutationen beim Menschen wurden auch in etwa 1/3 (8/28) Mismatch Reparatur-defizienten (MMR+) gastrischen Karzinomen beschrieben (Yamamoto, Perez-Piteira et al. 1999), also Tumoren die aufgrund von Mismatch-Reparatur-Defizienz entstanden und durch Mikrosatelliteninstabilität charakterisiert wurden. McEvoy et al. zeigten, dass etwa die Hälfte von 99 untersuchten Brustkarzinomen nur über eine eingeschränkte HLA Klasse I-Expression verfügte (McEvoy, Seshadri et al. 2002).

Bicknell et al. testeten 280 Tumoren (davon 147 colorektale Tumoren, 30 Melanome, 48 Brustkarzinome, 21 Ovarialkarzinome und 34 Lymphome) auf Mutationen im β 2Mikroglobulin-Gen. In nur neun der Kolorektalen Karzinome und bei einem Lymphom war eine Mutation des β 2Mikroglobulin-Genes feststellbar (Bicknell, Rowan et al. 1994).

Die aus der von uns durchgeführten Charakterisierung der Lymphome *Mlh1* defizienter Mäuse gewonnenen Erkenntnisse und die Daten aus der aus Mismatch Reparatur-Defizienz resultierenden Gastrointestinaltumorentstehung bei Menschen (sowie in anderen Mausmodellen), machen die Notwendigkeit für Modelle zur Klärung des Einflusses des Immunsystems bei den auf MMR-Defizienz basierenden Tumoren deutlich.

2.2. Reduziertes Auftreten von Lymphomen in $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen

In wieweit die Tumorabwehr von CTLs und/oder der Tumorantigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle abhängt, sollte durch Einkreuzen von β 2Mikroglobulin-Defizienz ($\beta 2m^{-}$) in die *Mlh1*⁻-Tiere gezeigt werden. Zu klärende Fragen waren, ob und wie sich das Tumorspektrum in $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren verändert und ob es zu zeitlichen Verschiebungen im Auftreten der verschiedenen Tumorentitäten kommt. Wie wirkt sich die hier fehlende MHC Klasse I Molekülexpression in den Zellen auf die Erkennung durch andere (Nicht-MHC Klasse I abhängige) Zellkomponenten des Immunsystems aus?

β 2Mikroglobulin-defiziente Mäuse verfügen über keine aktiven cytotoxische T-Zellen (CTLs). Darüber hinaus exprimieren die Zellen dieser Tiere keinerlei MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Diese beiden Merkmale machen eine cytotoxische T-Zell-vermittelte Tumorabwehr in den $\beta 2m^{-}$ -Tieren weitestgehend unmöglich.

Die β 2Mikroglobulin-Defizienz verhindert demnach eine Präsentation von Tumorantigenen durch MHC Klasse I Molekülen und die Immunantwort durch CTLs.

In den MMR-defizienten Mäusen wäre durch die β 2Mikroglobulin-Defizienz eine Tumorerkennung durch andere Zellkomponenten möglich, die bei normaler MHC Klasse I-Molekülexpression normalerweise nicht stattfindet. Hierzu gehören insbesondere die NK-Zellen, aber auch anderen Zelltypen, wie $\gamma\delta$ -T-Zellen und T-NK-Zellen für die die MHC Klasse I-Molekülexpression ein inhibitorisches Signal darstellt.

Die $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tiere zeigten zwei grundlegende Unterschiede gegenüber den $Mlh1^{-}$ -Tieren. Zum einen war die Anzahl an $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen, die ausschließlich Lymphome entwickelten, deutlich reduziert (Abb. 2.1.1.b). Zum anderen erkrankten die $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tiere vermehrt an Gastrointestinaltumoren, welche zudem früher als bei den $Mlh1^{-}$ -Vergleichspopulation auftraten (Abb. 2.1.1.c). Diese beiden Beobachtungen unterstreichen den Einfluss des Immunsystems auf die Tumorabwehr. Wie und wodurch die Tumoren bekämpft werden, scheint ausserdem von der Tumorart abhängig zu sein.

Das Lymphomspektrum in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren ähnelte –trotz der reduzierten Anzahl an Lymphomtieren- dem der $Mlh1^{-}$ -Population. Die genauere Betrachtung der Verhältnisse in den Untergruppen zeigte allerdings, dass der Anteil der disseminierten T-Zell Lymphome bei den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Lymphomtieren mit 10,5% deutlich geringer als bei den $Mlh1^{-}$ -Lymphomtieren (mit 31,4%) war (Abb.2.1.2.3.b). Im Gegensatz zu den $Mlh1^{-}$ -Tieren charakterisierten exprimierten die disseminierten T-Zell Lymphome keinerlei RAE-1. Das Fehlen RAE-1-exprimierender Lymphome in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren korrelierte ausserdem mit dem Fehlen der Gruppe TdT-/Rag-/Pax5+ Lymphome. Dieser in $Mlh1^{-}$ -Mäusen nachgewiesene Phänotyp trat bei den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren nicht mehr auf.

Die Bedeutsamkeit der Tumorantigenpräsentation via MHC Klasse I-Moleküle für die Tumorerkennung wurde auch in andere MMR-defizienten Mausmodellen, wie den $Tap1^{-}/Msh2^{-}$ -Mäusen gezeigt (de Wind, Dekker et al. 1998). TAP-Moleküle (Transporters associated with Antigen Processing) sind für den Transport von Polypeptiden ins Lumen des Endoplasmatischen Reticulums und deren Beladung auf die MHC Klasse I-Moleküle notwendig. Somit geht eine TAP-Defizienz mit einer fehlenden Antigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle einher. De Wind et al. zeigten dass $Tap1^{-}/Msh2^{-}$ -Mäuse ein verändertes Tumorspektrum gegenüber den $Msh2^{-}$ -Mäusen haben. Auch die $Tap1^{-}/Msh2^{-}$ -Mäuse entwickelten keine Lymphome mehr.

Für MMR-defiziente Mäuse stellt die fehlende der MHC Klasse I-Antigenpräsentation für die Ausbildung von Lymphomen ein Selektionskriterium dar. Für NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen dagegen kommt die fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression der Aufhebung des inhibitorischen Signals gleich. Die Eliminierung solcher Zellen wird bei gleichzeitiger Präsenz stimulatorischer Signale auf der Zielzelle, wie beispielsweise eine RAE-1-Expression möglich. Die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch NK- und $\gamma\delta$ -T-Zellen basiert also auf einem disbalancierten Verhältnis inhibitorischer und stimulatorischer Signale auf den Zielzellen. Die Bedeutsamkeit eine Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen wurde von Diefenbach und Raulet demonstriert (Diefenbach and Raulet 2002).

Folgerichtig exprimierte keines der in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren entstandenen T-Zell Lymphome RAE-1 (Balance-Situation). In $Mlh1^{-}$ -Vergleichsgruppe kamen solche Lymphome (mit RAE-1 und MHC Klasse I-Molekülexpression) vor.

Es gibt zwei Erklärungen für die reduzierte Lymphomentwicklung in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen: (i) Genotypbedingt kommen weniger T-Lymphozyten in den $\beta 2m$ defizienten Mäusen vor. Diese reduzierte Anzahl an Lymphozyten-Entitäten senkt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Lymphomerkrankung. (ii) Plausibler ist allerdings, dass Lymphome in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren effektiver durch das

Immunsystem eliminiert werden können. Fehlen die inhibitorischen MHC Klasse I-Signale und funktionelle cytotoxische T-Lymphozyten, wird die Abwehr durch beispielsweise die NK-Zellen (oder anderer Nicht-MHC Klasse I-beschränkter Lymphozyten) begünstigt. Für diese zweite Hypothese spricht ebenfalls das festgestellte Auftreten einer neuen Lymphomentität, disseminierter T-Zell Lymphome mit fehlender RAE-1-Expression. Das genotyp-bedingte Fehlen der MHC Klasse I-Molekülexpression geht offensichtlich mit der Notwendigkeit der Herunterregulation der stimulatorischen Signale in den Lymphomen der $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tiere einher. So war diese Lymphomgruppe in den $Mlh1^{-}$ -Tieren nicht nachweisbar.

Das die $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tiere keine MHC Klasse I-Moleküle exprimieren zeigt, dass sich die reduzierte Anzahl an T-Zell Lymphomen durch die Erkennung und Abwehr durch die Natürlichen Killerzellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen erklärt. Das Fehlen dieser, für die Immunabwehr wichtigen Gruppe der CTLs, führt nicht zu einem früheren oder vermehrten Auftreten dieser Lymphomart.

Betrachtet man die Subpopulationen der T-Zell Lymphome der $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mauspopulation wird ein weiterer Unterschied offensichtlich. Während in den $Mlh1$ defizienten Mäusen das Verhältnis disseminierter und thymischer T-Zell Lymphome in etwa gleich war, kam es bei den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen zu einer starken Reduktion disseminierter T-Zell Lymphome. Bei den $Mlh1^{-}$ -Tieren unterschieden sich die disseminierten T-Zell Lymphome von den thymischen T-Zell Lymphomen durch eine stabile Expression von MHC Klasse I-Molekülen auf der Lymphomzelloberfläche.

Die Ergebnisse erlauben den Schluss, dass die Nicht-MHC Klasse I-abhängigen Zellen (z.B. NK-Zellen) für die Eliminierung insbesondere der Gruppe der disseminierten T-Zell Lymphome in MMR-defizienten Mäusen verantwortlich sind. Den cytotoxischen T-Zellen scheint für die Abwehr - aufgrund von MMR-Defizienz entstandener - Lymphome keine, bzw. nur eine untergeordnete Rolle zuzukommen.

2.3. $\beta 2m$ -Defizienz beschleunigt die Gastrointestinaltumorgenese

Wie wirkt sich $\beta 2$ Mikroglobulin-Defizienz auf die Gastrointestinaltumorgenese aus? Das Fehlen von CTLs und MHC Klasse I-Molekülexpression in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Mäusen führte zu einem vermehrten und zeitlich deutlich beschleunigten Auftreten gastrointestinaler Tumoren. Innerhalb von etwa 31 Wochen erkrankten 50% der $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Gastrointestinaltumortiere, bei der $Mlh1^{-}$ -Vergleichspopulation lag das 50%-Überleben bei etwa 39 Wochen (Abb.2.1.1.c und Abb.2.1.1.d).

Die vorliegenden Ergebnisse der $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tiere bestätigen, dass cytotoxischen T-Zellen für Erkennung und Eliminierung aufgrund MMR-Defizienz entstandener epithelialer Tumoren verantwortlich sind. Die fehlende Antigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle einerseits, sowie die Abwesenheit funktioneller cytotoxischer T-Zellen in den $\beta 2m^{-}/Mlh1^{-}$ -Tieren resultieren in einer beschleunigten Entstehung von Gastrointestinaltumoren. Untersuchungen an verschiedenen humanen Tumoren belegen, dass ein Verlust der MHC Klasse I-Molekülexpression einen Ausweichmechanismus der Tumorzellen vor der Eliminierung durch cytotoxische T-Zellen darstellt. Insbesondere ist dies der Fall bei gastrointestinalen, aber auch in einigen hämatopoetischen Tumorerkrankungen. Es gibt verschiedene Mechanismen,

die zum vollständigen oder teilweisen Verlust der HLA-Expression führen. Diese MHC Klasse I-Verluste können bei jedem für die HLA-Synthese notwendigen Schritt auftreten: (i) der Synthese, (ii) dem Zusammenbau oder (iii) der Expression an der Zelloberfläche (Garcia-Lora, Algarra et al. 2003).

Nicht-MHC Klasse I-abhängige Immunzellen, wie beispielsweise die NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen sind anscheinend nicht für die Abwehr von MMR-defizienten Gastrointestinaltumoren verantwortlich. Die in $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren vorliegende fehlende MHC Klasse I-Expression allein reicht nicht für die Eliminierung der gastrointestinalen Tumoren durch NK- oder $\gamma\delta$ -T-Zellen der entstandenen epithelialen Tumoren. Einige Studien postulieren, dass eine Erkennung und Eliminierung von epithelialen Tumoren (z.B. gastrointestinale Karzinome) beim Menschen durch CTL erfolgt (Bicknell, Kaklamanis et al. 1996; Yamamoto, Yamashita et al. 2001). Das frühere Auftreten von gastrointestinalen Tumoren in den $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren gegenüber den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen bestätigt dies. Die frühzeitige Gastrointestinaltumorigenese führt zu einer kompensatorischen „Verdrängung“ der Lymphomereignisse.

2.4. Bereits $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse zeigen eine reduzierte Lymphomagenese

Im Gegensatz zu den $\beta 2m^{-/-}$ -Tieren ist bei den $\beta 2m^{+/-}$ -Tieren das Immunsystem intakt. Ihre cytotoxischen T-Zellen sind funktionell aktiv, sämtliche Zellen $\beta 2m^{+/-}$ -Tiere exprimieren MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Lediglich die Möglichkeit einer Inaktivierung aufgrund Mutationen im verbliebenen $\beta 2$ Mikroglobulin-Allel erhöht. Eine Mutation des intakten $\beta 2$ Mikroglobulin-Gens hätte den Verlust der MHC Klasse I-Molekülexpression zur Folge. Mit Hilfe dieses Modells konnte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle die MHC Klasse I-Molekülexpression für die Entstehung auf MMR-Defizienz basierender Tumoren spielt.

Die Beobachtung der $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mauspopulation brachte zwei Hauptunterschiede zu Tage: (i) die Häufigkeit der Lymphomentstehung war in diesen Tieren verringert (46,2% gegenüber 52,6% bei den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren), (ii) Tiere mit Gastrointestinaltumoren traten vermehrt auf (Tab.2.1.4.b).

