

Aus dem  
Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie  
und Pharmakogenomik der Universität Tübingen  
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie und  
Toxikologie

**Die Rolle von SLy1 bei der Entwicklung einer  
T-Zell-akuten lymphatischen Leukämie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Kloos, Isabel  
2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 17.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.2 T-Zell-Entwicklung .....	2
1.2.1 Von einer Thymozytenvorläuferzelle bis zur funktionsfähigen T-Zelle ....	2
1.2.2 Der Notch-Signalweg .....	5
1.2.3 Der IL-7/IL-7R-Signalweg .....	7
1.3 Lymphatische Erkrankungen .....	11
1.3.1 Wie lymphatische Zellen entarten .....	11
1.3.2 T-Zell akute lymphatische Leukämie .....	13
1.4 Die SLy/SASH Proteinfamilie .....	15
1.5 Das Adapterprotein SLy1 .....	16
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	19
2 Materialien und Methoden .....	20
2.1 Bezugsquellennachweis .....	20
2.1.1 Chemikalien .....	20
2.1.2 Kits .....	21
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.4 Geräte .....	23
2.1.5 Medien und Puffer .....	24
2.1.6 Primer .....	25
2.1.7 Antikörper .....	26
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Tierexperimente .....	27

2.2.2 Molekularbiologische, zell- und immunbiologische Methoden.....	28
2.2.3 Statistische Analysen .....	34
3 Ergebnisse .....	35
3.1 Analyse des Notch-Signalweges in SLy1 KO Thymozyten.....	35
3.1.1 Erhöhte Notch1- und Notch3-Expression in SLy1 KO Thymozyten.....	35
3.1.2 Weitere Auswirkungen der SLy1-Defizienz im Notch-Signalweg.....	38
3.2 Analyse des IL-7/IL-7R-Signalweges in SLy1 KO Thymozyten .....	44
3.2.1 Expressionsanalyse des IL-7R, Stat5a und Stat5b .....	46
3.2.2 Verstärkte Stat5-Phosphorylierung in SLy1 KO Thymozyten .....	50
3.3 Veränderte Expression Leukämie-relevanter Gene bei SLy1-Defizienz .....	53
3.4 Veränderte p53-Expression im Zusammenhang mit dem IL7-R-Signalweg ...	58
4 Diskussion.....	60
4.1 Die Rolle von SLy1 im Notch-Signalweg.....	60
4.2 Die Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf den IL-7R-Signalweg .....	64
4.3 Der Zusammenhang zwischen dem IL-7R-Signalweg und der p53-Signalgebung.....	66
4.4 SLy1 und seine Einordnung in die für eine T-ALL relevanten Signalwege .....	69
4.5 SLy1 - Klinische Relevanz und Ausblick.....	74
5 Zusammenfassung.....	76
6 Literaturverzeichnis .....	77
7 Eidesstattliche Erklärung.....	84
8 Danksagung.....	85

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entwicklung der Thymozytenvorläuferzelle zur reifen T-Zelle.....	4
Abbildung 2: Die Thymozytenentwicklung mit entsprechender IL-7R- und Notch-Expression.....	9
Abbildung 3: Schema des strukturellen Aufbaus des SLy1-Proteins. ....	16
Abbildung 4: Expressionsanalyse von Notch1 in SLy1 KO und WT Thymozyten. ....	36
Abbildung 5: Expressionsanalyse von Notch3 im Vergleich WT und SLy1 KO Mäusen. ....	37
Abbildung 6: Notch-Array mit SLy1 KO DP Thymozyten. ....	38
Abbildung 7: Notch-Array mit SLy1 KO DN Thymozyten.....	42
Abbildung 8: Die IL-7/IL-7R Kaskade in Thymozyten, gesunden und malignen T-Zellen. ....	45
Abbildung 9: Expressionsanalyse des IL-7R in WT und SLy1 KO Thymozyten.....	47
Abbildung 10: Expressionsanalyse von Stat5a in WT und SLy1 KO Thymozyten. ....	48
Abbildung 11: Expressionsanalyse von Stat5b im Vergleich WT und SLy1 KO Mäusen. ....	49
Abbildung 12: Ex vivo Phosphorylierungsanalyse von Stat5 und Akt als Kontrolle.....	51
Abbildung 13: IL7-induzierte Stimulation der Stat5 Phosphorylierung. ....	52
Abbildung 14: Leukämie-Array mit DP Thymozyten. ....	54
Abbildung 15: Leukämie-Array mit DN Thymozyten.....	56
Abbildung 16: Expressionsanalyse von p53 im Vergleich WT und SLy1 KO Mäusen. ....	59
Abbildung 17: Der HERC2/NEURL4/MDM2 Komplex im p53 Signalweg. ....	68
Abbildung 18: Modell der T-ALL-relevanten Signalwege in SLy1 KO Thymozyten.....	70
Abbildung 19: Modell der zusammenhängenden Signalwege bei SLy1-Überexpression. ....	73

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien .....	20
Tabelle 2: Kits.....	21
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 4: Geräte .....	23
Tabelle 5: Medien und Puffer .....	24
Tabelle 6: Primer .....	25
Tabelle 7: Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper für Durchflusszytometrie .....	26
Tabelle 8: SLy1 KO Programm für die PCR.....	28
Tabelle 9: Cyclor Programm für die Genexpressions-Analyse .....	31
Tabelle 10: Cyclor Programm für die Notch-Signalweg-Analyse .....	32
Tabelle 11: Cyclor Programm für die Leukämie-Signalweg-Analyse .....	34
Tabelle 12: Hoch- und runterregulierte Gene in SLy1 KO DP Thymozyten. ....	40
Tabelle 13: Hoch- und runterregulierte Gene in SLy1 KO DN Thymozyten. ....	43
Tabelle 14: Runterregulierte Gene in SLy1 KO DP Thymozyten. ....	55
Tabelle 15: Hoch- und herunterregulierte Gene in SLy1 KO DN Thymozyten. ....	57

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
Bcl2	B cell lymphoma 2 Protein
DN	Doppelt negativ
DP	Doppelt positiv
ETP	Early T-cell Progenitor
Hes	Hairy-Enhancer of Split
HSZ	murine, hämatopoietische Stammzellen
IL-7R $\alpha$	$\alpha$ -Kette des IL-7R
KM	Knochenmark
Lmo2	LIM domain Only 2
MHC	Major Histocompatibility Complex
Msc	Musculin
mTOR	Target of Rapamycin Komplex
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLS	nukleäre Lokalisationssignalsequenz
SH3	Src homology 3
SLy	<u>S</u> H3 protein expressed in <u>l</u> ymphocytes
SP	Single positive
T-ALL	T Zell akute lymphatische Leukämie
TLL	T Zell lymphatische Leukämien
$\alpha\beta$ TCR	$\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor
$\gamma$ c	$\gamma$ Kette des IL-7R

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe exogene pathogene Eindringlinge zu erkennen und den Körper vor ihnen zu schützen. Es besteht aus lymphatischen Organen, verschiedenen Zellen, humoralen Faktoren und Zytokinen, wobei jede Komponente einen Teil dazu beiträgt, unterscheiden zu können, was körperfremd ist und eliminiert werden muss. Das Immunsystem wird dabei in zwei Systeme unterteilt, wenngleich diese eng miteinander verknüpft sind, um eine effiziente Abwehr gegenüber verschiedenen Erregern zu gewährleisten. Die zahlreichen Zellen des sogenannten angeborenen Immunsystems exprimieren verschiedene Moleküle auf der Oberfläche, wodurch sie in der Lage sind, Pathogene zu erkennen und eine unmittelbare Immunantwort im Körper zu induzieren. Hierbei sind vor allem Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen zu nennen, die im Zusammenspiel eine rasche Bekämpfung potentieller Krankheitserreger sicherstellen (Riera Romo, Perez-Martinez, & Castillo Ferrer, 2016). Das erworbene (adaptive) Immunsystem hingegen besteht aus weniger Zelltypen, welche Moleküle auf der Oberfläche tragen, die spezifisch für ein einzelnes Pathogen, Allergen oder Toxin sind. Trifft ein solches Antigen auf die entsprechende Zelle, wird diese dazu angeregt sich zu vermehren und zu einer Effektorzelle zu differenzieren. Damit ist die erworbene Immunabwehr zwar der angeborenen zeitlich unterlegen, kann dafür aber eine Art immunologisches Gedächtnis bilden, indem langlebige ruhende Zellen gebildet werden (Farber, Netea, Radbruch, Rajewsky, & Zinkernagel, 2016). Diese können auch Jahrzehnte nach dem ersten Kontakt mit dem Antigen erneut reaktiviert werden und damit bei einem zweiten Kontakt eine schnellere Immunantwort hervorrufen. Im erworbenen Immunsystem sorgt das Zusammenspiel zwischen T- und B-Zellen für eine antigenspezifische Erkennung und Eliminierung pathogener Eindringlinge (Chaplin, 2010).

Das Immunsystem ist durch diese zwei Systemkomponenten in der Lage, die meisten Krankheitserreger zu eliminieren und den Körper zu schützen.



Ausschlaggebend ist dabei die Fähigkeit zwischen „eigen“ und „fremd“ unterscheiden zu können, sodass sich die zerstörerischen Maßnahmen des Immunsystems nicht gegen körpereigenes Gewebe oder eigene Zellen richten. Dafür ist die sogenannte Selbsttoleranz notwendig, ohne die es zu diversen Autoimmunerkrankungen kommen kann. Um die Selbsttoleranz zu erreichen, durchlaufen die T-Zellen im Thymus einen Mechanismus, bei dem über Antigenpräsentation diejenigen Zellen eliminiert werden, welche körpereigene Antigene als fremd erkennen. Somit verlassen nur die T-Zellen, die zwischen körpereigen und körperfremd unterscheiden können, den Thymus als reife, funktionstüchtige Zellen (Kim & Cho, 2017).

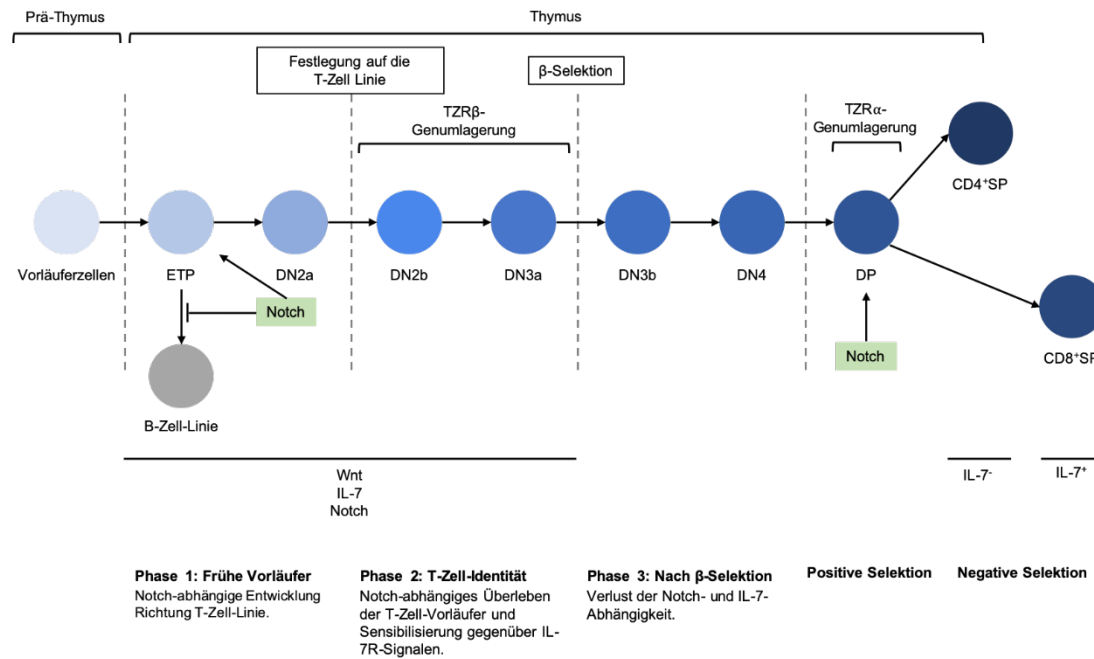
## **1.2 T-Zell-Entwicklung**

### **1.2.1 Von einer Thymozytenvorläuferzelle bis zur funktionsfähigen T-Zelle**

Zunächst migrieren unreife T-Zell-Vorläufer vom Knochenmark (KM) in den Thymus, in welchem sie dann verschiedene Stadien der Thymozytenentwicklung durchlaufen. Jedes Stadium wird durch die Oberflächenexpression des  $\alpha\beta$  T-Zell-Rezeptors ( $\alpha\beta$  TCR), sowie der CD4- bzw. CD8-Moleküle definiert. Zunächst hat der  $\alpha\beta$  TCR die Funktion, Peptidantigene zu erkennen, die in einem Komplex mit Klasse I oder II Major Histocompatibility Complex (MHC) Proteinen präsentiert werden. Diese  $\alpha\beta$ -T-Zellen differenzieren in verschiedene Untergruppen, wobei am Ende entweder CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen entstehen (SP). CD8<sup>+</sup> Zellen dienen vor allem dazu, mit intrazellulären Pathogenen infizierte Zellen abzutöten, während die CD4<sup>+</sup> T-Zellen als T-Helfer-Zellen bezeichnet werden und an der Regulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems beteiligt sind (Ellmeier, Sawada, & Littman, 1999). Um als funktionsfähige Zelle den Thymus verlassen zu können, müssen verschiedene Entwicklungsschritte von den Zellen durchlaufen werden. Dieser Prozess beginnt in der subkapsulären Zone des Thymus, in welcher die unreifen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark beginnen zu differenzieren und zu proliferieren. In diesem Stadium trägt die Zelle weder

CD4 noch CD8 auf der Oberfläche, was als doppelt negatives (DN) Stadium bezeichnet wird. Dieses wiederum lässt sich in vier verschiedene Stadien unterteilen, welche durch die Expression von CD44 und CD25 definiert werden (D., J., T., & A., 1993). Haben die Zellen das DN Stadium beendet, findet eine TCR Umlagerung statt, wofür ein Rearrangement der TCR  $\beta$ -Kette notwendig ist. Sobald die Zellen diesen Prozess abgeschlossen haben, migrieren sie in den Kortex des Thymus. Hier kommt es zu einem Rearrangement der  $\alpha$ -Kette des TCR, wodurch ein funktionierender  $\alpha\beta$  TCR gebildet werden kann (Chaplin, 2010).

Anschließend findet die positive Selektion statt, bei der überprüft wird, ob die doppelt positiven (DP) Zellen, die sowohl CD4 als auch CD8 auf der Oberfläche tragen, eine genügend hohe Affinität zu Selbst-MHC-Molekülen aufweisen, um später eigene Antigen-MHC-Komplexe erkennen zu können (Marrack & Kappler, 1997). Ist eine Affinität zu Klasse I MHC Molekülen vorhanden, entwickelt sich die Zelle zu einer einzeln-positiven (SP)  $CD4^+CD8^+$  Zelle. Ist die Affinität zu Klasse II MHC Molekülen stärker, entwickelt sie sich zu einer  $CD4^+CD8^-$  Zelle (Bosselut, 2004). Besteht weder zu MHC I noch zu MHC II Molekülen eine Affinität, unterliegt die Zelle der Apoptose (dem Zelltod) und wird durch Thymus-spezifische Makrophagen beseitigt. Hat sich die Zelle jedoch bis ins SP Stadium entwickelt, gelangt sie in das Thymusmark und wird dort auf mögliche Autoreaktivität geprüft. Diese negative Selektion umfasst das Testen, ob die Zelle auf verschiedene gewebsspezifische Proteine positiv reagiert und damit zu einer erhöhten Autoimmunität führen könnte (Klein, Kyewski, Allen, & Hogquist, 2014). Ist dies der Fall, geht die Zelle ebenfalls in Apoptose und kann den Thymus nicht als reife Zelle verlassen. Störungen innerhalb dieses Mechanismus des programmierten Zelltods sind oftmals Ursache maligner proliferativer Erkrankungen. In weniger als 5% der Fälle überleben die Zellen sowohl die positive als auch die negative Selektion und können damit zu einer funktionsfähigen T-Zelle heranreifen, was in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt ist.