Alle von uns untersuchten 26 Tiere erkrankten innerhalb von 43 Wochen an der Ausbildung von Tumoren. 53,8% der Tiere entwickelten Gastrointestinaltumoren, 23,1% lymphoide Tumoren und 23,1% beide Tumorarten. Die Gesamtüberlebenskurve der $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse entsprach weitestgehend der Überlebenskurve $Mlh1$ -defizienter Tiere (Abb.2.1.4.a).

Die Gastrointestinaltumorigenese in den $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen zeigte, dass diese nur unwesentlich früher als in der $Mlh1^{-/-}$ -Vergleichspopulation stattfand. Dies spricht für die Bedeutung der CTLs bei der Abwehr epithelialer Tumoren. Hinsichtlich der MHC Klasse I-Molekülexpression wurden die Gastrointestinaltumoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Was ist die Ursache für die reduzierte Anzahl an Lymphomentwickelnden Tieren bei den $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen? Hierzu muss eine separate Betrachtung der einzelnen Lymphomgruppen (und Subgruppen) vorgenommen werden.

Insbesondere die Gruppe der disseminierten T-Zell Lymphome (und der hämatopoetischen Lymphome) war bei den $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen (wie auch den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen) reduziert. Eine weitere Besonderheit dieser Lymphomgruppe war, die in den disseminierten T-Zell Lymphomen fehlende Expression von Pax5, TdT oder Rag. Bedeutsamer erscheint jedoch, dass diese disseminierten T-Zell Lymphome zwar MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, aber keinerlei RAE-1 Expression (Disbalance) aufzeigten. Es traten also nur solche disseminierte T-Zell Lymphome auf, die keiner Erkennung durch Nicht-MHC I-beschränkte Zellen (durch Fehlen des stimulierenden Liganden RAE-1) unterlagen. Geht man bei den $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren von der Funktionstüchtigkeit der cytotoxischen T-Lymphozyten aus, heisst dies, dass sich ein reduziertes Auftreten der disseminierten T-Zell Lymphome folglich durch eine effektive Eliminierung dieser Lymphomsubgruppe durch cytotoxische T-Zellen begründet. Dass die einzigen beiden gefundenen disseminierten T-Zell Lymphome MHC Klasse I-Moleküle exprimierten, deutet auf mögliche andere Ausweichmechanismen des Tumors hin. Bei den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen war diese Subgruppe an Lymphomtieren die vorherrschende Gruppe unter den disseminierten T-Zell Lymphomen. In den beiden $\beta 2$ Mikroglobulin-Mauslinien ($\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ und $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$) dagegen kamen solche Lymphome nur selten vor.

Sämtliche thymischen T-Zell-Lymphome zeigten eine Herunterregulation in der MHC Klasse I-Molekülexpression, bei gleichzeitigem Fehlen der RAE-1-Genexpression. Obwohl eine Reduktion in dieser Lymphomgruppe nicht feststellbar war, lässt sich nicht ausschliessen, dass thymische T-Zell Lymphome nicht der Regulation durch Nicht-MHC Klasse I beschränkte Lymphozyten unterliegen. Vielmehr scheint für diese Lymphome die herunterregulierte MHC Klasse I-Molekülexpression ein bedeutsameres Ereignis in der Tumorgenese zu sein, welches unabhängig von der Präsenz cytotoxischer T-Lymphozyten ist.

Die Bedeutsamkeit der MHC Klasse I-Expression für die Tumorerkennung einerseits und die Herunterregulierung der MHC Klasse I-Molekülexpression als möglicher Ausweichmechanismus der Tumorzellen vor einer Abwehr durch cytotoxische Lymphozyten wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Garcia-Lora, Algarra et al. 2003). Eine veränderte Expression der MHC Klasse I-Untereinheiten kann die normale MHC I-Molekülexpression auf der Zelloberfläche der Zielzellen beeinträchtigen und so die T-Zell- und die NK-Zell-vermittelte Immunantwort beeinflussen.

Die Ergebnisse implizieren, dass die Nicht-MHC-Klasse I-beschränkten Zellen des Immunsystems, die NK- und/oder $\gamma\delta$ -T-Zellen, für die Eliminierung der Lymphom-Subgruppe thymischer T-Zell Lymphome verantwortlich ist, da ausschliesslich bei diesen Lymphomen eine Balance-Situation vorlag (die MHC Klasse I Oberflächenexpression und die Expression von RAE-1 fehlte). Dies bestätigt die Vermutung, dass es in den $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen zur Tumorausbildung lymphoider Zellen frühzeitig zu einem Verlust des wildtypischen $\beta 2$ Mikroglobulin-Allels kommen muss. Diese Zellen wären für eine Immunantwort durch CTLs nicht mehr präsent. Die daraus resultierende fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression, die die Erkennung und Eliminierung durch NK-Zellen des Immunsystems begünstigt wird durch Herunterregulation des stimulatorischen Liganden RAE-1 amortisiert.

2.5. Verstärkte Lymphomentstehung in *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen

Die perforin-vermittelten Immunantwort (auch „Granenzyme pathway“) ist ein wichtiger Abwehrmechanismus, über den sowohl CTLs als auch NK-Zellen in der Lage sind potentielle Zielzellen zu eliminieren. Ein mutiertes oder ausgeschaltetes Perforin-Gen führt zum Fehlen der perforin-vermittelten Immunantwort. Über verschiedene Pathways können cytotoxische T-Zellen und NK-Zellen potentielle Zielzellen eliminieren. Der „sekretorische Pathway“ (die Exozytose von Perforin- und Granenzymen enthaltener Granula) sowie die Fähigkeit durch Mitglieder der „tumor necrosis factor (TNF) rezeptor family“ (wie Fas, TNF und TRAIL) Apoptose auszulösen, sind die beiden am besten beschriebenen Mechanismen (Lehmann, Zeis et al. 2000).

Durch das Einkreuzen von Perforin-Defizienz in die *Mlh1*^{-/-}-Mäuse konnte der Einfluß dieses Eliminierungsmechanismus auf die Tumorgenese in den *Mlh1*^{-/-}-Tieren untersucht werden. Zwei Effekte bewirkte die Perforin-Defizienz in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren: (i) einen starken Anstieg in der Anzahl an Tieren, die Lymphome ausbildeten und (ii) eine beschleunigte Gastrointestinaltumorgenese.

53,1% der Tiere entwickelten lymphoide Tumoren, 18,8% gastrointestinale Tumoren und 28,1% der Tiere beide Tumorarten (Tab. 2.2.1.c). Das zeitliche Auftreten der lymphoiden Tumoren der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren entsprach dem der *Mlh1*^{-/-}-Lymphomtiere. Die gastrointestinalen Tumoren in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren traten wesentlich früher als bei der entsprechenden *Mlh1*^{-/-}-Vergleichspopulation auf. Der insgesamt starke Effekt auf die Lymphomentwicklung wirkte sich auf alle Lymphomgruppen gleichermaßen aus und unterschied sich hinsichtlich des Lymphomspektrums nicht wesentlich von den *Mlh1*^{-/-}-Tieren (Tab.2.2.2.1.a).

Eine erhöhte Anzahl an Lymphomen, sowie die beschleunigte Gastrointestinaltumorgenese in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen zeigt, das die Perforin-vermittelte Immunantwort der dominierende Abwehrmechanismus für die Tumorentstehung in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen ist. Viele Lymphome, die in den *Mlh1*^{-/-}-Tieren erkannt und eliminiert werden, können sich in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren anscheinend aufgrund der Perforin-Defizienz ausbilden.

Die detailliertere Betrachtung der immunphänotypisch unterteilten T-Zell Lymphome (Abb. 2.2.2.1.b) zeigte folgende Unterschiede im Verhältnis einzelner T-Zell Subgruppen der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere im Vergleich mit den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen:

- (i) Unter den thymischen T-Zell Lymphomen kamen vermehrt doppelt positive (CD 4+/CD 8+) thymische T-Zell Lymphome vor.
- (ii) Die Anzahl disseminierter T-Zell Lymphome war deutlich reduziert.
- (iii) Die Gruppe der disseminierten B-Zell Lymphome erschien sowohl hinsichtlich Häufigkeit, als auch der molekularen Charakteristika unverändert gegenüber den *Mlh1*^{-/-}-Mäusen.

Obwohl eine perforin-vermittelte Zielzellyse weder durch cytotoxische T-Zellen noch durch NK-Zellen (via Granenzym-Pathway) möglich ist, weisen viele T-Zell Lymphome eine herunterregulierte MHC Klasse I-Molekülexpression auf. Dies zeigt, dass insbesondere für diese Lymphomgruppe das Fehlen von MHC Klasse I-Molekülen ein integraler Bestandteil in der Tumorentwicklung ist.

Die thymischen T-Zell Lymphome exprimierten keine MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche und waren RAE-1-negativ (Abb. 2.2.2.2.b). In jedem Fall lag also eine Balance-Situation zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen auf den Tumorzellen vor, die eine Erkennung/Eliminierung der Tumoren durch Nicht-MHC-Klasse I-beschränkte Immunzellen (wie z.B. die NK-Zellen) verhindert. Dies spricht für die Bedeutsamkeit der NK-Zellen für die Eliminierung der -aufgrund von MMR-Defizienz entstandenen- thymischen T-Zell Lymphome.

Daneben lag eine Reduktion in der Anzahl der CD 4 einfach positiven disseminierten T-Zell Lymphome (8,7%) vor (Tab.2.2.2.1.a). Geht man von der Erkennung und Eliminierung dieser T-Zell Subgruppe durch cytotoxische T-Zellen aus, weist diese Reduktion in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren auf eine untergeordnete Bedeutung der perforin-vermittelten Zielzellyse bei speziell dieser Lymphomart hin. Andere Eliminierungsmechanismen, wie Fas, TNF und TRAIL könnten hier stattdessen in den Vordergrund treten. Studien über die Tumorüberwachung durch das Immunsystem in Perforin-defizienten Mäusen zeigten, das die Perforin-induzierte Zielzell-Lyse notwendig für eine erfolgreiche Eliminierung von Tumorzellen ist, wogegen der Fas-Pathway eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Smyth and Snook 1999).

Das 50%-Überleben der Gastrointestinaltumortiere der *Mlh1*^{-/-}-Mäuse lag bei ~39 Wochen, in *pfp*^{-/-} *Mlh1*^{-/-}-Mäusen war es auf 29 Wochen reduziert (Abb. 2.2.1.c). Die beschleunigte Gastrointestinaltumorgenese in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tieren (neben den vorliegenden Resultaten über die *β2m*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}- und *β2m*^{+/-}/*Mlh1*^{-/-}-Tiere) unterstreichen die Bedeutung des Granenzym-Pathways für die Eliminierung von Gastrointestinaltumoren durch cytotoxische T-Zellen (CTLs).

2.6. Kumulativer Effekt durch gekoppelte *pfp*- und *β2m*-Defizienz in *Mlh1*^{-/-}-Tieren

Wie die Ergebnisse der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse zeigen, ist die Perforin vermittelte Zielzell-Lyse (Sektretorischer Pathway) bedeutend für die Eliminierung von Lymphomen und gastrointestinalen Tumoren. Unter Berücksichtigung der Resultate der *β2*Mikroglobulin-Mäuse wird deutlich, dass den NK-Zellen und den CTLs je nach auftretender Tumorart eine unterschiedliche Gewichtigkeit in Bezug auf Tumorabwehr zukommt.

Um nun den Einfluss der MHC Klasse I-Molekül-Expression für die Tumorerkennung zu untersuchen, wurde neben der Perforin-Defizienz zusätzlich *β2*Mikroglobulin-Defizienz in die *Mlh1*-defizienten Mäuse eingekreuzt. Die in den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}/*β2m*^{-/-}-Mäusen vorliegende Situation kennzeichnet sich also durch:

- (i) die Abwesenheit cytotoxischer T-Zellen,
- (ii) einem Fehlen von MHC Klasse I-Molekülen in sämtlichen Zellen und
- (iii) dem Ausschluß der Möglichkeit einer perforin-vermittelten Zielzellyse
- (iv) einem, auf MMR-Defizienz basierenden Tumorphänotyp.

Insbesondere hinsichtlich der Lymphom-Entstehung wäre bei den *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}/*β2m*^{-/-}-Mäusen ein vermehrtes Auftreten von Tumoren zu erwarten, vorzugsweise in der Gruppe der thymischen T-Zell Lymphome. Diese Gruppe scheint anhand der zuvor

untersuchten Mausmodelle am ehesten einer Perforin-vermittelten Abwehr der NK-Zell-Kontrolle zu unterliegen. In der Tat entwickelten 89,6% (26 von 29 Fälle) aller $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Mäuse Lymphome (Tab. 2.3.1.b). Das Verhältnis von T- zu B-Zell Lymphomen und hämatopoetischen Lymphomen war weitestgehend unverändert. Betrachtet man jedoch die Subgruppe der T-Zell Lymphome genauer, fallen deutliche Unterschiede zu den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren auf. Von 54,2% T-Zell Lymphomen (gegenüber 61,7% bei $Mlh1^{-/-}$ -Tieren) waren 50% thymische T-Zell Lymphome und nur 4% disseminierte T-Zell Lymphome (Tab.2.3.2.a). Das Verhältnis thymischer zu disseminierten T-Zell Lymphome bei den $Mlh1^{-/-}$ -Tieren lag bei 28,5% zu 31,0%. Diese deutliche Erhöhung in der Anzahl thymischer T-Zell Lymphome bei den $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen weist ebenfalls auf die dominierende Bedeutung der Perforin-vermittelten Abwehr von durch MMR-Defizienz entstandener Lymphome durch Natürliche Killerzellen hin.