**Abbildung 1: Die Entwicklung der Thymozytenvorläuferzelle zur reifen T-Zelle.**

In der vereinfachten Darstellung der Thymozytenentwicklung migrieren Vorläuferzellen aus dem KM (Knochenmark) in den Thymus und entwickeln sich, unterstützt durch Signale des Notch-, WNT- und IL-7-Signalweges von einer Vorläuferzelle zu einer funktionsfähigen CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> SP. Hierbei werden diverse Phasen durchlaufen, in denen die Vorläuferzellen zu reifen T-Zellen selektioniert werden (positive und negative Selektion), die zwischen fremden und eigenen Peptiden unterscheiden können, um letztendlich pathogene Eindringlinge erkennen und eliminieren zu können. Abbildung modifiziert (Hosokawa & Rothenberg, 2017; Shah & Zuniga-Pflucker, 2014; Yui & Rothenberg, 2014).

Wie in Abbildung 1 dargestellt, sind zusätzlich Effekte des Notch- als auch des IL-7R-Signalweges essentiell, um eine Entwicklung zu einer reifen SP Zelle zu gewährleisten. Dabei sind sowohl im frühen DN als auch im späteren DP Stadium Prozesse wichtig, die in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben werden.

## 1.2.2 Der Notch-Signalweg

Für die Entwicklung der T-Zellen ist das Notch-Signal ein zusätzlicher entscheidender Faktor. Dieses sorgt für das Zellwachstum, die Proliferation und das Überleben der heranreifenden Zellen. Die Notch-Protein-Familie besteht aus vier Mitgliedern (Notch 1-4), wobei die Notch-Rezeptoren heterodimere transmembrane Rezeptoren darstellen.

Die Signalübertragung wird initiiert, wenn ein Notch-Ligand einer Nachbarzelle an die große extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors einer weiteren Zelle bindet. Liganden, die diesen Prozess bewirken, sind Delta1, 3 und 4, sowie Jagged1 (Jag1) und Jagged2 (Jag2). Anschließend wird Notch durch Proteasen gespalten und die intrazelluläre Domäne von Notch (ICN) dissoziiert. Dadurch kann sich diese von der Membran lösen und in den Nukleus translozieren, in welchem es zur Aktivierung der weiteren Signalkaskade kommt. Im Nukleus sind unter anderem transkriptionelle Repressoren Zielgene von Notch1, wie das Hairy-Enhancer of Split (Hes1, Hes5) und das Hes-verwandte Repressorprotein (Hesr). Eine Überexpression von Hes1 und Hes5 resultiert in einer Hemmung der B-Zell-Entwicklung. Zusätzlich ist die Proliferation früher Thymozyten stark beeinträchtigt, wenn ein Mangel von Hes1 vorliegt (Weerkamp, van Dongen, & Staal, 2006). Somit bewirkt das Notch-Signal zunächst die Entwicklung der Vorläuferzellen in Richtung T-Zell-Linie. Dies zeigten zusätzlich Studien, in denen bedingt deletiertes Notch1 in Mäusen zu einem Entwicklungsstopp im DN1-Stadium der Thymozyten führte und deren anschließende Entwicklung Richtung B-Zell-Linie begünstigte (Wilson A., MacDonald H.R., & F., 2001).

Auch im späteren Verlauf der Thymozytenentwicklung, vor allem beim Übergang von DN zu DP, stellt das Notch-Signal einen wichtigen Bestandteil dar. Im Zusammenspiel mit dem preTCR sorgt es dafür, dass mTOR (Target of Rapamycin Komplex) hochreguliert wird. Dadurch wird die Expression von CD71 und CD98 induziert, was in Kombination mit PDK1 und mTOR abhängiger Aktivierung von AGC Serin Kinasen die Grundlage für die Entstehung und Proliferation der verschiedenen differenzierten Zellpopulationen nach der  $\beta$ -Selektion ist. Damit wird nicht nur das Überleben der Zellen über das Notch-

Signal reguliert, sondern auch die Differenzierung der Vorläuferzellen in Richtung verschiedener T-Helfer-Zellen. Das Notch-Signal steuert im Zuge dessen die Entwicklung der CD8-T-Zellen entweder in Richtung der Gedächtniszellen oder der ausdifferenzierten Effektorzellen (Amsen, Helbig, & Backer, 2015).

Der Notch-Rezeptor-Status variiert über die vollständige T-Zell-Entwicklung hinweg, wenn auch die konsequente Herunterregulation im DP-Stadium essenziell für die weitere Entwicklung der Zelle ist. Ist diese Regulation beispielsweise durch eine Mutation des Notch-Rezeptors gestört, kann dies zu einer malignen Entartung unreifer Vorläuferzellen führen (Aster, Blacklow, & Pear, 2011).

In einer Analyse von 1991 wurde Notch1 das erste Mal mit der Leukämie-Entstehung in Verbindung gebracht, da Untersuchungen verschiedener ALL-Proben mit einer balancierten Translokation (7;9) auf Notch1 aufmerksam machten (Ellisen L.W. et al., 1991). Diese Translokation resultierte in einer konstitutiven Notch1-Polypeptid-Expression, was in murinen, hämatopoietischen Stammzellen (HSZ) innerhalb kürzester Zeit zur Entwicklung einer T-ALL führte (Aster et al., 2011). Nachfolgend wurden in über 60% der primären humanen TLLs (T-Zell-lymphatischen Leukämien) aktivierende Mutationen in Notch1 beobachtet, was Notch1 näher in den Fokus der Forschung über die Pathogenese der T-ALL rückte (Weng A.P. et al., 2004). Der dahinter verborgene Mechanismus schließt unter anderem die Hochregulation mehrerer Gene ein, welche am Zellwachstum und Metabolismus beteiligt sind. Zu den Transkriptionszielen von Notch zählen beispielsweise der TCR $\alpha$  und IL-7R $\alpha$ , welche zusätzlich einen Beitrag zur Entwicklung der T-ALL leisten (Oliveira et al., 2017). Darüber hinaus überkreuzt die Notch-Signalgebung den WNT-Signalweg. Dieser ist ein entscheidender Teil der embryonalen Entwicklung und ist zusätzlich an der Proliferation von Thymozyten beteiligt. Dabei kann der WNT-Signalweg in HSZ Notch-Zielgene hochregulieren, wodurch die beiden Signalwege gemeinsam eine massive Proliferation in frühen Thymozyten induzieren (Weerkamp et al., 2006). Nicht zuletzt scheint auch die Hemmung von p53 durch

Notch ursächlich für die dysregulierte T-Zell-Proliferation zu sein (Beverly, Felsher, & Capobianco, 2005).

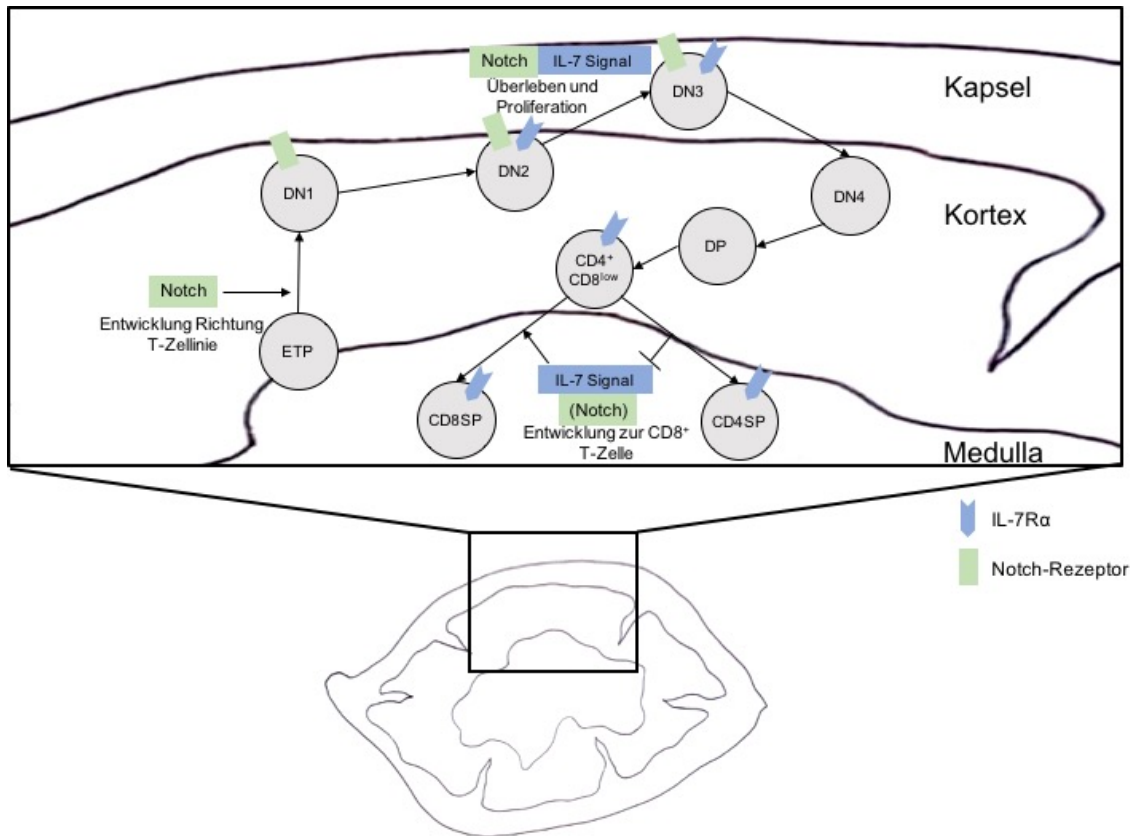
### **1.2.3 Der IL-7/IL-7R-Signalweg**

Ein weiterer unabdingbarer Signalweg für eine erfolgreiche Thymozytenentwicklung ist der IL-7/IL-7R-Signalweg. Während Notch hauptsächlich für die Entwicklung der Zelle Richtung T-Zelllinie sorgt, ist der IL-7/IL-7R-Signalweg sowohl für das Überleben der Vorläuferzellen, als auch deren Proliferation und Differenzierung von fundamentaler Bedeutung. Tatsächlich konnte in neueren Studien mit IL7R $\alpha$ -Cre-Mäusen beobachtet werden, dass alle Vorläufer der T-Zellen den IL-7R $\alpha$  exprimieren und das IL-7 Signal somit ein entscheidendes Maß für die weitere erfolgreiche Entwicklung der T-Zelle darstellt (Schlenner et al., 2010).

Das Signal wird über das Typ-I-Zytokin IL-7 eingeleitet, welches mit der  $\alpha$ -Kette des IL-7R (IL-7R $\alpha$ ) interagiert. Daraufhin wird die Rekrutierung der  $\gamma$  Kette des Rezeptors ( $\gamma$ c), sowie die Bildung eines heterodimeren Rezeptors ausgelöst, wodurch nachgeschaltete Zielgene wie NFATc1, Stat5 und das anti-apoptische protein B cell lymphoma 2 (Bcl2) vermehrt aktiviert werden und das Überleben und die Weiterentwicklung der Zelle fördern (Vicente et al., 2010). Dementsprechend konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine fehlende IL-7-Signalgebung zu einem Entwicklungsstopp im frühen CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>DN3-Stadium führt (Hong, Luckey, & Park, 2012). Weiterhin konnte bereits 1998 beobachtet werden, dass Mutationen, welche einen Funktionsverlust des IL-7R $\alpha$  oder der  $\gamma$ c-Kette nach sich ziehen, beim Menschen zu einem schweren kombinierten Immundefektsyndrom (SCID) führen können (Puel A., Ziegler S.F., Buckley R.H., & W.J., 1998).

Die IL-7-Signalgebung beginnt einhergehend mit der TCR $\beta$ -Umlagerung im DN3-Stadium und ist dabei primär für das Überleben und die Proliferation der Zellen zuständig. Zellen mit einem dysfunktionalen IL-7-Signalweg sind in diesem Stadium in ihrer Entwicklung gestört. Durch die Hochregulation nachgeschalteter

Gene, wie Bcl2, können fehlende IL-7-Signale teilweise kompensiert werden. Dies verdeutlicht die Annahme, dass die Hauptaufgabe des IL-7-Signalweges im frühen Stadium der T-Zellentwicklung in der Weitergabe der Überlebenssignale liegt (Koichi Akashi K., Kondo M., von Freedden-Jeffry, Murray R., & I.L., 1997). Ab dem DN4 Stadium wird der IL-7R $\alpha$  herunterreguliert um die Entwicklung zu CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Thymozyten zu ermöglichen. Da die IL-7-Signalgebung eine Hemmung von Faktoren bewirkt, die für das DP-Stadium essenziell sind, würde eine Persistenz der hohen IL-7R-Expression im DN4-Stadium die Weiterentwicklung zum DP-Stadium verhindern (Yu, Erman, Park, Feigenbaum, & Singer, 2004). Obwohl der IL-7R vor allem im DN-Stadium entscheidend zur Entwicklung beiträgt, spielt er auch im weiteren Verlauf der Differenzierung eine wichtige Rolle. Während der positiven Selektion im DP-Stadium kann das TCR-Signal in humanen Zellen eine Reinduzierung der Expression des IL-7R $\alpha$  und damit eine Hochregulation von Bcl-2 bewirken. Dadurch können in humanen Thymozyten DP-Zellen überleben, obwohl sie für den programmierten Zelltod bestimmt waren. Dies geschieht bei sinnvoller TCR-Reaktivität, die letztendlich eine weitere Differenzierung ermöglicht (Hong et al., 2012). In murinen Thymozyten hingegen fehlt der IL-7R $\alpha$  im DP Stadium vollständig (Oliveira et al., 2017). Bei der Differenzierung beeinflusst das IL-7-Signal, ob sich die Zelle in Richtung der CD4-T-Helferzelle oder der CD8-Killerzelle weiterentwickelt. Ist ein IL-7-Signal vorhanden, differenziert sich die Vorläuferzelle in Richtung der zytotoxischen CD8-T-Linie, während ein fehlender IL-7-Signalweg die Differenzierung der CD4-Helfer-Linie zur Folge hat (Park et al., 2010; Singer, Adoro, & Park, 2008). In Abbildung 2 ist die Entwicklung der Thymozyten dargestellt, wodurch die IL-7R- beziehungsweise Notch-Rezeptor-Expression inklusive deren Bedeutung für die Zelle nachvollzogen werden können.



**Abbildung 2: Die Thymozytenentwicklung mit entsprechender IL-7R- und Notch-Expression.**

Eine vereinfachte Darstellung der IL-7R- und der Notch-Rezeptor-Expression während der Entwicklung einer ETP (early T-cell-Progenitor) zu einer reifen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> SP im murinen Thymus. Notch garantiert am Anfang des DN-Stadiums die Entwicklung in Richtung T-Zelle und sichert im weiteren Verlauf, in Kombination mit dem IL-7-Signal, das Überleben und die Proliferation der DN-Zellen. Im DP-Stadium werden sowohl der IL-7R, als auch der Notch-Rezeptor stark herunterreguliert. Erst für die Weiterentwicklung zur einer CD8<sup>+</sup> SP ist das IL-7-Signal erneut von Bedeutung, wobei die Relevanz des Notch-Signals umstritten ist. Abbildung modifiziert (Hong et al., 2012; Hosokawa & Rothenberg, 2017).



Neben dem Notch-Signalweg wurde auch der IL-7/IL-7R-Signalweg mit der Entwicklung einer T-ALL in Verbindung gebracht. Hierbei konnte in humanen T-ALL-Proben *in vitro* eine fehlende spontane Apoptose beobachtet werden, sobald durch ein IL-7 Signal eine verstärkte IL-7-Signalkaskade ausgelöst wurde. Damit einhergehend zeigte sich eine Proliferation von menschlichen primären Leukämiezellen (Ribeiro, Melao, & Barata, 2013). Zusätzlich zeigen *in vivo* Experimente, dass sich Leukämien langsamer entwickeln, sobald T-ALL-Zellen in Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>IL7<sup>-/-</sup>-triple-defiziente Mäuse transplantiert werden, welche kein IL-7 produzieren. Dies beruht auf der dadurch fehlenden Aktivierung des IL-7/IL-7R-Signalweges, wodurch unter anderem Bcl-2 vermindert exprimiert wird und dies mit einer geringeren Lebensfähigkeit und Proliferation der Leukämiezellen einhergeht (Silva et al., 2011).

## **1.3 Lymphatische Erkrankungen**

### **1.3.1 Wie lymphatische Zellen entarten**

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, müssen bei der Entwicklung lymphoider Zellen mehrere Stadien durchlaufen werden, wobei die dafür essenziellen Signalwege genau aufeinander abgestimmt sein müssen. Sobald ein Signalweg eine Fehlfunktion aufweist, besteht die Gefahr einer Entartung der Zellen. Dies kann in einer Proliferation eines Zellklons resultieren, welcher aus funktionsuntüchtigen Zellen besteht, während sich diese ungehindert weiter vermehren und damit zu diversen lymphatischen Erkrankungen beitragen können. Dabei bieten die lymphatischen Gewebe ein breites Spektrum an Zelltypen, welche bei Fehlfunktionen in verschiedenen Stadien entarten können. In sekundären, beziehungsweise peripheren lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und Schleimhaut-assoziiertes Gewebe) treten Malignitäten reifer B- und T-Zellen auf, wie zum Beispiel das Mantelzell- oder das Hodgkin-Lymphom. In primären, beziehungsweise zentralen lymphatischen Organen (Knochenmark, Thymus) hingegen, können beispielsweise unreife B- und T-Zellvorläufer maligne transformieren. Hier sind unter anderem weit verbreitete Krankheiten, wie die B-Zell-akute lymphatische Leukämie (B-ALL) und die T-Zell-akute lymphatische Leukämie zu nennen, auf welche in der vorliegenden Arbeit noch genauer eingegangen werden soll (Dalla-Favera, 2012).