Für die beobachtete Reduktion in der Gruppe der disseminierten T-Zell Lymphome gibt es zwei Erklärungen: (i) Ein artifiziell entstandener Effekt, die Anzahl der thymischen T-Zell Lymphome ist stärker angewachsen und dominierte über die Entstehung der disseminierten T-Zell Lymphome. (ii) Wahrscheinlicher ist jedoch, das insbesondere die disseminierten T-Zell Lymphome durch cytotoxische T-Zellen erkannt und eliminiert werden. In den dreifach-defizienten ($pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$) Mäusen sind eben diese nicht mehr vorhanden. Rückwirkend betrachtet bedeutet dies für die doppelt-defizienten $pfp^{-/-} Mlh1^{-/-}$ - sowie die $pfp^{+/-} Mlh1^{-/-}$ -Tiere, das speziell für die Abwehr disseminierter T-Zell Lymphome die Perforin-vermittelte Zielzell-Lyse eher eine untergeordneter Bedeutung hat. Sowohl in den $pfp^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ - als auch den $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren lag eine Reduktion in dieser Lymphomgruppe vor.

Bemerkenswerterweise exprimierte keines der untersuchten T-Zell Lymphome der $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Tiere RAE-1. Die Herunterregulation NK-Zell spezifischer stimulatorischer Liganden ist offensichtlich trotz der fehlenden Möglichkeit einer Zielzelleliminierung (über den „sekretorischen Pathway“), ein für die Entwicklung der T-Zell Lymphome notwendiger Schritt. Die Perforin-vermittelte Zelllyse kommt anscheinend nicht als einziger Mechanismus in Frage, über den Natürliche Killerzellen lymphoide Tumoren abwehren.

Neben der vermehrten Anzahl an Lymphomen in $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen ging die Reduktion in der Anzahl an Gastrointestinal-Tumortieren einher, diese traten allerdings deutlich früher als in der $Mlh1^{-/-}$ -Vergleichspopulation auf (Tab. 2.3.1.e). Ähnlich wie in den $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Tieren heben diese Befunde die Bedeutsamkeit der cytotoxischen T-Zellen und die fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression hervor. Eine reduzierte Anzahl an auftretenden Gastrointestinaltumoren lässt sich durch einen Verdrängungseffekt durch die vermehrt auftretenden Tiere mit lymphoiden Tumoren erklären. Aufgrund ihres normalerweise späten Auftretens wird eine Etablierung der Gastrointestinaltumoren durch die beschleunigte Lymphomagenese verhindert, bzw. eingeschränkt.

Für die Bekämpfung von Gastrointestinaltumoren (wie bei den disseminierten Lymphomen) scheint der „sekretorische Pathway“ allerdings weniger bedeutsam zu sein. Andernfalls wäre ein deutlich früheres Auftreten dieser Tumoren in den $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen zu erwarten, als beispielsweise gegenüber den $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen.

2.7. Beschleunigte Gastrointestinal- und aggressivere Lymphomagenese in *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Tieren

Ein weiteres Modell zur Untersuchung des Einflusses der Immunabwehr auf Tumoren von MMR-defizienten Mäusen ist die *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Maus. *Rag^{-/-}*-Tiere entwickeln keine reifen T- und B-Zellen. Die Entwicklung der lymphoiden Vorläuferzellen wird im Thymus, bzw. im Knochenmark unterbrochen. Die Immunantwort über das adaptive Immunsystem (durch T- und B-Lymphozyten) ist in diesen Tieren somit nicht mehr möglich. Soweit bekannt, sind die Natürlichen Killerzellen (innates Immunsystem) in diesen Mäusen intakt, so daß die Situation einer eingeschränkten Immundefizienz vorliegt.

Einkreuzen der *Rag* defizienten Tiere in die *Mlh1^{-/-}*-Maus führt zu immunkompromitierten Nachkommen mit Tumorphänotyp. Aufgrund des Fehlens von cytotoxischen T-Zellen wäre (gestützt durch Befunde an anderen Mausmodellen) ebenfalls eine beschleunigte Tumorgenese zu erwarten.

Tatsächlich erkrankten die *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäuse deutlich früher als *Mlh1^{-/-}*-Tiere (Abb.2.1.4.a). Von insgesamt 42 untersuchten *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäusen (Tab.2.4.1.c) entwickelten 19,1% der Tiere gastrointestinale Tumoren, 45,2% Lymphome und 35,7% beide Tumorarten (Lymphome und Gastrointestinaltumoren). Erklären lässt sich diese Reduktion in der Anzahl an Tieren mit Gastrointestinaltumoren durch einen überlagernden Effekt durch die stark vermehrt aufgetretenen Lymphomereignisse. Trotz der verringerten Anzahl an Tieren in der Gruppe der Gastrointestinaltumor-Gruppe (Abb. 2.4.1.b), war die Gastrointestinal-Tumorgenese gegenüber der *Mlh1^{-/-}*-Vergleichspopulation beschleunigt.

Die prozentuale Verteilung der verschiedenen Lymphomgruppen unterschied sich deutlich zu dem der *Mlh1^{-/-}*-Tiere (Tab. 2.4.2.1.2.a). Die Mehrzahl der Lymphome der *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäuse waren mit 66,7% B-Zell Lymphome. Die bei diesen Tieren häufig beobachtete Hinterbeinparalyse wurde durch starke Lymphozyteninfiltrationen in das Muskelgewebe im Bereich der unteren Wirbelsäule verursacht. Diese Befunde streichen die Bedeutung der cytotoxischen T-Zellen für die Eliminierung dieser aggressiv wachsenden B-Zell Lymphome (also des adaptiven Immunsystems) heraus.

T-Zell Lymphome manifestierten sich bei den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäusen ausschließlich im Thymus (Abb.2.4.2.1.4.a). Bei insgesamt 60% der Tiere dieser Lymphomgruppe fehlte die MHC Klasse I-Molekülexpression. Keines der untersuchten T-Zell Lymphome exprimierte RAE-1 (Abb.2.4.2.3.2.a). Das Auftreten dieser Lymphomgruppe mit ihrer veränderten Expression (von MHC Klasse I und RAE-1) spricht ebenfalls für die dominierende Rolle der Natürlichen Killerzellen bei der Abwehr dieser T-Zell Lymphom-Subgruppe. Eine vorherrschende Bedeutung der CTLs ließe bei den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Tieren ein gehäuftes Auftreten in der Gruppe der disseminierten T-Zell Lymphome erwarten.

Keines der untersuchten *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Tiere entwickelte disseminierte CD 4+ oder doppelt negative T-Zell Lymphome. Da *Rag* defiziente Tiere genotypbedingt keine reifen T- oder B-Zell-Lymphozyten entwickeln und die Ausreifung von T-Zell Lymphozyten im Thymus erst abgeschlossen sein muß, bevor diese Zellen in die Peripherie entlassen werden können, ist dies eine mögliche Ursache für die verringerte Anzahl auftretender disseminierter Lymphome.

Die beschleunigte Gastrointestinaltumorgenese in den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Tieren (Tab. 2.4.1.1.a) bestätigt wiederum die Bedeutsamkeit der cytotoxischen T-Zellen bei der Erkennung und Abwehr epithelialer Tumoren. Hinsichtlich der Anzahl auftretender Gastrointestinaltumoren pro Tier und ihrer Mikrosatelliteninstabilität wurden die *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-, die *β2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}*- und die *Mlh1^{-/-}*-Tiere miteinander verglichen. Offensichtlich entstanden aufgrund des fehlenden adaptiven Immunsystems die gastrointestinalen Tumoren in den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Tieren deutlich früher als bei den *Mlh1^{-/-}*-Tieren. Auch war bei den *β2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Tieren die Anzahl an Gastrointestinaltumoren die pro Tier stark erhöht. Jedes *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Gastrointestinaltumortier entwickelte durchschnittlich 2,3 Tumoren, jedes *β2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Gastrointestinaltumortier 1,8 GI pro Tier. Bei den *Mlh1^{-/-}*-Mäusen wiesen mit 2,7 Gastrointestinaltumoren pro Tier die höchste GI-Tumorfrequenz auf. Der Vergleich mit den *Mlh1*-Mäusen ist nur eingeschränkt aussagekräftig, da in den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäusen die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Gastrointestinaltumoren aufgrund des verstärkten Auftretens von Lymphomen wesentlich niedriger war.

Bei den *Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}*-Mäusen zeigte sich auch ein geringerer Grad an Mikrosatelliteninstabilität in den Gastrointestinaltumoren, verglichen zu den *Mlh1^{-/-}*-Mäusen (Tab.2.4.2.2.1.a). Lediglich 85,2% der untersuchten Gastrointestinaltumoren wiesen Mikrosatelliteninstabilität (MSI) auf. Diese Befunde erlauben die Schlussfolgerung, dass Mikrosatelliteninstabilität zwar häufig mit MMR-Defizienz einhergeht, sie jedoch nicht in allen durch MMR-Defizienz auftretenden Tumoren Ausprägung finden muss. Als diagnostischer Marker ist die MSI-Analyse somit bei positiven Ergebnissen als zuverlässiges Kriterium für MMR-Defizienz zu bewerten, im Fall von MSI-negativen Befundungen lässt sich eine vorliegende MMR-Defizienz nicht ausschließen.

V Zusammenfassung / Summary

Das DNA-Mismatch-Reparatur-(MMR-) System ist das einzig bekannte postreplikativ arbeitende DNA-Reparatur-System. Es wurde gezeigt, dass die MMR-Aktivität für den Erhalt der genomischen Stabilität in Prokaryoten und Eukaryoten notwendig ist. Defekte in Genen des MMR-Systems (wie beispielsweise *MLH1* oder *MSH2*) wurden als Ursache für die Entstehung des hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC) und anderen Tumorarten beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Tumorgenese in *Mlh1* defizienten Mäusen (*Mlh1*^{-/-}) untersucht und eine umfassende Charakterisierung der hier auftretenden lymphoiden Tumoren vorgenommen. Desweiteren wurde die Bedeutung des Immunsystems für die Tumorgenese in *Mlh1* defizienten Mäusen durch Einkreuzen zusätzlicher Immundefizienzen erruiert.

Die auf einen reinen genetischen Hintergrund zurückgekreuzten *Mlh1*^{-/-}-Mäuse zeigten eine in zwei Wellen ablaufende Tumorgenese: Eine frühe Phase, in der Mäuse lymphoide Tumoren entwickelten und eine spätere Phase, in der die *Mlh1*^{-/-}-Tiere vorwiegend an Gastrointestinaltumoren erkrankten. Die Lymphome wurden mehrheitlich als Lymphome vom lymphoblastischen T- und B-Zelltyp charakterisiert. Die immunphänotypisch gruppierten Lymphomarten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Expression von Oberflächenmolekülen (MHC Klasse I, Rae-1), sowie der Expression verschiedener für die Entwicklung lymphoider Zellen bedeutsamer Gene (*TdT*, *Rag*, *Pax5*, *E2a*). Dies und die Unterteilung in Thymus-lokalisierte und disseminierte Lymphome ermöglichte uns eine detaillierte Subklassifizierung der Lymphome. Wir konnten zeigen, dass die *Mlh1* defizienten Mäuse ein breiteres Lymphomspektrum, als beispielsweise *Msh2* defiziente Tiere aufweisen. Neben den in *Msh2*^{-/-}-Mäusen auftretenden thymischen T-Zell Lymphomen, entwickelten die *Mlh1*^{-/-}-Tiere zusätzlich disseminierte T-Zell- und B-Zell-Lymphome.

Die als diagnostisches Kriterium für das hereditäre Kolorektale Karzinom (HNPCC) herangezogene Mikrosatelliteninstabilität eignet sich auch zur Identifizierung anderer, durch MMR-Defizienz entstandene Tumorarten. Eine Vielzahl der untersuchten Lymphome *Mlh1* defizienter Mäuse war mikrosatelliteninstabil (MSI). Die Tatsache, dass mikrosatellitenstabile (MSS) Lymphome in den *Mlh1*^{-/-}-Tieren vorkamen, impliziert aber auch, dass MMR-Defizienz nicht zwingend durch Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichnet sein muss. Es ist möglich, dass sich eine Mikrosatelliteninstabilität erst zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorentwicklung in MMR-defizienten Zellen manifestiert. Darauf deuten auch die MSI-Analysen der in den *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen frühzeitiger als in *Mlh1*^{-/-}-Mäusen auftretenden Gastrointestinaltumoren hin. Einige dieser untersuchten Gastrointestinaltumoren in den *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäusen waren mikrosatellitenstabil, wohingegen sämtliche Gastrointestinaltumoren der *Mlh1* defizienten Mauspopulation Mikrosatelliteninstabilität aufwiesen.