Ein genaueres Verständnis zugrundeliegender Mechanismen und potentieller therapeutischer Biomarker ist unabdingbar für die Entwicklung neuer effizienter Behandlungsmethoden im Bereich der lymphatischen Erkrankungen. Um die Pathophysiologie der Entstehung lymphoider Erkrankungen besser zu verstehen, treiben jüngste Forschungen die Untersuchung genetischer Veränderungen voran, da diese oft die Ursache von Fehlfunktionen in bestimmten Signalwegen repräsentieren. Durch zytogenetische Analysen wurden in den letzten Jahrzehnten einige chromosomale Translokationen mit bestimmten Tumorarten assoziiert und durch die Untersuchung der genetischen Veränderungen konnten klassische Proto-Onkogene wie Bcl-2 identifiziert

werden (Dalla-Favera, 2012). Doch nicht nur Mutationen in einzelnen Proto-Onkogenen können eine maligne Entartung auslösen, sondern damit einhergehend auch Veränderungen in ganzen Signalwegen. Während beispielsweise der BCR-Signalweg in der B-Zell-Reihe Onkogenität verleihen kann, rücken in der T-Zell-Reihe die JAK/STAT- und PI3K/AKT/mTOR-Signalwege in den Vordergrund. Von großer Relevanz ist außerdem der Apoptose-Signalweg, welcher hauptsächlich über Bcl-2 und p53 reguliert wird. Sind die Zellen oxidativem, onkogenem oder jeglichem intrinsischen Stress ausgesetzt, unterläuft die Zelle dem sogenannten programmierten Zelltod, der auf natürliche Weise abläuft und für die Beseitigung abnormaler Zellen entscheidend ist. Weist dieser Signalweg Defekte auf, können die Zellen unkontrolliert wachsen, was zu der Entstehung hämatologischer Malignome führen kann (Sun, Wang, & Young, 2017).

Die derzeitigen Therapien bei lymphatisch-proliferativen Erkrankungen bestehen vor allem aus der Chemotherapie (Stickstoffsenf, Vincristin, Procarbazin und Prednison), der allogenen Stammzelltransplantation und der Immunochemotherapie. Durch neuere Erkenntnisse über die Pathophysiologie wurden bereits zusätzlich Inhibitoren einiger Proto-Onkogene, wie beispielsweise Navitoclax gegen Bcl-2, eingesetzt (Han, Liang, Li, & He, 2019). Trotz der verschiedenen Therapieansätze zeigt sich in vielen lymphatischen Erkrankungen weiterhin ein anhaltendes Rezidivrisiko und nur geringfügige Verbesserungen in den Überlebenskurven. Darüber hinaus zeigt sich die Ansprechrate auf die neuartigen Therapieoptionen eher gering und zusätzlich weisen viele der neu entwickelten Medikamente schwerwiegende Nebenwirkungen auf (Husby S. & K., 2017). Ziel ist es, durch besseres Verständnis weitere Therapiemöglichkeiten zu eröffnen, die neben einem besseren Outcome auch eine Behandlung mit weniger Nebenwirkungen ermöglichen können.

### 1.3.2 T-Zell akute lymphatische Leukämie

Die T-ALL entsteht zu 80% im Kindesalter und erfährt einen zweiten Peak im Alter von ungefähr 50 Jahren, wobei insgesamt mehr Männer als Frauen davon betroffen sind. Sie macht 10-15% der pädiatrischen und 25% der Erwachsenen ALL-Fälle aus, wenn auch die Prognose im Erwachsenenalter sehr schlecht ist (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017).

Pathophysiologisch findet eine abnorme Proliferation und Differenzierung von einem Klon fehlregulierter T-Zellen statt, welche bei der Form der frühen T-ALL meist im DN Stadium verharren (Van Vlierberghe & Ferrando, 2012). Während einige genetische Syndrome, wie beispielsweise das Down-Syndrom, die Fanconi Anämie oder das Bloom-Syndrom Risikofaktoren für die Entwicklung einer T-ALL darstellen können, geht man davon aus, dass in der Mehrheit der Fälle eine *de novo* Erkrankung vorliegt (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Genetische Analysen ergaben als Ursache für die Entstehung eine Fehlregulation diverser Signalwege. Darunter befindet sich der Notch-Signalweg, der in über 60% der T-ALL Fälle dysreguliert ist. Hierbei wird das Notch-Signal vermehrt aktiviert, wodurch wie im vorherigen Kapitel erwähnt das Überleben und die Proliferation der Zellen unterstützt wird. Auch der IL-7/IL-7R-Signalweg weist in etwa 10% der pädiatrischen und 5% der erwachsenen T-ALL Fälle eine Gain-of-function-Mutation auf und ist damit ursächlich für das vermehrte Überleben und die Proliferation der entarteten T-Zellen. Hierbei werden die Signale des IL-7R über den JAK/STAT-Signalweg vermittelt, wodurch wiederum das Überleben der Zellen gesichert und die Tumorbildung begünstigt wird (Oliveira et al., 2017). Beschrieben wird außerdem ein onkogenetischer Transkriptionsfaktor namens Lmo2, welcher zu der Familie der LIM-Domänen-Proteine gehört und in bis zu 45% der T-ALL-Fälle aberrant exprimiert wird (Van Vlierberghe & Ferrando, 2012). Neueste Studien rücken zudem das pro-apoptotische p53-Protein in den Vordergrund, wobei dessen Mutationen eine kürzere Überlebensdauer einschließlich geringerer Remissionsraten, insbesondere bei Rezidiven, in betroffenen Patienten zur Folge haben (Richter-Pechanska et al., 2017). p53 gilt als Tumorsuppressor und

hemmt die potenzielle Entstehung von Krebszellen, indem es das Zellwachstum und den Zellzyklus negativ reguliert. Während p53 in vielerlei Krebsarten mutiert ist, lassen sich vor allem in Rezidivfällen der ALL-Patienten Deletionen und Punktmutationen im p53-Gen finden, welche in einem funktionellen Verlust des Proteins, einhergehend mit erhöhtem onkogenen Potential, resultieren (Demir et al., 2020).

Die derzeitige Therapie der T-ALL besteht für geeignete Patienten aus einer kombinierten Chemotherapie mit Vincristin, Corticosteroiden und Anthracycline mit allogener Stammzell-Transplantation (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Während die Chemotherapie bei pädiatrischen Fällen meist ein sehr gutes Outcome liefert und eine Heilungsrate von über 75% aufweist, findet sich nur in etwa 30-40% der erwachsenen Patienten eine gute Langzeit-Remission mit einer Heilungschance von 50% (Van Vlierberghe & Ferrando, 2012). Patienten im Alter über 60 Jahren weisen hingegen eine Langzeit-Überlebensrate von nur 10-15% auf (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Da einige Patienten die verschiedenen Therapien oftmals kaum tolerieren, dies mit einer schlechten Prognose einhergeht und häufig Rezidive der T-ALL vorkommen, ist es wichtig die genauen Mechanismen hinter der Entstehung besser zu verstehen, um weitere geeignete Therapiemöglichkeiten zu finden. In diesem Sinne ist das derzeitige Forschungsziel, die Entwicklung verschiedener Inhibitoren voranzutreiben, die in dysregulierten Signalwegen Onkogene hemmen. Vor allem sind hier die  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) zu nennen, welche die Freisetzung der aktiven intrazellulären Domäne von Notch1 durch Blockierung der proteolytischen Spaltung der Notch-Rezeptoren verhindern. Auch im IL-7/IL-7R-Signalweg finden Inhibitoren der JAK/STAT-Signaltransduktion bereits Anwendung (Van Vlierberghe & Ferrando, 2012). Da der Mechanismus hinter der T-ALL jedoch eine hohe Komplexität aufweist, werden auch hier weiterhin bessere Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Signalwege angestrebt, um gezieltere Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

## 1.4 Die SLy/SASH Proteinfamilie

Die Familie der SLy/SASH-Proteine besteht aus den drei hoch homologen Mitgliedern SH3 protein expressed in lymphocytes (SLy) 1 (SASH3), SLy2 (HACS1, NASH1 und SAMSN1) und SASH1 (SLy3). Alle Mitglieder weisen im strukturellen Aufbau eine hohe Ähnlichkeit auf und besitzen die Protein-Protein-Interaktionsdomänen SAM (sterile alpha motif) und SH3 (Src homology 3). Als Adapterproteine sind die SLy-Proteine durch die Interaktionsdomänen befähigt, Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Signaltransduktions-Effektorproteinen zu koordinieren und stellen damit einen wichtigen Bestandteil eines funktionierenden Signal-Netzwerkes in der Zelle dar (Jaufmann et al., 2021).