Einige Lymphome *Mlh1* defizienter Mäuse liessen sich auch durch eine fehlende MHC Klasse I-Molekülexpression charakterisieren. Diese Beobachtung deutet auf den Einfluss des Immunsystems auf die Erkennung und Eliminierung von (durch MMR-Defizienz entstandenen) Tumoren hin. Um die Art der Immunantwort und die verantwortlichen Komponenten des Immunsystems für die Abwehr MMR-defizienter

Tumoren einzugrenzen, wurden verschiedene immunkompromitierte oder immundefiziente Mauslinien in Mlh1 defiziente Mäuse eingekreuzt. Diese waren Mauslinien mit beta2Mikroglobulin- ($b2m^{-/-}$), Perforin- ($pfp^{-/-}$), beta2Mikroglobulin/Perforin- ($b2m^{-/-}/pfp^{-/-}$) und Recombination activation gene- ($Rag^{-/-}$) Defizienz. Häufig wurde in diesen Tieren eine Verschiebung im Tumorspektrum und ein beschleunigtes zeitliches Auftreten der Tumoren beobachtet. So entwickelten beispielsweise die Mehrzahl der $Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse eine aggressive Form disseminierter lymphoblastischer B-Zell Lymphome, ausserdem traten die Gastrointestinaltumoren früher als in der $Mlh1^{-/-}$ -Vergleichspopulation auf. Eine ebenfalls beschleunigte Entstehung von Gastrointestinaltumoren war auch in den $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -defizienten und den $b2m^{-/-}/pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäusen nachweisbar. Anhand dieser Modelle konnten wir demonstrieren, dass insbesondere die Regulierung der MHC Klasse I-Molekülexpression ein bedeutsamer Schritt für die Ausprägung verschiedener Lymphomarten ist, welcher das „Überleben“ der Tumorzellen gewährleistet. Auch die Notwendigkeit einer balancierten Expression von NK-Zell-stimulatorischen und –inhibitorischen Liganden auf der Tumorzelloberfläche, welche die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch Nicht-MHC Klasse I-abhängige Immunzellen (wie z.B. den Natürliche Killerzellen) reguliert, liess sich mit Hilfe der beta2Mikroglobulin- und Perforin-Mausmodelle aufzeigen.

Offensichtlich sind für die in Mlh1 defizienten Mäusen vorkommenden verschiedenen Tumorarten unterschiedliche zelluläre Komponenten und Abwehrmechanismen des Immunsystems für die Erkennung und Eliminierung verantwortlich. So beeinflussen insbesondere cytotoxische T-Zellen (CTLs) die Entstehung von Gastrointestinaltumoren in Mlh1 defizienten Mäusen. Für die lymphoiden Tumoren ergab sich ein divergentes Bild. Hier beschränkte sich der Einfluss der CTLs bei der Lymphomabwehr auf die Erkennung und Eliminierung disseminierter T- und B-Zell-Lymphome. Die in den $Mlh1^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesenen thymischen T-Zell Lymphome dagegen unterlagen der perforin-vermittelten Zellabwehr durch Nicht-MHC Klasse I-beschränkte Immunzellen (z.B. Natürlichen Killerzellen).

Die Relevanz der vorliegenden Mausmodelle wird deutlich, wenn man sich die Situation von immunsupprimierten Posttransplantationspatienten und immundefizienten HIV-Patienten vor Augen führt. Häufig beobachtet man in diesen Patientengruppen das Auftreten lymphoider Tumoren. Diese sind oftmals Mikrosatelliteninstabil, was auf eine vorliegende MMR-Defizienz hindeutet. Zudem zeigen diese Lymphome ähnliche Merkmale, wie die durch Mlh1-Defizienz entstandenen lymphoiden Tumoren. Insbesondere für Studien solcher Lymphome stellt die Mlh1-defiziente Maus mit den verschiedenen eingekreuzten Immundefizienzen ein geeignetes *in vivo* Model dar.

Summary

The DNA-Mismatch-(MMR-) Repair System is the only postreplicative working DNA repair system known so far. It was shown, that MMR activity is necessary for maintaining the genomic stability in prokaryotes and eukaryotes. Defects in MMR genes such as *MLH1* or *MSH2* were described in the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (HNPCC) and other tumors.

The aim of this thesis was the analysis of the tumorigenesis and a detailed characterization of the lymphoid tumors of Mlh1 deficient mice. Additionally, by crossing the *Mlh1*^{-/-}-mice with different immune compromised animals, the impact of the immune system on the tumorigenesis in Mlh1 deficient mice was studied.

The tumorigenesis in the *Mlh1*^{-/-}-mice (crossed on a pure genetic background) occurred in two waves: one early phase with predominant development of lymphoid tumors and a later phase characterized by mainly gastrointestinal tumors. The majority of lymphomas were histologically defined as lymphomas of a lymphoblastic T- and B-cell type. The lymphoma types grouped by immunophenotyping were different, depending on their expression of surface molecules (MHC class I, Rae-1) and genes that are relevant for the development of lymphoid cells (like *TdT*, *Rag*, *Pax5*, *E2a*). Based on these findings, and subgrouping the lymphomas according to their location (thymus-located and disseminated lymphomas) we found a broad spectrum of lymphoid tumors. In comparison to Msh2 deficient mice which exclusively developed thymic T cell lymphomas (and gastrointestinal tumors) we observed an additional appearance of disseminated T cell and B cell lymphomas in the Mlh1 deficient mouse population.

The analysis of microsatellite instability (MSI) as a hallmark of the human hereditary colorectal carcinoma (HNPCC) has been shown to represent an appropriate method for other tumor entities, as the majority of lymphomas in Mlh1 deficient mice were microsatellite instable. On the other hand, the finding of microsatellite stable (MSS) lymphomas implies that Mismatch Repair- (MMR-) deficiency is not necessarily characterized by microsatellite instability. One possible explanation might be that MSI in MMR deficient cells are manifested at a later timepoint of tumorigenesis. This notion is supported by the occurrence of microsatellite stable (MSS) gastrointestinal tumors found in *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-animals. All of the gastrointestinal tumors analyzed in *Mlh1*^{-/-}-mice were microsatellite instable (MSI) and arised later.

Frequently, lymphomas in *Mlh1*^{-/-}-mice were lacking the expression of MHC class I molecules. This finding suggests a possible influence of immune recognition and elimination of the MMR deficient tumors by the immune system. To narrow down the kind of immune response and the responsible components of the immune system involved in the recognition of MMR deficient tumors, we crossed immunocompromised or immunodeficient mouse strains into Mlh1 deficient mice. This were the beta2microglobulin-(*b2m*^{-/-}), perforin-(*pfp*^{-/-}), beta2microglobulin/perforin-(*b2m*^{-/-}/*pfp*^{-/-}), and recombination activation gene-(*Rag*^{-/-}) deficient strains. The additional immunodeficiencies, frequently led to a shifted spectra and onset of the tumors in the *Mlh1*^{-/-}-mice. The majoritiy of *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-mice developed an aggressive type of a lymphoblastic disseminated B cell lymphoma, and the gastrointestinal tumors occurred earlier then in the *Mlh1*^{-/-}-population. Regarding

gastrointestinal tumorigenesis, *pfp*^{-/-}/*Mlh*^{-/-}-deficient and *b2m*^{-/-}/*pfp*^{-/-}/*Mlh*^{-/-}-animals displayed similar effects.

The crucial importance of MHC class I molecule expression for the development of different lymphoma entities was shown by using these additional models. A regulation of MHC class I molecules is important for the tumor cell's survival. Consequently, crossing immunodeficiencies (*b2m*^{-/-} and/or *pfp*^{-/-}) into the *Mlh*^{-/-}-mice revealed the importance of a balanced expression of natural killer-(NK-) cell stimulatory and inhibitory ligands on the surface of tumor cells.

Obviously the different tumor entities observed in *Mlh*^{-/-} mice are controlled by different cellular components and mechanisms exerted through the immune system. The cytotoxic T cells (CTLs) had a strong impact on the gastrointestinal tumorigenesis in *Mlh*^{-/-} mice. A divergent situation was observed in the group of lymphoid tumors: the recognition and elimination by CTLs seemed to be restricted to the subgroups of disseminated T and B cell lymphomas, whereas the thymic T-cell lymphomas were eliminated by the Non-MHC class I-restricted immune cells (e.g. NK cells) via the perforin-mediated (granzyme) pathway.

The relevance of these mouse models becomes evident by a comparison of human lymphomas that are frequently found in immune-suppressed postransplantation patients and in HIV-patients. These lymphomas are mostly microsatellite instable, indicating an MMR deficiency. Thus, these tumors are displaying similar features compared to the lymphoid tumors of *Mlh*^{-/-}-mice, with the additional immunodeficiencies crossed in as described here representing an appropriate *in vivo* model for further studies.

VI Abkürzungsindex

ATP	Adenosintriphosphat
BSAP	B-lineage specific activator protein
β 2m	beta 2 Mikroglobulin
CA	Karzinom, carcinoma
CRC	Kolorektales Karzinom
CD 4+	CD 4 Oberflächenexpression
CD 8+	CD 8 Oberflächenexpression
CD 16	Fc Rezeptor für Ig G (auf NK-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen)
CD 56	NCAM (neural cell adhesion molecule); Marker für NK-Zellen und einige T-Lymphozyten
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DN	doppelt negativ (keine CD4- und CD8- Oberflächenexpression)
DP	doppelt positiv (CD4- und CD8- Oberflächenexpression)
E2A	early inducible factor 2A
ENU	ethylnitros-urea
EBF	early B cell factor
FACs	fluoreszenz activated cell sorting
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GI	Gastrointestinaltumor
GVL	graft versus leukemia
GVHD	graft versus host disease
HNPCC	Hereditary non polyposis colorectal cancer
Ig	Immun globulin
KIR	killer cell Ig-like receptors
L	Lymphom
LBL	large B cell lymphoma
LK / LN	Lymphknoten / lymph node
MACS	magnetic activated cell sorting
MEMO 1	(putative HLA class I) modifier of methylation gene
MHC I	Major histocompatibility complex I
Mlh1	MutL Homolog 1
Msh2	MutS Homolog 2
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
Mult1	Mouse UL16-binding protein-like transcript 1
n.d.	nicht durchgeführt
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Pax 5	Paired box (Pax) gene 5
pfp	Perforin
Rag	Recombination activation gene
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
TCR	T cell receptor
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
TNF	tumor necrosis factor
TIL	tumor infiltrating lymphocytes; Tumorerfiltrierende Lymphozyten

TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
RAE-1	Retinoic acid early inducible gene 1
RA	rheumatische Athritis
Rag	Recombination activation gene
RER+	replication error positive

VII Anhang

1. Mlh1^{-/-}-Mäuse

Immunphänotypisierungsergebnisse von Lymphomen Mlh1 defizienter Mäuse

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	CD 45R / CD 19	Ig D	Ig M	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 24	CD 45	MHC I	TER
55	Mlh1 ^{-/-}	32	GI + L	DP T-Zell Lymphom	NHL high grade	Thymus	-	-	-	+	+	+	+	n	n	n	n
56	Mlh1 ^{-/-}	15	L	DP T-Zell Lymphom	NHL	Thymus (Milz)	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
48	Mlh1 ^{-/-}	30	L	DP T-Zell Lymphom	NHL	Thymus	-	-	-	+	+	+	n	n	n	-	n
57	Mlh1 ^{-/-}	22	L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
58	Mlh1 ^{-/-}	13	L	DP T-Zell Lymphom	NHL	Thymus (Peripherie)	-	-	-	+	+	+	+	n	+	-	n
44	Mlh1 ^{-/-}	51	GI + L	CD 8+	n.d.	Thymus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
45	Mlh1 ^{-/-}	45	GI + L	CD 8+	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
46	Mlh1 ^{-/-}	15	L	CD 8+	NHL (Burkitt)	Thymus (LK)	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	n
47	Mlh1 ^{-/-}	19	L	CD 8+	NHL	Thymus (Peripherie)	-	-	-	+	-	+	n	n	n	n	n
49	Mlh1 ^{-/-}	18	L	CD 8+	n.d.	Thymus	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
50	Mlh1 ^{-/-}	27	GI + L	DN T-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
51	Mlh1 ^{-/-}	38	GI + L	DN T-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
52	Mlh1 ^{-/-}	14	L	DN T-Zell Lymphom	NHL	Milz	-	-	-	+	-	-	+	n	+	+	n
53	Mlh1 ^{-/-}	20	L	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
54	Mlh1 ^{-/-}	28	L	DN T-Zell Lymphom	NHL	Milz	-	-	-	+	-	-	n	+		n	
38	Mlh1 ^{-/-}	40	GI + L	CD 4+	NHL	Peripherie	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
39	Mlh1 ^{-/-}	25	L	CD 4+	NHL	Peripherie	-	-	-	+	+	-	+	n	n	+	n
40	Mlh1 ^{-/-}	20	L	CD 4+	LBL	Peripherie	-	-	-	+	+	-	+	n	n	n	n
41	Mlh1 ^{-/-}	20	L	CD 4+	NHL	Peripherie	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
42	Mlh1 ^{-/-}	22	L	CD 4+	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
43	Mlh1 ^{-/-}	17	L	CD 4+	LBL (rel. reife Z.)	Peripherie	-	-	-	+	+	-	+	n	n	+	n
59	Mlh1 ^{-/-}	48	GI + L	CD 3- / CD 45R-	mehrkernige Riesenzelle	Milz	-	-	-	-	-	-	-	+	n	n	n
60	Mlh1 ^{-/-}	25	GI + L	CD 3- / CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
61	Mlh1 ^{-/-}	17	L	CD 3- / CD 45R-	NHL	Thymus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	n
62	Mlh1 ^{-/-}	29	L	CD 3- / CD 45R-	NHL	Thymus (LK)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	n
28	Mlh1 ^{-/-}	21	L	B-Zell Lymphom	NHL	LK	+	-	+	-	-	-	n	+	n	n	n
29	Mlh1 ^{-/-}	25	L	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
30	Mlh1 ^{-/-}	28	L	B-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	+	-	-	-	-	-	-	n	+	+	n
31	Mlh1 ^{-/-}	30	L	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	- / +	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
32	Mlh1 ^{-/-}	20	L	B-Zell Lymphom	LBL; DLBL	Peripherie	+	-	+	-	-	-	-	n	n	+	n
33	Mlh1 ^{-/-}	37	GI + L	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz (LK)	+	-	+	-	-	-	-	n	n	n	n
34	Mlh1 ^{-/-}	21	L	B-Zell Lymphom	LBL	LK	+	n	n	-	-	-	n	n	n	n	n
35	Mlh1 ^{-/-}	25	L	B-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	n
36	Mlh1 ^{-/-}	23	L	B-Zell Lymphom	LBL NHL	Milz	+	-	+	-	-	-	-	n	n	n	n
37	Mlh1 ^{-/-}	34	L	B-Zell Lymphom	NHL	Milz	+	-	+	-	-	-	-	n	+	+	n

Tab. 1: Darstellung der Ergebnisse der Immunphenotypisierung von 35 untersuchten Lymphomen aus Mlh1 defizienten Mäusen.