SLy1 ist das erstentdeckte Protein der Familie und wird ausschließlich in Lymphozyten exprimiert (Beer et al., 2001). Es stellt einen bedeutenden Bestandteil der Thymozytenentwicklung dar, wobei dessen Rolle innerhalb entwicklungsrelevanter Signalwege noch nicht vollständig geklärt ist. Grundsätzlich fungiert SLy1 als wichtiger Modulator des Immunsystems. Das folgende Kapitel beschreibt seine Struktur und seine Funktionen.

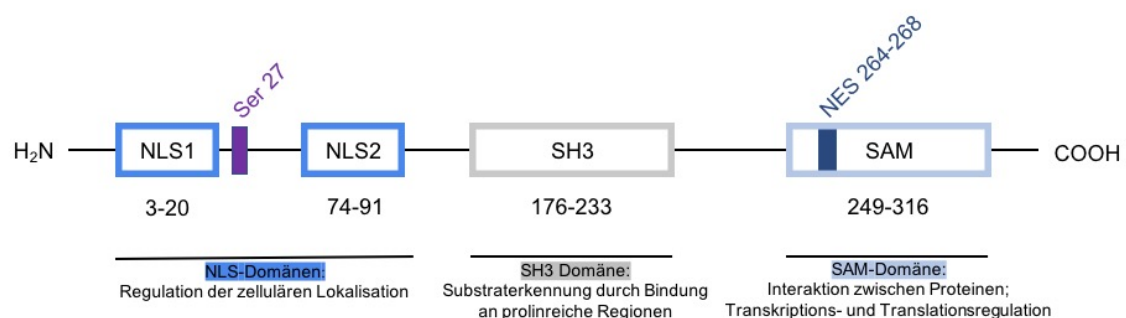
SLy2 ist eines der SLy-Mitglieder und wird in hämatopoetischen Geweben, Endothelzellen, Muskel, Herz, Gehirn, Lunge, Pankreas, myeloischen Leukämien und Myelomen exprimiert (Brandt et al., 2010; Claudio J. et al., 2001; Uchida et al., 2001). Es befindet sich auf dem menschlichen Chromosom 21 und könnte an der gestörten Immunität gegenüber Pneumokokkeninfektionen bei Down-Syndrom Patienten beteiligt sein (Schmitt et al., 2015). Hierbei beeinflusst SLy2 durch Regulation der Immunglobulin-M-(IgM) Produktion in B1-Zellen das Immunsystem. Zusätzlich ist es an diversen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt und interagiert im Zellkern mit dem SAP30/HDAC1-Komplex, wodurch die Enzym-Aktivität von HDAC1 reguliert wird (Brandt et al., 2010). Eine weitere Funktion ist die Beteiligung an der Zytoskelett-Reorganisation, welche essenziell für die B-Zell-Reaktion auf Antigene ist (von Holleben, Gohla, Janssen, Iritani, & Beer-Hammer, 2011). Neben diesen zahlreichen Funktionen wurde SLy2 als Tumorsuppressor beim hepatozellulären Karzinom (HCC), Magenkrebs und bei menschlichen Lungentumoren identifiziert (Yamada et al., 2008).

Zuletzt ist das dritte Mitglied der SLy-Familie SLy3 (SASH1) zu erwähnen, welches in nahezu allen Geweben exprimiert wird. Auch SASH1 wird als Tumorsuppressor beschrieben, da bei Brust- und Darmtumoren eine starke Herunterregulation dieses Proteins festgestellt werden konnte (Franke et al., 2019; Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003).

Zusätzlich zur bisher beschriebenen Tumorsuppressor-Funktion des SLy2-, als auch des SLy3-Proteins, rückt die aktuelle Forschungsfrage SLy1 und seine Funktionalität bei der Leukämie-Pathogenese in den Vordergrund.

## 1.5 Das Adapterprotein SLy1

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf SLy1, welches als erstes Mitglied der SLy-Familie im Jahre 2001 entdeckt wurde (Beer S., Simins A.B., Schuster A., & B., 2001). Das SLy1-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, codiert für 381 Aminosäuren und wird ausschließlich in Lymphozyten exprimiert. Dabei enthält SLy1 die Protein-Protein-Interaktionsdomänen SAM und SH3, als auch eine zweigeteilte, nukleäre Lokalisationssignalsequenz (NLS) 1 und 2. In Abbildung 3 ist der strukturelle Aufbau des SLy1-Proteins dargestellt.



**Abbildung 3: Schema des strukturellen Aufbaus des SLy1-Proteins.**

Das SLy1-Protein kann durch die zweigeteilte NLS-Domäne und der sich dazwischen befindenden Ser27-Phosphorylierungsstelle zwischen Nukleus und Zytoplasma wechseln. Die SH3-, als auch die SAM-Domäne, die eine nukleäre Exportsequenz enthält (NES), ermöglichen SLy1 die Kommunikation und Interaktion mit anderen Proteinen. Die Zahlen bezeichnen die entsprechende Aminosäuren-Lokalisation. Abbildung modifiziert (Schäll, 2015).

SAM-Domänen sind an Transkriptions- und Translationsregulation, zellulären Signalübertragungen und der Regulation diverser Entwicklungsprozesse beteiligt und sind damit für die Interaktion zwischen Proteinen unentbehrlich. Neueste Studien deckten eine stabile Homodimerisierung der SAM-Domäne im SLy1-Protein auf, was darauf hindeutet, dass SLy1 als Dimer agiert (Kukuk et al., 2019). Diese Dimerisierung betont die Wichtigkeit von SLy1 als Adapterprotein, da dessen Interaktionsfläche dadurch wächst und dies mehr Angriffsfläche für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen bietet. Darüber hinaus ist die SH3-Domäne an Prozessen wie Substraterkennung, Membranlokalisierung und Regulation der Kinaseaktivität beteiligt. SH3-Domänen sind dazu befähigt hochspezifisch prolinreiche Sequenzen zu erkennen und zu binden (Kurochkina & Guha, 2013).

Weiterhin kann SLy1 bei T-Zell-Rezeptor-Stimulation durch die Protein Kinase C (PKC) an seiner Phosphorylierungsstelle Ser27 phosphoryliert werden, wodurch dessen zelluläre Lokalisation in Kombination mit NLS1 und NLS2 reguliert wird (Astoul et al., 2003; Brandt, 2010). So ist in Mausmodellen mit einem trunkierten SLy1, in welchem die Ser27-Stelle und die zweite NLS-Domäne fehlen, SLy1 ausschließlich im Zytoplasma vorzufinden (Beer et al., 2005). Verliert SLy1 die Fähigkeit in den Nukleus zu translozieren, ist die T-Zellproliferation im Vergleich zu WT Mäusen stark eingeschränkt. Zusätzlich konnte bei trunkiertem SLy1 eine starke Reduktion der T-Zell-Zytokinproduktion und eine allgemein reduzierte T-Zell-Antwort beobachtet werden (Beer et al., 2005). Nachfolgend wurde der Einfluss von SLy1 auf die Immunantwort bei einer *Listeria monocytogenes* (LM) Infektion genauer untersucht. In *ex vivo* Analysen konnte festgestellt werden, dass die T-Zellzahl bei KO Mäusen nach LM Infektion reduziert war und die KO Mäuse nach der Infektion im Vergleich zum WT früher starben. Diese dafür ursächliche, gehemmte adaptive T-Zell-Antwort ist auf eine veränderte Foxo1- (forkhead-box O1) Regulation zurückzuführen, die eine Inhibierung des Zellzyklus zur Folge hat und in diesem Zuge die T-Zell-Proliferation blockiert (Schall, Schmitt, Reis, Brandt, & Beer-Hammer, 2015). In natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ist SLy1 mitverantwortlich für die Lebensfähigkeit und Aktivierung reifer NK-Zellen in der



Peripherie, indem es als ribosomales Stützprotein fungiert (Arefanian et al., 2016).

Doch nicht nur die T-Zell-Antwort und die Funktion der NK-Zellen wird bei veränderter SLy1-Expression beeinträchtigt, sondern auch die Thymozyten-Entwicklung weist erhebliche Veränderungen im Vergleich zum WT auf. In einer Studie mit SLy1 KO Mäusen, wurde eine Reduktion der Thymuszellzahl um 50% beobachtet. Auch die Organgröße der lymphatischen Organe war signifikant verringert. Die Zellzahlreduktion der Thymozyten konnte dabei auf eine gestörte DN zu DP Progression in der Entwicklung zurückgeführt werden, wobei vermehrt Vorläuferzellen dem programmierten Zelltod unterliefen. Tatsächlich konnte festgestellt werden, dass zwar die Anzahl der DP/SP Zellen reduziert war, sich jedoch die Zahl der DN Zellen dafür verdoppelte. Vermutlich nimmt SLy1 während des gesamten DN Stadiums Einfluss, obgleich weiterhin zu klären ist in welchem Abschnitt des DN Stadiums der Entwicklungsstopp stattfindet (Reis, Pfeffer, & Beer-Hammer, 2009). Allerdings konnte in nachfolgenden Studien gezeigt werden, dass die Zellzahlreduktion der Thymozyten in SLy1 KO Mäusen teilweise durch eine Bcl-2-induzierte Hochregulation der zellzyklusinhibierenden Gene p27 und p130 verursacht wurde. Da Bcl-2 ein wichtiger Bestandteil des IL-7/IL-7R-Signalweges ist und dieser wiederum in die Pathogenese der T-ALL einzuordnen ist, ergaben sich hierbei die ersten Hinweise, dass SLy1 in die Pathogenese lymphoproliferativer Erkrankungen involviert sein könnte. Darauf aufbauend wurde aufgrund erhöhter SLy1-mRNA Level in humanen T-ALL-Proben die Rolle von SLy1 als möglicher Tumorinduktor diskutiert, während gleichzeitig auf die Notwendigkeit weiterer Analysen hingewiesen wurde (Schäll, 2015). Aufgrund dessen wird die Relevanz des SLy1-Proteins in diversen Signalkaskaden im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Auf Basis des derzeitigen Forschungsstandes ist bekannt, dass SLy1 eine wichtige Rolle bei der Thymozytenentwicklung spielt. So konnte in SLy1 KO Mäusen eine beeinträchtigte Entwicklung der Thymozyten vor allem im DN-Stadium beobachtet werden, was auf eine Dysregulation zahlreicher Gene zurückzuführen ist. Da bisher erbrachte Erkenntnisse darauf schließen lassen, dass SLy1 in entwicklungsrelevanten Signalwegen, wie dem Notch- und dem IL-7/IL-7R-Signalweg, integriert sein könnte, sollen die Komponenten dieser Signalwege in der vorliegenden Arbeit genauer analysiert werden. Dafür soll die Expression einiger beteiligter Gene der Signalwege in SLy1 KO Mäusen gemessen und der Aktivitätszustand bestimmter Signalwege auf Proteinebene untersucht werden. Um weitere Hinweise auf mögliche Interaktionspartner von SLy1 zu bekommen, sollen zusätzlich Arrays durchgeführt werden, welche eine Aussage über veränderte Expressionsmuster in SLy1 KO Thymozyten erlauben. Somit soll die Einbindung von SLy1 in die Thymozytenentwicklung besser aufgeklärt werden können. In dieser Arbeit soll ferner der durchaus vorstellbare Zusammenhang zwischen SLy1-Defizienz und Entwicklung einer T-ALL geklärt werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die SLy1-Expression in T-ALL Patienten auf mRNA Ebene verändert zu sein scheint und in SLy1 KO Mäusen dieselben Signalwege dysreguliert sind, wie dies auch in T-ALL-Zellen zu beobachten ist, sollen Leukämie-Arrays mit SLy1 KO Thymozyten durchgeführt werden. Dabei wird erwartet, weitere Gene detektieren zu können, welche sowohl in der T-ALL als auch in SLy1 KO Mäusen eine veränderte Expression aufweisen. Zusätzlich sollen mögliche Zusammenhänge bei SLy1-Defizienz und der Dysregulation in Leukämie-Zellen entschlüsselt werden. Mithilfe der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit soll die Funktion von SLy1 im Hinblick auf die Thymozytenentwicklung genauer aufgeklärt und mögliche Interaktionspartner diskutiert werden. Außerdem soll sich mit SLy1 als mögliche Ursache für die Fehlregulation in entarteten T-ALL-Zellen auseinandergesetzt und damit einhergehend mögliche Therapieansätze genauer beleuchtet werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Bezugsquellennachweis

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien werden im folgenden Teil in Tabellen aufgelistet.

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tabelle 1: Chemikalien**

Chemikalien	Hersteller	Standort
$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
FCS	GE Healthcare	München, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Isofluran	CP Pharma	Burgdorf, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen	Hilden, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PMA	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
DirectPCR Lyse Reagenz	VIAGEN	Los Angeles, USA
Proteinase K	Gene On	Nürnberg, Deutschland
RPMI	GE Healthcare	München, Deutschland

## 2.1.2 Kits

**Tabelle 2: Kits**

Kit	Beschreibung	Hersteller
BD™ CompBeads	Kompensationspartikel	BD Biosciences
CD4 MicroBeads	T-Zell-Aufreinigung	Miltenyi Biotec
CD8 MicroBeads	T-Zell-Aufreinigung	Miltenyi Biotec
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	cDNA-Synthese	Applied Biosystems
Pan T Cell Isolation Kit 2	T-Zell-Aufreinigung	Miltenyi Biotec
TCR $\gamma\delta$ T Cell Isolation Kit mouse BD	T-Zell-Aufreinigung	Miltenyi Biotec
Ter-119 MicroBeads	Erythrozyten- Depletion	Miltenyi Biotec
Micro-Kit	DN-Zell Isolation	Qiagen
Mini-Kit	DP-Zell Isolation	Qiagen
RT2 first strand kit	cDNA Umschreibung	Qiagen
RT2 PreAmp cDNA Synthesis Kit	cDNA Umschreibung	Qiagen
DNA, RNA and protein purification NucleoSpin RNA	RNA Isolierung	Macherey- Nagel

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Nicht in der Tabelle gesondert aufgeführte Verbrauchsmaterialien wurden entweder von Sarstedt, Greiner, BD Biosciences oder Eppendorf bezogen.

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

Chemikalien	Hersteller	Standort
96 well PCR-Platte, weiß	Greiner Bio-one	Frickenhausen, Deutschland
MACS Separation Columns (LD)	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mikropipetten 10 µl	Brand	Wertheim, Deutschland
Microstrainer SST™ Tubes	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
PCR 12er-SoftStrips	Biozym Biotech Trading	Wien Österreich
Zellsieb 70 µm	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland

## 2.1.4 Geräte

**Tabelle 4: Geräte**

Name	Hersteller	Standort
HERAcell Inkubator	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
HERAsafe Sterilbank	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
LightCycler 480 2	Roche	Mannheim, Deutschland
MACS Multiständer	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mikroskop PrimoVert	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
MidiMACS™ Seperator	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
NanoDrop Lite	Peqlab	Erlangen, Deutschland
peqSTAR 2x Gradient Thermocycler	Peqlab	Erlangen, Deutschland
QIAxcel	Qiagen	Hilden, Deutschland
BD FACSCanto™2	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
FACS Aria	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Fisher Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

## 2.1.5 Medien und Puffer

**Tabelle 5: Medien und Puffer**

Medium / Puffer	Zusammensetzung
Stimulationsmedium	500 ml RPMI (10%) FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) 3 mM L-Glutamin  0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
MACS Puffer	PBS, $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ steril, 500 ml + 0,5% BSA (Stammlösung 10%) + 2,5 mM EDTA (Stammlösung 0,5 M pH8)
FACS Puffer	PBS + 5% FCS + 0,1% $NaN_3$
Lyse Puffer	500 mM KCl +100 mM Tris mit pH 8,3 +0,1 mg/ml Gelatine +1 % NP-40 +1 % Tween20 +500 $\mu$ g/ml Proteinase K