Es fanden sich unterschiedliche T- und B-Zell Lymphome, sowie andere lymphoide Tumoren in den Mlh1 defizienten Mäusen. Die T- und B-Zell Lymphome ließen sich weiter subclassifizieren.

GI (gastrointestinale Tumoren), GI + L (Doppelereignis: gastrointestinale und lymphoide Tumoren); L (Lymphome); NHL (Non Hodgkin Lymphoma), LBL (Large B cell Lymphoma); LK (Lymphknoten); Peripherie (Lymphomereignis in Milz und/oder Lymphknoten nachweisbar); n (nicht durchgeführt);

Charakterisierung der Lymphome Mlh1 defizienter Tiere auf RNA-Ebene:

Lfd. Nr.	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	E2A	Pax5	Rag	TdT	RAE1	Mult 1	Tal 1	CDK4	Immunphänotypisierung
55	32	DP T-Zell-Lymphom	NHL high grade	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	n.d.
58	13	DP T-Zell-Lymphom	NHL	Thymus (Peripherie)	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
57	22	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
48	30	DP T-Zell-Lymphom	NHL	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
56	15	DP T-Zell-Lymphom	NHL	Thymus (Milz)	+	-	-	+	-	-	-	+	MHC I positiv
46	15	CD 8+ Lymphom	NHL (Burkitt)	Thymus (LK)	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I positiv
49	18	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
44	51	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
63	18	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
45	45	CD 8+ Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	-	+	+	+	MHC I positiv
47	19	CD 8+ Lymphom	NHL	Thymus (Peripherie)	+	+	+	+	+	+	-	+	n.d.
53	20	DN T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
50	27	DN T-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	-	-	-	+	-	+	MHC I positiv
52	14	DN T-Zell-Lymphom	NHL	Milz	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I positiv
65	25	DN T-Zell-Lymphom	n.d.	LK	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I positiv
51	38	DN T-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	-	-	-	-	+	+	MHC I positiv
43	17	CD 4+ Lymphom	LBL (relativ reife Z.)	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I positiv
40	20	CD 4+ Lymphom	LBL	Peripherie	+	+	-	-	+	+	-	+	n.d.
41	20	CD 4+ Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I positiv
39	25	CD 4+ Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I positiv
42	22	CD 4+ Lymphom	n.d.	Peripherie	+	-	-	-	-	+	+	+	MHC I negativ
38	40	CD 4+ Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I positiv
35	25	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	-	-	+	+	-	-	MHC I positiv
36	23	B-Zell-Lymphom	LBL NHL	Milz	+	+	+	-	+	+	-	+	n.d.
32	20	B-Zell-Lymphom	LBL, DLBL	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	-	MHC I positiv
31	30	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	+	+	+	+	-	+	MHC I positiv
29	25	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	+	+	+	-	+	MHC I positiv
33	37	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz (LK)	+	+	-	-	-	+	-	+	n.d.
30	28	B-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	-	-	-	+	+	+	MHC I positiv
59	48	CD3- CD45R-	mehrkernige Riesenzelle	Milz	+	-	-	-	-	-	+	+	n.d.
61	17	CD3- CD45R-	NHL	Thymus	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I negativ
60	25	CD3- CD45R-	n.d.	Peripherie	+	+	+	+	+	-	-	+	MHC I positiv
64	22	CD3- CD45R-	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
62	29	CD3- CD45R-	NHL	Thymus (LK)	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I positiv

Tab. 2: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse von 34 untersuchten Lymphomen Mlh1 defizienten Mäusen.

„+“ (Expressionsbande vorhanden), „-“ (keine Expressionsbande vorhanden).

NHL (Non Hodgkin lymphoma), LBL (Large B cell lymphoma), DLBL (diffuse large B cell lymphoma), n.d. (nicht durchgeführt). MHC I positiv/negativ (Immunphenotypisierungsergebnisse: MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche detektiert/nicht detektiert).

2. $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse

Alle untersuchten Tiere:

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Histologie	Lymphom entwickelt in
31	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	24	Gastrointestinaltumor		
32	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	26	Gastrointestinaltumor		
33	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	27	Gastrointestinaltumor		
34	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	27	Gastrointestinaltumor		
35	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	30	Gastrointestinaltumor		
36	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	30	Gastrointestinaltumor		
37	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	32	Gastrointestinaltumor		
38	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	32	Gastrointestinaltumor		
39	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	35	Gastrointestinaltumor		
40	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	36	Gastrointestinaltumor		
41	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	36	Gastrointestinaltumor		
42	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	38	Gastrointestinaltumor		
43	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	39	Gastrointestinaltumor		
44	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	40	Gastrointestinaltumor		
45	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	40	Gastrointestinaltumor		
46	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	40	Gastrointestinaltumor		
47	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	45	Gastrointestinaltumor		
66	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	43	Gastrointestinaltumor		
30	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	44	Gastrointestinaltumor und Lymphom	Plasmozytose	LK
67	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	31	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Peripherie
48	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	20	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus
49	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	33	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus
50	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	27	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus
51	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	24	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
52	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	27	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus
53	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	33	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Milz
54	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	34	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	LK
55	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	19	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Milz
56	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	26	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Milz
57	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	33	Gastrointestinaltumor und Lymphom	NHL	Peripherie
58	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	18	Lymphom	n.d.	LK
59	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	19	Lymphom	n.d.	Thymus
60	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	21	Lymphom	n.d.	Thymus
61	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	34	Lymphom	NHL, wie Burkitt	Thymus
62	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	37	Lymphom	n.d.	Peripherie
63	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	68	Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
64	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	18	Lymphom	n.d.	Thymus and Periphery
65	$\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$	13	Lymphom	n.d.	Thymus

Tab. 3: Übersicht aller 38 untersuchten $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse. Histologische Befundung der Lymphome.

n.d. nicht durchgeführt, LK Lymphknoten, NHL Non Hodgkin Lymphom, $\beta 2m$ $\beta 2$ Mikroglobulin

Immunphänotypisierung:

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorarten	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	CD 45R	Ig D	Ig M	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 24	CD 45	MHC I	TER
64	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	18	L	DP T-Zell_Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
48	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	20	GI + L	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
50	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	27	GI + L	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
51	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	24	GI + L	DP T-Zell_Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
52	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	27	GI + L	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
60	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	21	L	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	-	n	n	+	+	+	+	+	+	-	-
63	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	68	L	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
65	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	13	L	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
61	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	34	L	CD 8+ Lymphom	NHL, wie Burkitt	Thymus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	n
49	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	33	GI + L	CD 4+ Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
58	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	18	L	CD 4+ Lymphom	n.d.	LK	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
62	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	37	L	CD 4+ Lymphom	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
56	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	26	GI + L	CD 3- / CD 45R-	n.d.	Milz	-	-	-	-	-	-	-	+	n	n	+
57	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	33	GI + L	CD 3- / CD 45R-	NHL	Peripherie	-	n	n	-	-	-	-	n	+	-	n
53	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	33	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz	+/+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
54	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	34	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	LK	+/-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
55	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	19	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
67	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	31	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	LK	+/-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	n
30	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	44	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	LK	+	n	n	-	-	-	+	n	n	n	n

Tab. 4: Darstellung der Ergebnisse der Immunphänotypisierung von 19 untersuchten Lymphomen $\beta 2m1^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse. Die Tiere entwickelten B-Zell- und T-Zell-Lymphome, sowie lymphoide Lymphome (CD 3- / CD 45R-). Die Mehrzahl dieser Lymphome wies Charakteristika unreifer lymphoider Zellen auf.

NHL (Non Hodgkin Lymphoma), LBL (Large B cell Lymphoma), n.d. (nicht durchgeführt); LK (Lymphknoten); Peripherie (Lymphomereignis in Milz und/oder Lymphknoten nachweisbar); n (nicht durchgeführt).

Genexpressionsprofil:

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	E2A	Pax 5	Rag	TdT	RAE 1	Mult 1	Tal 1	CDK 4	Immunphänotypisierung
48	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	20	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
60	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	21	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
52	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	27	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	-	-	+	MHC I negativ
64	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	18	DP T-Zell_Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
50	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	27	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
51	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	24	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	+	-	-	-	+	MHC I negativ
63	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	68	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
65	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	13	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
61	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	34	CD 8+ Lymphom	NHL, wie Burkitt	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
62	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	37	CD 4+ Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	+	-	-	-	-	+	MHC I negativ
49	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	33	CD 4+ Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
55	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	19	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I negativ
54	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	34	B-Zell-Lymphom	n.d.	LK	+	+	+	+	+	+	-	+	MHC I negativ
30	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	44	B-Zell-Lymphom	n.d.	LK	+	+	-	-	-	-	+	+	n.d.
53	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	33	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz	+	+	+	-	+	+	+	+	MHC I negativ
56	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	26	CD 3- / CD 45R-	n.d.	Milz	+	+	-	-	+	+	+	+	n.d.
57	$\beta 2m^{-/-} / Mlh1^{-/-}$	33	CD 3- / CD 45R-	NHL	Peripherie	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I negativ

Tab. 5: Zusammenfassung aller Expressionsdaten der $\beta 2m^{-/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse.

+/- (exprimiert / nicht exprimiert);

3. $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse

<i>Lfd. Nr.</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Alter [Wochen]</i>	<i>Tumorart</i>	<i>Histologie</i>	<i>Lymphom entwickelt in</i>
1	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	19	Gastrointestinaltumor		
2	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	26	Gastrointestinaltumor		
3	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	29	Gastrointestinaltumor		
4	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	32	Gastrointestinaltumor		
5	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	33	Gastrointestinaltumor		
6	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	34	Gastrointestinaltumor		
7	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	35	Gastrointestinaltumor		
8	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	39	Gastrointestinaltumor		
9	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	40	Gastrointestinaltumor		
10	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	42	Gastrointestinaltumor		
11	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	42	Gastrointestinaltumor		
12	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	42	Gastrointestinaltumor		
13	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	43	Gastrointestinaltumor		
14	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	48	Gastrointestinaltumor		
15	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	44	Gastrointestinaltumor und Lymphom	NHL	Thymus
16	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	37	Gastrointestinaltumor und Lymphom	NHL	Thymus; LN NHL
17	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	44	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	LK
18	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	31	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Peripherie
19	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	36	Gastrointestinaltumor und Lymphom	NHL	Peripherie
20	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	29	Gastrointestinaltumor und Lymphom	NHL	Peripherie
21	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	22	Lymphom	NHL	Thymus
22	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	15	Lymphom	NHL	Thymus
23	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	36	Lymphom	NHL	Peripherie
24	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	17	Lymphom	Lymphom	Thymus und Milz
25	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	29	Lymphom	NHL	Thymus und LK
26	$\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$	20	Lymphom	Lymphom	Peripherie und Thymus

Tab. 6: Übersicht aller 26 untersuchten $\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ -Mäuse. Histologische Befundung der Lymphome. Eine Reduktion in der Anzahl an Lymphomtieren gegenüber den *Mlh1* defizienten Mäusen war bereits hier feststellbar. NHL Non Hodgkin Lymphom, n.d. nicht durchgeführt

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorarten	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	CD 45R /										MHC I	TER
							CD 19	Ig D	Ig M	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 24	CD 45			
16	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	37	GI + L	DP T-Zell-Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus und LK	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	
15	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	44	GI + L	CD 8+ Lymphom	NHL	Thymus	-	-	-	-	-	+	n	n	n	-	n	
21	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	22	L	CD 8+ Lymphom	NHL	Thymus	n	n	n	-	-	+	n	n	n	-	n	
22	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	15	L	DN T-Zell-Lymphom	NHL	Thymus	n	n	n	+	-	-	n	n	n	+	n	
23	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	36	L	DN T-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	-/-	-	-	+	-	-	+	-	n	+	+	
25	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	29	L	B-Zell-Lymphom	NHL	LK	+/-	-	+	-	-	-	-	+	n	+	-	
26	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	20	L	B-Zell-Lymphom	Lymphom	Peripherie	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	n	
17	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	44	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	LK	+/+	-	-	-	-	-	+	n	+	+	n	
18	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	31	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	+	-	-	-	-	-	-	n	+	+	n	

Tab. 7: Darstellung der Ergebnisse der Immunphänotypisierung von 9 untersuchten Lymphomen $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Mäuse. Es ließen sich sowohl B-Zell- als auch T-Zell-Lymphome charakterisieren. CD 4 einfach positive und lymphoide Tumoren wurden nicht gefunden. Der überwiegende Teil der Lymphome weist Merkmale von unreifen lymphoiden Zellen auf.

NHL (Non Hodgkin Lymphoma), LBL (Large B cell Lymphoma); LK (Lymphknoten); Peripherie (Lymphomereignis in Milz und/oder Lymphknoten nachweisbar); n (nicht durchgeführt).

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	Immunphänotypisierung								
						E2A	Pax 5	Rag	TdT	RAE 1	Mult 1	Tal 1	CDK 4	
16	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	37	DP T-Zell-Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus und LK	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
21	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	22	CD 8+ Lymphom	NHL	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
15	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	44	CD 8+ Lymphom	NHL	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
23	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	36	DN T-Zell-Lymphom	NHL	Peripherie	+	-	-	-	-	-	+	+	MHC I positiv
22	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	15	DN T-Zell-Lymphom	NHL	Thymus	+	-	-	-	-	-	-	+	MHC I positiv
18	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	31	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I positiv
25	$\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$	29	B-Zell-Lymphom	NHL	LK	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I positiv

Tab. 8: Zusammenfassung aller Expressionsdaten der $\beta 2m^{+/-} / Mlh1^{-/-}$ -Mäuse.

+/- (exprimiert / nicht exprimiert);

4. $pfp^{-}/\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ - und $pfp^{-}/\beta 2m^{+/-}/Mlh1^{-/-}$ - Mäuse

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Histologie	Lymphom entwickelt in
1	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	22	Gastrointestinaltumor	n.d.	
2	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	50	Gastrointestinaltumor	n.d.	
3	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	30	Gastrointestinaltumor	n.d.	
4	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	24	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus
5	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	24	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
6	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	26	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Peripherie
7	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	27	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Peripherie
8	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	33	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Peripherie
9	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	11	Lymphom	NHL	Thymus und Peripherie
10	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	14	Lymphom	n.d.	Thymus
11	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	14	Lymphom	n.d.	Thymus
12	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	16	Lymphom	NHL	Thymus
13	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	17	Lymphom	n.d.	Thymus
14	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	17	Lymphom	n.d.	Thymus
15	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	17	Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
16	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	19	Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
17	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	25	Lymphom	n.d.	Peripherie
18	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	27	Lymphom	n.d.	Thymus (Milz)
19	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	24	Lymphom	n.d.	Thymus (Bein-LK)
20	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	23	Lymphom	n.d.	Milz
21	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	24	Lymphom	n.d.	Peripherie
22	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	29	Lymphom	n.d.	Milz (Hals-LK)
23	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	28	Lymphom	n.d.	Milz
24	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	26	Lymphom	n.d.	Peripherie
25	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	35	Lymphom	n.d.	Peripherie
26	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	26	Lymphom	n.d.	Peripherie
27	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	12	Lymphom	n.d.	Thymus (Milz)
28	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	25	Lymphom	n.d.	Peripherie
29	$pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$	22	Lymphom	n.d.	Thymus (Milz)

Tab. 9: Auflistung aller untersuchten $pfp^{-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{-/-}$ - Mäuse nach Tumorinzidenz und Lokalisation der lymphoiden Primärtumoren.

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	CD 45R / CD 19	Ig D	Ig M	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 24	CD 45	MHC I	TER
4	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	24	GI + L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
14	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	17	L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
15	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	17	L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
16	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	19	L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
17	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	25	L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
12	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	16	L	DP T-Zell Lymphom (CD 3-)	NHL	Thymus	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
19	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	24	L	DP T-Zell Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus (Bein-LK)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
5	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	24	GI + L	CD 8+ (CD 3-)	n.d.	Thymus und Peripherie	-	n	n	-	-	+	+	n	-	-	n
9	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	11	L	CD 8+ (CD 3-)	NHL	Thymus und Peripherie	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
11	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	14	L	CD 8+ (CD 3-)	n.d.	Thymus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
13	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	17	L	CD 8+ (CD 3-)	n.d.	Thymus	-	n	n	-	-	-	+	+	+	-	-
29	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	22	L	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus (Milz)	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
10	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	14	L	CD 4+ (CD 3-)	n.d.	Thymus	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
20	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	23	L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Milz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
8	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	33	GI + L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
24	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	26	L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	n	n	-	n
25	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	35	L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
26	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	26	L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
6	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	26	GI + L	B- Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+/+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
7	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	27	GI + L	B- Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
21	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	24	L	B- Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
22	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	29	L	B- Zell Lymphom	n.d.	Milz (Hals-LK)	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
23	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	28	L	B- Zell Lymphom	n.d.	Milz	+/+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
28	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	25	L	B- Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	-/+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tab. 10: Immunphänotypische Charakterisierung von 24 *pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/β2m^{+/-}*-Tieren. Stark reduzierter Anteil an doppelt negativen (DN) und CD 4 einfach positiven (CD 4+) T-Zell Lymphomen.

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	E2A	Pax 5	Rag	TdT	RAE 1	Mult 1	Tal 1	CDK 4	Immunphänotypisierung
4	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	24	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
14	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	17	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
15	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	17	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
16	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	19	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	+	-	+	-	+	-	+	MHC I negativ
17	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	25	DP T-Zell Lymphom CD 3(+)	n.d.	Peripherie	+	-	-	+	-	+	-	+	MHC I negativ
19	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	24	DP T-Zell Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus (Bein-LK)	+	-	+	-	-	+	-	+	MHC I negativ
12	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	16	DP T-Zell Lymphom (CD 3-)	NHL	Thymus	+	-	-	+	-	+	-	+	MHC I negativ
5	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	24	CD 8+ Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
9	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	11	CD 8+ Lymphom (CD 3-)	NHL	Thymus und Peripherie	+	-	-	-	-	-	-	+	MHC I negativ
11	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	14	CD 8+ Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
13	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	17	CD 8+ Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus	+	+	-	+	-	+	-	+	MHC I negativ
29	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	22	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus (Milz)	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
10	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	14	CD 4+ Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	-	-	+	MHC I negativ
8	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	33	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	+	+	-	+	+	-	-	+	MHC I negativ
20	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	23	CD 3- CD 45R-	n.d.	Milz	+	+	-	-	-	-	-	+	MHC I negativ
24	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	26	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	-	-	-	+	MHC I negativ
25	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	35	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I negativ
26	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	26	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	-	-	-	+	MHC I negativ
6	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	26	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	-	+	-	+	MHC I negativ
7	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	27	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I negativ
21	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	24	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	-	-	+	MHC I negativ
22	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	29	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz (Hals-LK)	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I negativ
23	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{+/-} / β2m^{+/-}</i>	28	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz	+	+	-	-	-	+	+	+	MHC I negativ

Tab. 11: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse von den 23 Lymphomen der *pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/β2m^{+/-}*-Mäuse (auf RNA-Ebene).

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Histologie	Lymphom entwickelt in
30	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	27	Gastrointestinaltumor	n.d.	
31	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	33	Gastrointestinaltumor	n.d.	
32	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	24	Gastrointestinaltumor	n.d.	
33	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	31	Gastrointestinaltumor	n.d.	
34	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	24	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
35	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	28	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Peripherie
36	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	29	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Milz
37	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	26	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Milz (Bein-LK)
38	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	35	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Milz (mesoc. LK)
39	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	16	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
40	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	24	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
41	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	15	Lymphom	n.d.	Thymus
42	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	13	Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
43	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	14	Lymphom	n.d.	Peripherie
44	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	31	Lymphom	n.d.	Milz
45	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	32	Lymphom	LK: histeocytärer Knoten	Peripherie
46	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	42	Lymphom	n.d.	Peripherie
47	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	36	Lymphom	n.d.	Peripherie
48	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	22	Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
49	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	18	Lymphom	n.d.	Peripherie
50	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	20	Lymphom	n.d.	Peripherie
51	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	22	Lymphom	n.d.	Peripherie
52	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/-}</i>	37	Lymphom	n.d.	Peripherie
Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Histologie	Lymphom entwickelt in
53	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	38	Gastrointestinaltumor	n.d.	
54	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	35	Gastrointestinaltumor	n.d.	
55	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	16	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
56	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	30	Gastrointestinaltumor und Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
57	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	16	Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie
58	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	20	Lymphom	n.d.	Thymus
59	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	20	Lymphom	n.d.	Peripherie
60	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	27	Lymphom	n.d.	Peripherie
61	<i>pfp^{-/-} / Mlh1^{-/-} / β2m^{+/+}</i>	22	Lymphom	n.d.	Peripherie

Tab. 12: Auflistung aller untersuchten *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/β2m^{+/-}*- sowie der *pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/β2m^{+/+}*-Mäuse nach Tumorinzidenz und Lokalisation der lymphoiden Primärtumoren.
LK Lymphknoten, n.d. nicht durchgeführt, pfp Perforin, β2m β2Mikroglobulin

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	CD 45R / CD 19	Ig D	Ig M	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 24	CD 45	MHC I	TER
34	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	24	GI + L	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
39	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	16	GI + L	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	n
48	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	22	L	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	24	GI + L	DP T-Zell-Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
42	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	13	L	CD 8+	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
41	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	15	L	CD 8+ (CD 3-)	n.d.	Thymus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
43	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	14	L	DN T-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
49	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	18	L	DN T-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
50	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	20	L	DN T-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
35	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	28	GI + L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
45	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	32	L	CD 3- CD 45R-	histocyt. LK	Peripherie	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
47	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	36	L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
36	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	29	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz	- / +	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
37	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	26	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz (Bein-LK)	+ / +	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
38	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	35	GI + L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz (mesoc. LK)	+ / +	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
44	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	31	L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Milz	- / +	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
51	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	22	L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	- / +	-	-	-	-	-	-	+	-	+	n

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	CD 45R	Ig D	Ig M	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 24	CD 45	MHC I	TER
56	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	30	GI + L	DP T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
55	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	16	GI + L	CD 8+	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
57	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	16	L	DN T-Zell-Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
60	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	27	L	CD 4+	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
61	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	22	L	CD 4+	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
59	$pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$	20	L	B-Zell-Lymphom	n.d.	Peripherie	- / +	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Tab. 13: Auflistung der Immunphänotypsierung von 17 $pfp^{-/-}/Mlh1^{+/-}/\beta 2m^{+/-}$ - und 6 $pfp^{-/-}/Mlh1^{-/-}/\beta 2m^{+/-}$ - Mäusen. Separate Darstellung der beiden Genotypen.
 pfp Perforin, $\beta 2m$ $\beta 2$ Mikroglobulin, GI Gastrointestinaltumor, GI+L Gastrointestinaltumor und Lymphom, L Lymphom

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumortart	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	CD 45R / CD 19	Ig D	Ig M	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 24	CD 45	MHC I	TER
56	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	30	GI + L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
34	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	24	GI + L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
39	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	16	GI + L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
48	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	22	L	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
40	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	24	GI + L	DP T-Zell Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
55	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	16	GI + L	CD 8+	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
42	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	13	L	CD 8+	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
41	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	15	L	CD 8+ (CD 3-)	n.d.	Thymus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
57	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	16	L	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
43	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	14	L	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
49	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	18	L	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
50	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	20	L	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
60	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	27	L	CD 4+	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
61	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	22	L	CD 4+	n.d.	Peripherie	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
35	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	28	GI + L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
45	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	32	L	CD 3- CD 45R-	histocyt. LK	Peripherie	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
47	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	36	L	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
59	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	20	L	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	- / +	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
36	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	29	GI + L	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz	- / +	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
37	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	26	GI + L	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz (Bein-LK)	+ / +	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
38	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	35	GI + L	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz (mesoc. LK)	+ / +	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
44	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	31	L	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz	- / +	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
51	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	22	L	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	- / +	-	-	-	-	-	-	+	-	+	n

Tab. 14: Zusammengefasste Darstellung der Immunphänotypisierung von *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{+/-}/*β2m*^{+/+}- und *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{+/-}/*β2m*^{+/+}-Mäusen. Die Anzahl der CD 4 einfach positiven (CD 4+) T-Zell Lymphome war ebenfalls in diesen perforin- defizienten Mauslinien deutlich reduziert.

pfp Perforin, *β2m* *β2*Mikroglobulin, GI Gastrointestinaltumor, GI+L Gastrointestinaltumor und Lymphom, L Lymphom, DN doppelt negativ (hinsichtlich Expression von CD 4 und CD 8), DP doppelt positiv, + / - exprimiert / nicht exprimiert.

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	E2A	Pax 5	Rag	TdT	RAE 1	Mult 1	Tal 1	CDK 4	Immunphänotypisierung
34	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	24	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	-	-	+	-	+	MHC I negativ
39	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	16	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	-	-	+	-	+	MHC I negativ
48	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	22	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
42	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	13	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
55	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	16	CD 8+ Lymphom	n.d.	Thymus und Peripherie	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
41	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	15	CD 8+ Lymphom (CD 3-)	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
43	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	14	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I positiv
50	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	20	DN T-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I positiv
60	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	27	CD 4+ Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I negativ
61	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	22	CD 4+ Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I positiv
35	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	28	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	-	+	+	+	MHC I positiv
45	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	32	CD 3- CD 45R-	LK: histocytärer Knoten	Peripherie	+	+	-	-	+	-	+	+	MHC I positiv
36	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	29	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I positiv
37	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	26	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz (Bein-LK)	+	+	+	-	+	+	+	+	MHC I positiv
38	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	35	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz (mesoc. LK)	+	+	-	-	-	+	+	+	MHC I positiv
44	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	31	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz	+	+	-	-	+	-	+	+	MHC I positiv
51	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	22	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	-	-	+	+	MHC I positiv
59	<i>pfp</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{+/-} / <i>β2m</i> ^{+/+}	20	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	+	-	+	+	+	+	MHC I positiv

Tab. 15: Genexpressionsergebnisse von den 18 Lymphomen der *pfp*^{-/-}/*Mlh1*^{+/-}/*β2m*^{+/+}-Mäuse.

pfp Perforin, *β2m* *β2*Mikroglobulin, GI Gastrointestinaltumor, GI+L Gastrointestinaltumor und Lymphom, L Lymphom, DN doppelt negativ (hinsichtlich Expression von CD 4 und CD 8), DP doppelt positiv, + / - exprimiert / nicht exprimiert.

5. *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumor	Hinterbeine gelähmt	Histologie	Lymphom entwickelt in
1	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	20	Gastrointestinaltumor	nein	Adenome und AdenoCAs	
2	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	32	Gastrointestinaltumor	nein	n.d.	
3	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	36	Gastrointestinaltumor	nein	Adenome und AdenoCAs	
4	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	36	Gastrointestinaltumor	nein	n.d.	
5	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	38	Gastrointestinaltumor	nein	n.d.	
6	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	39	Gastrointestinaltumor	nein	Adenome und AdenoCAs	
7	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	39	Gastrointestinaltumor	nein	Adenome und AdenoCAs	
8	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	41	Gastrointestinaltumor	nein	Adenome und AdenoCAs	
9	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	14	Gastrointestinaltumor und Lymphom	ja	NHL und AdenoCAs	Peripherie
10	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	18	Gastrointestinaltumor und Lymphom	ja	NHL und AdenoCAs	Peripherie
11	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	20	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	NHL und Adenom	Peripherie
12	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	21	Gastrointestinaltumor und Lymphom	ja	NHL und AdenoCAs	Peripherie
13	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	21	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	n.d.	Peripherie
14	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	22	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	n.d.	Thymus
15	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	23	Gastrointestinaltumor und Lymphom	ja	NHL und AdenoCA	Peripherie
16	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	24	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	NHL und AdenoCAs	Peripherie (Milz)
17	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	25	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	n.d.	Thymus (Milz)
18	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	25	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	NHL und AdenoCAs	Peripherie
19	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	27	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	NHL und AdenoCAs	Thymus
20	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	36	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	Adenome und AdenoCAs	Peripherie
21	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	17	Gastrointestinaltumor und Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
22	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	23	Gastrointestinaltumor und Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
24	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	20	Gastrointestinaltumor und Lymphom	nein	n.d.	Thymus
41	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	25	Gastrointestinaltumor und Lymphom	ja	NHL and AdenoCAs	Peripherie
23	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	18	Lymphom und Hauttumor	ja	NHL	Peripherie
25	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	8	Lymphom	nein	NHL	Milz
26	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	16	Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
27	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	17	Lymphom	nein	n.d.	Milz
28	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	17	Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
29	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	18	Lymphom	nein	NHL	Peripherie
30	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	19	Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
31	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	21	Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
32	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	23	Lymphom	nein	n.d.	Thymus (Hals-LK)
33	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	23	Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
34	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	26	Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
35	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	26	Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
36	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	26	Lymphom	ja	n.d.	Peripherie
37	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	27	Lymphom	nein	n.d.	Thymus
38	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	28	Lymphom	unklar	n.d.	Thymus (Bein-LK)
39	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	21	Lymphom	ja	NHL	Peripherie
40	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	27	Lymphom	ja	NHL	Peripherie
41	<i>Rag</i> ^{-/-} / <i>Mlh1</i> ^{-/-}	15	Lymphom	unklar	n.d.	unklar

Tab. 16: Darstellung aller untersuchten *Rag*^{-/-}/*Mlh1*^{-/-}-Mäuse nach Tumorinzidenz und Lokalisation der lymphoiden Primärtumoren. Einige der Tiere wiesen eine Paralyse in den Hinterbeinen auf. Rag Recombination activation gene, CA Karzinom, NHL Non Hodgkin Lymphom, n.d. nicht durchgeführt, LK Lymphknoten.

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Tumorart	gelähmt	Histologie	Lymphom entwickelt in	Lymphomart	CD 45R / CD 19	Ig D	Ig M	CD 3	CD 4	CD 8	CD 2	CD 24	CD 45	MHC I	TER
17	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	25	GI + L	nein	n.d.	Thymus (Milz)	DP T-Zell Lymphom	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
24	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	20	GI + L	nein	n.d.	Thymus	DP T-Zell Lymphom	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
32	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	23	L	nein	n.d.	Thymus (Hals-LK)	DP T-Zell Lymphom	-	-	-	-	+	+	-	+	+	n	n
37	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	27	L	nein	n.d.	Thymus	DP T-Zell Lymphom	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
38	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	28	L	nein	n.d.	Thymus (Bein-LK)	DP T-Zell Lymphom	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
19	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	27	GI + L	nein	NHL	Thymus	CD 8+ Lymphom	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
9	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	14	GI + L	ja	NHL	Peripherie	CD 3- / CD 45R-	-	-	-	-	-	-	-	n	+	+	n
14	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	22	GI + L	nein	n.d.	Thymus	CD 3- / CD 45R-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
20	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	36	GI + L	nein	n.d.	Peripherie	CD 3- / CD 45R-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
23	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	18	Hauttu + L	ja	NHL	Peripherie	CD 3- / CD 45R-	-	-	-	-	-	-	-	n	+	+	n
11	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	20	GI + L	nein	NHL	Peripherie	B-Zell Lymphom	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
12	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	21	GI + L	ja	NHL	Peripherie	B-Zell Lymphom	+	-	-	-	-	-	-	n	+	+	n
13	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	21	GI + L	nein	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
15	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	23	GI + L	ja	NHL	Peripherie	B-Zell Lymphom	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
18	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	25	GI + L	nein	NHL	Peripherie	B-Zell Lymphom	-/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
21	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	17	GI + L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	+	-	-	-	-	-	-	n	+	+	n
22	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	23	GI + L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	+/+	n	n	-	-	-	-	n	+	+	n
41	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	25	GI + L	ja	NHL	Peripherie	B-Zell Lymphom	-/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
26	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	16	L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	-/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
27	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	17	L	nein	n.d.	Milz	B-Zell Lymphom	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
28	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	17	L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	-/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
29	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	18	L	nein	NHL	Peripherie	B-Zell Lymphom	+	-	-	-	-	-	-	n	+	+	n
30	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	19	L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
31	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	21	L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
33	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	23	L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
34	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	26	L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	-/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
35	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	26	L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
36	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	26	L	ja	n.d.	Peripherie	B-Zell Lymphom	-/+	-	-	-	-	-	-	n	+	+	-
39	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	21	L	ja	NHL	Peripherie	B-Zell Lymphom	-/+	n	n	-	-	-	-	+	+	n	n
40	Rag ⁺ / Mlh1 ⁺	27	L	ja	NHL	Peripherie	B-Zell Lymphom	+	n	n	-	n	n	-	+	+	n	n

Tab. 17: Immunphänotypisierungsergebnisse aller untersuchten Lymphome der Rag⁺/Mlh1⁺-Mäuse. Es traten keine CD 4 einfach positiven und doppelt negativen T-Zell Lymphome auf. Ausschliesslich in den Gruppen von Tieren mit B-Zell Lymphomen war eine Paralyse der Hinterbeine feststellbar.

Rag Recombination activation gene, GI Gastrointestinaltumor, GI+L Gastrointestinaltumor und Lymphom, L Lymphom, Hauttu Hauttumor, DP doppelt positiv (hinsichtlich Expression von CD 4 und CD 8), + / - exprimiert / nicht exprimiert, n nicht gemessen, LK Lymphknoten.

Lfd. Nr.	Genotyp	Alter [Wochen]	Lymphomart	Histologie	Lymphom entwickelt in	E2A	Pax 5	Rag	TdT	RAE 1	Mult 1	Tal 1	CDK 4	Immunphänotypisierung
24	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	20	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
38	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	28	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus (Bein-LK)	+	+	+	-	-	+	-	+	MHC I positiv
37	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	27	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
17	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	25	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus (Milz)	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I positiv
57	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	16	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
32	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	23	DP T-Zell Lymphom	n.d.	Thymus (Hals-LK)	+	-	+	+	-	+	-	+	n.d.
19	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	27	CD 8+ Lymphom	NHL	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
9	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	14	CD 3- CD 45R-	NHL	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
23	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	18	CD 3- CD 45R-	NHL	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
20	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	36	CD 3- CD 45R-	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	+	+	MHC I negativ
14	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	22	CD 3- CD 45R-	n.d.	Thymus	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I negativ
30	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	19	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I positiv
27	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	17	B-Zell Lymphom	n.d.	Milz	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
31	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	21	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
15	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	23	B-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	-	+	+	-	+	+	+	+	MHC I positiv
41	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	25	B-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
26	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	16	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	-	-	+	+	-	+	MHC I positiv
29	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	18	B-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
18	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	25	B-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	+	+	+	+	-	+	MHC I positiv
28	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	17	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	-	+	+	-	+	-	+	MHC I positiv
34	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	26	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
11	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	20	B-Zell Lymphom	NHL	Peripherie	+	+	+	-	+	+	+	+	MHC I positiv
35	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	26	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
36	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	26	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	+	-	+	+	-	+	MHC I positiv
22	Rag ⁺ / Mlh1 ^{-/-}	23	B-Zell Lymphom	n.d.	Peripherie	+	+	+	-	+	+	+	+	MHC I positiv

Tab. 18: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse von Lymphomen der Rag⁺/Mlh1^{-/-}-Mäuse.

Rag Recombination activation gene, GI Gastrointestinaltumor, GI+L Gastrointestinaltumor und Lymphom, L Lymphom, DP doppelt positiv (hinsichtlich Expression von CD 4 und CD 8), + / - exprimiert / nicht exprimiert, n.d. nicht durchgeführt, LK Lymphknoten.

<i>Lfd. Nr.</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Alter [Wochen]</i>	<i>Tumorart</i>	<i>Histologie</i>	<i>MSI</i>
7	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT3	L-MSI
7	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA zumindest pT2	L-MSI
8	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	41	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	H-MSI
16	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	MSS
16	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	L-MSI
10	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	18	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	H-MSI
9	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	14	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	MSS
12	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	21	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	H-MSI
3	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	L-MSI
16	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	24	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	H-MSI
6	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT2	L-MSI
18	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	25	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA (Invasionstiefe nicht beurteilbar)	L-MSI
1	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	20	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	MSS
19	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	27	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
3	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
8	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	41	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
20	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
6	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	H-MSI
15	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	23	Adeno Karzinom	G2 AdenoCA pT1	L-MSI
20	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adenom	flaches tubulöses Adenom mit schweren Atypien	L-MSI
20	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adenom	tubulöses villöses Adenom mit mäßigen Atypien (polypös)	MSS
3	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	36	Adenom	flaches tubulöses Adenom mit schweren Dysplasien	H-MSI
6	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	39	Adenom	tubulovillöses Adenom	H-MSI
11	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	20	Adenom	flaches Adenom	L-MSI
13	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	21	n.d.	n.d.	H-MSI
13	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	21	n.d.	n.d.	H-MSI
21	Rag ^{-/-} / Mlh1 ^{-/-}	17	n.d.	n.d.	L-MSI

Tab.19: MSI in Rag^{-/-}/Mlh1^{-/-}-Gastrointestinaltumoren.

Rag Recombination activation gene, G2 grading, pT Einteilung der Tumoren nach WHO-Klassifikation, MSS Mikrosatellitenstabil, L-, H-MSI low-, high-Microsatellite Instability.

VIII Literatur

Bücher :

- Charles A. Janeway/ Paul Travers/ Mark Walport/ Mark Shlomchick « Immunologie, 5. Auflage », Spektrum Akademischer Verlag (2002), ISBN 3-8274-1079-7
- Junqueira, Carneiro « Histologie, 4. übersetzte Auflage », Springer Verlag (1996), ISBN 3-540-60404-9
- Cornel Mülhardt « Der Experimentator : Molekularbiologie », Gustav Fischer Verlag ISBN 3-437-25508-8
- Rolf Knipper « Molekulare Genetik, 6. neubearbeitete Auflage », Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-477006-7

Veröffentlichungen / Paper :

- Aaltomaa, S., P. Lipponen, et al. (1992). "Prognostic value of cell proliferation in breast cancer as determined by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining." Anticancer Res **12**(4): 1281-6.
- Aaltonen, L. A., P. Peltomaki, et al. (1993). "Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer." Science **260**(5109): 812-6.
- Ahuja, N., A. L. Mohan, et al. (1997). "Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer." Cancer Res **57**(16): 3370-4.
- Baker, K., I. Zlobec, et al. (2007). "Differential significance of tumour infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway." Eur J Cancer **43**(3): 624-31.
- Baker, S. M., C. E. Bronner, et al. (1995). "Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis." Cell **82**(2): 309-19.
- Baker, S. M., A. W. Plug, et al. (1996). "Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over." Nat Genet **13**(3): 336-42.
- Ban, C. and W. Yang (1998). "Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis." Cell **95**(4): 541-52.
- Bedi, G. C., W. H. Westra, et al. (1995). "Microsatellite instability in primary neoplasms from HIV + patients." Nat Med **1**(1): 65-8.
- Bicknell, D. C., L. Kaklamanis, et al. (1996). "Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas." Curr Biol **6**(12): 1695-7.
- Bicknell, D. C., A. Rowan, et al. (1994). "Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4751-5.

- Brimmell, M., R. Mendiola, et al. (1998). "BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability." Oncogene **16**(14): 1803-12.
- Buermeyer, A. B., S. M. Deschenes, et al. (1999). "Mammalian DNA mismatch repair." Annu Rev Genet **33**: 533-64.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res **13**: 1-27.
- Cannavo, E., G. Marra, et al. (2005). "Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair." Cancer Res **65**(23): 10759-66.
- Carbone, A. and G. Gaidano (2001). "Acquired immunodeficiency syndrome-related cancer. A study model for the mechanisms contributing to the genesis of cancer." Eur J Cancer **37**(10): 1184-7.
- Chao, E. C. and S. M. Lipkin (2006). "Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis." Nucleic Acids Res **34**(3): 840-52.
- Chi, N. W. and R. D. Kolodner (1994). "Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches." J Biol Chem **269**(47): 29984-92.
- Chouaib, S., C. Asselin-Paturel, et al. (1997). "The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction." Immunol Today **18**(10): 493-7.
- Chung, D. C. and A. K. Rustgi (2003). "The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications." Ann Intern Med **138**(7): 560-70.
- Claij, N. and H. te Riele (1999). "Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy?" Exp Cell Res **246**(1): 1-10.
- Clark, W. H., Jr., D. E. Elder, et al. (1989). "Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression." J Natl Cancer Inst **81**(24): 1893-904.
- Clemente, C. G., M. C. Mihm, Jr., et al. (1996). "Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma." Cancer **77**(7): 1303-10.
- Cohen, P. R. (1992). "Muir-Torre syndrome in patients with hematologic malignancies." Am J Hematol **40**(1): 64-5.
- Cox, E. C., G. E. Degnen, et al. (1972). "Mutator gene studies in Escherichia coli: the mutS gene." Genetics **72**(4): 551-67.
- de Wind, N., M. Dekker, et al. (1998). "Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Cancer Res **58**(2): 248-55.
- Diefenbach, A. and D. H. Raulet (2002). "The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity." Immunol Rev **188**: 9-21.
- Drummond, J. T., G. M. Li, et al. (1995). "Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells." Science **268**(5219): 1909-12.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-48.
- Duval, A., M. Raphael, et al. (2004). "The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 5002-7.
- Edelmann, W., P. E. Cohen, et al. (1996). "Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice." Cell **85**(7): 1125-34.

- Edelmann, W., A. Umar, et al. (2000). "The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression." Cancer Res **60**(4): 803-7.
- Edelmann, W., K. Yang, et al. (1999). "Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice." Cancer Res **59**(6): 1301-7.
- Edelmann, W., K. Yang, et al. (1997). "Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility." Cell **91**(4): 467-77.
- Ehrenfeld, M., M. Abu-Shakra, et al. (2001). "The dual association between lymphoma and autoimmunity." Blood Cells Mol Dis **27**(4): 750-6.
- Flores-Rozas, H. and R. D. Kolodner (1998). "The *Saccharomyces cerevisiae* MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12404-9.
- Freland, S., B. J. Chambers, et al. (1998). "Rejection of allogeneic and syngeneic but not MHC class I-deficient tumor grafts by MHC class I-deficient mice." J Immunol **160**(2): 572-9.
- Furukawa, T., S. Watanabe, et al. (1985). "T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis." Cancer **56**(11): 2651-6.
- Gamberi, B., G. Gaidano, et al. (1997). "Microsatellite instability is rare in B-cell non-Hodgkin's lymphomas." Blood **89**(3): 975-9.
- Garcia-Lora, A., I. Algarra, et al. (2003). "MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape." J Cell Physiol **195**(3): 346-55.
- Garrido, F. and I. Algarra (2001). "MHC antigens and tumor escape from immune surveillance." Adv Cancer Res **83**: 117-58.
- Grady, W. M. (2004). "Genomic instability and colon cancer." Cancer Metastasis Rev **23**(1-2): 11-27.
- Graubert, T. A., J. F. DiPersio, et al. (1997). "Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation." J Clin Invest **100**(4): 904-11.
- Grilley, M. M., S. D. Stock, et al. (1998). "Syringomycin action gene SYR2 is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **273**(18): 11062-8.
- Grips, E., N. Wentzensen, et al. (2002). "[Glioblastoma multiforme as a manifestation of Turcot syndrome]." Nervenarzt **73**(2): 177-82.
- Gu, L., B. Cline-Brown, et al. (2002). "Mismatch repair deficiency in hematological malignancies with microsatellite instability." Oncogene **21**(37): 5758-64.
- Gu, L., J. Wu, et al. (2002). "Deficiency of a novel mismatch repair activity in a bladder tumor cell line." Nucleic Acids Res **30**(13): 2758-63.
- Gutmann, D. H., E. Winkler, et al. (2003). "Mlh1 deficiency accelerates myeloid leukemogenesis in neurofibromatosis 1 (Nf1) heterozygous mice." Oncogene **22**(29): 4581-5.
- Hahne, M., D. Rimoldi, et al. (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." Science **274**(5291): 1363-6.
- Hamilton, S. R., B. Liu, et al. (1995). "The molecular basis of Turcot's syndrome." N Engl J Med **332**(13): 839-47.
- Hangaishi, A., S. Ogawa, et al. (1997). "Mutations and loss of expression of a mismatch repair gene, hMLH1, in leukemia and lymphoma cell lines." Blood **89**(5): 1740-7.
- Hienonen, T., P. Laiho, et al. (2003). "Little evidence for involvement of MLH3 in colorectal cancer predisposition." Int J Cancer **106**(2): 292-6.
- Honchel, R., K. C. Halling, et al. (1994). "Microsatellite instability in Muir-Torre syndrome." Cancer Res **54**(5): 1159-63.

- Imanishi, T., T. Kamigaki, et al. (2006). "Correlation between expression of major histocompatibility complex class I and that of antigen presenting machineries in carcinoma cell lines of the pancreas, biliary tract and colon." Kobe J Med Sci **52**(3-4): 85-95.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, et al. (1993). "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis." Nature **363**(6429): 558-61.
- Jager, E., M. Ringhoffer, et al. (1997). "Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma." Int J Cancer **71**(2): 142-7.
- Jallepalli, P. V. and C. Lengauer (2001). "Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery." Nat Rev Cancer **1**(2): 109-17.
- Jiang, Z., E. Podack, et al. (2001). "Major histocompatibility complex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation using perforin and/or Fas ligand double-defective CD4(+) donor T cells: involvement of cytotoxic function by donor lymphocytes prior to graft-versus-host disease pathogenesis." Blood **98**(2): 390-7.
- Johnsen, A. K., J. France, et al. (2001). "Systemic deficits in transporter for antigen presentation (TAP)-1 or proteasome subunit LMP2 have little or no effect on tumor incidence." Int J Cancer **91**(3): 366-72.
- Kagi, D., B. Ledermann, et al. (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." Nature **369**(6475): 31-7.
- Kondo, E., A. Horii, et al. (2001). "The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2." Nucleic Acids Res **29**(8): 1695-702.
- Kruse, R. and T. Ruzicka (2004). "DNA mismatch repair and the significance of a sebaceous skin tumor for visceral cancer prevention." Trends Mol Med **10**(3): 136-41.
- Lahue, R. S., S. S. Su, et al. (1987). "Requirement for d(GATC) sequences in Escherichia coli mutHLS mismatch correction." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(6): 1482-6.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 359-93.
- Larson, R. S., S. Manning, et al. (1997). "Microsatellite instability in natural killer cell-like T-cell lymphomas in immunocompromised and immunocompetent individuals." Blood **89**(3): 1114-5.
- Larson, R. S., M. A. Scott, et al. (1996). "Microsatellite analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders: determination of donor/recipient origin and identification of putative lymphomagenic mechanism." Cancer Res **56**(19): 4378-81.
- Lehmann, C., M. Zeis, et al. (2000). "Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells." Blood **96**(2): 594-600.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-9.
- Li, G. M. (2008). "Mechanisms and functions of DNA mismatch repair." Cell Res **18**(1): 85-98.
- Loeb, L. A. (1991). "Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis." Cancer Res **51**(12): 3075-9.
- Loeb, L. A. (2001). "A mutator phenotype in cancer." Cancer Res **61**(8): 3230-9.

- Lowdell, M. W., L. Lamb, et al. (2001). "Non-MHC-restricted cytotoxic cells: their roles in the control and treatment of leukaemias." Br J Haematol **114**(1): 11-24.
- Lowsky, R., J. F. DeCoteau, et al. (1997). "Defects of the mismatch repair gene MSH2 are implicated in the development of murine and human lymphoblastic lymphomas and are associated with the aberrant expression of rhombotin-2 (Lmo-2) and Tal-1 (SCL)." Blood **89**(7): 2276-82.
- Marincola, F. M., E. M. Jaffee, et al. (2000). "Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance." Adv Immunol **74**: 181-273.
- McEvoy, C. R., R. Seshadri, et al. (2002). "Frequency and genetic basis of MHC, beta-2-microglobulin and MEMO-1 loss of heterozygosity in sporadic breast cancer." Tissue Antigens **60**(3): 235-43.
- Modrich, P. (1987). "DNA mismatch correction." Annu Rev Biochem **56**: 435-66.
- Modrich, P. and R. Lahue (1996). "Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology." Annu Rev Biochem **65**: 101-33.
- Moretta, A. and L. Moretta (1997). "HLA class I specific inhibitory receptors." Curr Opin Immunol **9**(5): 694-701.
- Morse, H. C., 3rd, M. R. Anver, et al. (2002). "Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice." Blood **100**(1): 246-58.
- Naito, Y., K. Saito, et al. (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." Cancer Res **58**(16): 3491-4.
- Offman, J., G. Opelz, et al. (2004). "Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation." Blood **104**(3): 822-8.
- Paraf, F., S. Jothy, et al. (1997). "Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases?" J Clin Oncol **15**(7): 2744-58.
- Peltomaki, P. (2003). "Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer." J Clin Oncol **21**(6): 1174-9.
- Peltomaki, P. and A. de la Chapelle (1997). "Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Adv Cancer Res **71**: 93-119.
- Prall, F., T. Duhrop, et al. (2004). "Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability." Hum Pathol **35**(7): 808-16.
- Pratt, C. B., D. M. Parham, et al. (1988). "Multiple colorectal carcinomas, polyposis coli, and neurofibromatosis." J Natl Cancer Inst **80**(14): 1170-2.
- Prolla, T. A. (1998). "DNA mismatch repair and cancer." Curr Opin Cell Biol **10**(3): 311-6.
- Reenan, R. A. and R. D. Kolodner (1992). "Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins." Genetics **132**(4): 963-73.
- Reitmair, A. H., M. Redston, et al. (1996). "Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice." Cancer Res **56**(16): 3842-9.
- Reitmair, A. H., R. Schmits, et al. (1995). "MSH2 deficient mice are viable and susceptible to lymphoid tumours." Nat Genet **11**(1): 64-70.
- Ricciardone, M. D., T. Ozcelik, et al. (1999). "Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1." Cancer Res **59**(2): 290-3.
- Robertson, A., S. R. Pattishall, et al. (2006). "The DNA binding activity of MutL is required for methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*." J Biol Chem **281**(13): 8399-408.

- Ropponen, K. M., M. J. Eskelinen, et al. (1997). "Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer." J Pathol **182**(3): 318-24.
- Salcedo, M., M. Andersson, et al. (1998). "Fine tuning of natural killer cell specificity and maintenance of self tolerance in MHC class I-deficient mice." Eur J Immunol **28**(4): 1315-21.
- Schmaltz, C., O. Alpdogan, et al. (2001). "Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect." Blood **97**(9): 2886-95.
- Schrader, C. E., J. Vardo, et al. (2002). "Role for mismatch repair proteins Msh2, Mlh1, and Pms2 in immunoglobulin class switching shown by sequence analysis of recombination junctions." J Exp Med **195**(3): 367-73.
- Seliger, B., T. Cabrera, et al. (2002). "HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells." Semin Cancer Biol **12**(1): 3-13.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Shia, J., D. Black, et al. (2008). "Routinely assessed morphological features correlate with microsatellite instability status in endometrial cancer." Hum Pathol **39**(1): 116-25.
- Smyrk, T. C., P. Watson, et al. (2001). "Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma." Cancer **91**(12): 2417-22.
- Smyth, M. J. and M. B. Snook (1999). "Perforin-dependent cytolytic responses in beta2-microglobulin-deficient mice." Cell Immunol **196**(1): 51-9.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (2000). "Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma." J Exp Med **192**(5): 755-60.
- Strand, M., T. A. Prolla, et al. (1993). "Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair." Nature **365**(6443): 274-6.
- Street, S. E., E. Cretney, et al. (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." Blood **97**(1): 192-7.
- Teruya-Feldstein, J., J. Greene, et al. (2002). "Analysis of mismatch repair defects in the familial occurrence of lymphoma and colorectal cancer." Leuk Lymphoma **43**(8): 1619-26.
- Tsujitani, S., T. Furukawa, et al. (1987). "Langerhans cells and prognosis in patients with gastric carcinoma." Cancer **59**(3): 501-5.
- van den Broek, M. F., D. Kagi, et al. (1995). "Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo." Eur J Immunol **25**(12): 3514-6.
- Vilkkki, S., J. L. Tsao, et al. (2001). "Extensive somatic microsatellite mutations in normal human tissue." Cancer Res **61**(11): 4541-4.
- Wagner, R., Jr. and M. Meselson (1976). "Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(11): 4135-9.
- Wang, Q., C. Lasset, et al. (1999). "Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children." Cancer Res **59**(2): 294-7.
- Weij, K., R. Kucherlapati, et al. (2002). "Mouse models for human DNA mismatch-repair gene defects." Trends Mol Med **8**(7): 346-53.
- Whiteside, D., R. McLeod, et al. (2002). "A homozygous germ-line mutation in the human MSH2 gene predisposes to hematological malignancy and multiple cafe-au-lait spots." Cancer Res **62**(2): 359-62.

- Willenbrock, K., R. Ichinohasama, et al. (2002). "T-cell variant of classical Hodgkin's lymphoma with nodal and cutaneous manifestations demonstrated by single-cell polymerase chain reaction." Lab Invest **82**(9): 1103-9.
- Wool, G. M. (1998). "AIDS-Related Malignancies." Oncologist **3**(4): 279-283.
- Yamamoto, H., J. Perez-Piteira, et al. (1999). "Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features." Gastroenterology **116**(6): 1348-57.
- Yamamoto, H., K. Yamashita, et al. (2001). "Somatic mutation of the beta2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype." Gastroenterology **120**(6): 1565-7.
- Zhang, S., R. Lloyd, et al. (2002). "Thymic lymphomas arising in Msh2 deficient mice display a large increase in mutation frequency and an altered mutational spectrum." Mutat Res **500**(1-2): 67-74.
- Zhu, Y. M., E. P. Das-Gupta, et al. (1999). "Microsatellite instability and p53 mutations are associated with abnormal expression of the MSH2 gene in adult acute leukemia." Blood **94**(2): 733-40.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre ausserdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem ander Prüfungsverfahren vorgelegt hat.

Ich habe früher, ausser den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 09. März 2008

(Torsten Haneke)