## 2.1.6 Primer

**Tabelle 6: Primer**

Name	Forward Primer	Reverse Primer
Foxo1	5'-ctt caa gga taa ggg cga ca-3'	5'-gac aga ttg tgg cga att ga-3'
Foxo3	5'-gct aag cag gcc tca tct ca-3'	5'-ttc cgt cag ttt gag ggt ct-3'
Notch1	5'-ctg gac ccc atg gac-3'	5'-agg atg act gca cac att gc-3'
Notch2	5'-tgc ctg ttt gac aac ttt gag t-3'	5'-gtg gtc tgc aca gta ttt gtc at-3'
Notch3	5'-agc tgg gtc ctg agg tga t-3'	5'-aga cag agc cgg ttg tca at-3'
Notch4	5'-gga cct gct tgc aac ctt c-3'	5'-cct cac aga gcc tcc ctt c-3'
IL-7R	5'-cga aac tcc aga acc caa ga-3'	5'-aat ggt gac act tgg caa gac-3'
$\beta$ -Aktin	5'-aag gcc aac cgt gaa aag at-3'	5'-gtg gta cga cca gag gca tac-3'
Stat5a	5'-tgc agg cag atg tga agt tag-3'	5'-gcg gtg gag gct gtt act t-3'
Stat5b	5'-cga ttc ggg ctc tgt agg-3'	5'-tac aag gcc tgc atc tgg t-3'
Trp53	5'-gca act atg gct tcc acct g-3'	5'-tta ttg agg gga gga gag tac g-3'



## 2.1.7 Antikörper

**Tabelle 7: Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper für Durchflusszytometrie**

Antigen	Fluorochrom	Spezies	Hersteller
CD8a	FITC	Rat	BD Biosciences
CD4	Pacific Blue	Rat	BD Biosciences
CD8a	PE	Rat	BD Biosciences
CD90	APC	Rat	BD Biosciences
$\gamma\delta$ TCR	FITC	Hamster	BD Biosciences
pStat5	PE	Mouse	BD Biosciences
pAkt	PE	Mouse	BD Biosciences
Kontrolle Isotyp	PE	Hamster	BD Biosciences
CD4	APC	Rat	BD Biosciences
CD90	FITC	Rat	BD Biosciences

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Tierexperimente**

#### Generierung und Haltung von SLy1 KO Mäusen

Die Zucht von SLy1 KO Mäusen wurde bereits im Jahr 2009 beschrieben (Reis, et al., 2009). Die Tiere wurden in der Tierhaltung Pharmakologie/Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen unter standardisierten Bedingungen gehalten, wobei der Tag-Nacht-Rhythmus 12 Stunden betrug und die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter hatten. Die Zucht wurde den Versuchsplänen angepasst, sodass 8-12 Wochen alte Mäuse für die Versuche verwendet werden konnten. Für die Genotypisierung wurden die Jungtiere nach drei Wochen abgesetzt, mittels einer Ohrlochkodierung markiert und anhand der genomischen PCR Ergebnisse in „Knockout“ und „Wildtyp“ unterteilt.

#### Präparation des Thymus

Sämtliche Tierexperimente erfolgten laut den Tierversuchangaben und wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Anzeige vom 23.05.2013). Für die Organentnahme wurden die ausgewählten Mäuse mit Isofluran anästhesiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Der Operationsbereich wurde zunächst mit 70%igem Ethanol gereinigt und nachfolgend der Thymus vorsichtig semisteril entnommen.

#### Genotypisierung der Mäuse

Um den vorher bestimmten Genotyp der Mäuse zu bestätigen, wurde ein kleines Stück Gewebe vom Schwanz der Maus entnommen. Die Ohrloch- oder Schwanzspitzenbiopsie wurde in einem Gewebelysepuffer bei 55°C für circa sechs Stunden lysiert. Nach der 15-minütigen Hitzeinaktivierung bei 94°C wurden die Lysate zentrifugiert und der Überstand, in welchem sich die genomische DNA befindet, abgenommen. Anschließend wurde mit diesen Proben eine PCR mit

entsprechenden Primern durchgeführt und die Bandenlängen im Qiaxel analysiert.

**Tabelle 8: SLy1 KO Programm für die PCR**

Zyklen	Dauer	Temperatur	Funktion
1	3 Min.	95°C	Aktivierung der Taq-Polymerase
40	15 Sek.	95°C	Denaturierung
	30 Sek.	64°C	Primerhybridisierung
	90 Sek.	72°C	Elongation
1	10 Min.	72°C	Finale Elongation

## 2.2.2 Molekularbiologische, zell- und immunbiologische Methoden

### Analyse der Thymozyten, DN- und DP-Zellen

#### *a) Isolation doppelt negativer und doppelt positiver Thymozyten*

Zur Gewinnung der Thymozyten, DN- und DP-Zellen wurden gentechnisch veränderte SLy1 KO Mäuse verwendet, deren Alter zwischen 8 und 12 Wochen betrug, wobei sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet wurden. Nachdem der Thymus entnommen wurde, wurde er in 5 ml PBS aufgenommen und durch ein Nylon-Sieb gepresst. Die Suspension wurde zentrifugiert und das Zell-Pellet in 10 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe von Trypanblau, welches durch seine permizide Wirkung in tote Zellen gelangen und diese blau darstellen kann, und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Um die Zellen zu färben, wurde eine Antikörper-Lösung hergestellt, die aus zwei ml PBS, CD90-APC (1:1000),  $\gamma\delta$ TCR-FITC (1:100), CD4-Pacific Blue

(1:800) und CD8-PE (1:200) je Probe bestand. Die Suspension wurde dann 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und am Ende in PBS aufgenommen, wobei die gewünschte Endkonzentration  $20 \times 10^6$  Zellen pro ml betrug. Anschließend wurden die Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie in der Core Facility der Hautklinik UKT gesortet, so dass man sowohl doppelt negative, als auch doppelt positive Thymozyten gewinnen konnte.

*b) Isolation weiterer doppelt negativer T-Lymphozyten mittels MACS*

Da die Reinheit der doppelt-negativen Zellen, als auch deren Menge für die weiteren Versuche nicht ausreichend war, wurde die schon im Labor etablierte MACS-Methode verwendet, um weitere doppelt negative Thymozyten zu isolieren. Hierzu wurden SLy1 KO Mäuse verwendet, deren Thymus isoliert, welcher durch ein Nylon-Sieb gedrückt und die Suspension am Ende zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Pellet in PBS aufgenommen (1:10) und die Zellen wurden mithilfe von Trypanblau in der Neubauer Zählkammer gezählt. Erneut wurde die Suspension zentrifugiert und anschließend je  $10^8$  Zellen in 400  $\mu$ l MACS-Puffer, 50  $\mu$ l Non-T-cell-Depletion Cocktail und 50  $\mu$ l Ter-119-Ak resuspendiert und 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Die Ter-119 Beads und der Non-T-cell Depletion Cocktail sorgen dafür, dass nur die vorhandenen Thymozyten durch die Magnetsäule gelangen, während die übrig gebliebenen, durch Antikörper markierten Zellen, an der Magnetsäule haften bleiben. Zunächst wurden zwei ml MACS-Puffer durch die LD-Säulen, befestigt an einem MACS-Separator, gegeben um diese vor Zugabe der Zell-Suspension zu spülen. Die inkubierten Zellen wurden dann in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen, zentrifugiert, das entstandene Pellet in 500  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert und erneut in die Magnetsäule gegeben. Mit weiteren 500  $\mu$ l wurden die restlichen Zellen aus dem Röhrchen gespült und ebenfalls in drei Säulen pipettiert. Nach diesem Durchlauf wurden die Säulen zwei Mal mit einem Milliliter MACS-Puffer gespült. Die positive Fraktion, die an der Säule hängen geblieben ist, wurde verworfen, während die negative Fraktion, bestehend ausschließlich aus Thymozyten, im Röhrchen in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen worden ist und zentrifugiert

wurde. Dieses Pellet wurde anschließend in 350 µl MACS-Puffer, 50 µl Anti-Biotin Beads, 50 µl CD4 Beads und 50 µl CD8a Beads resuspendiert und erneut 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Durch diese Marker konnte gewährleistet werden, dass alle Zellen, die entweder CD4, CD8 oder beides auf der Oberfläche exprimieren, an der Säule magnetisch haften bleiben und nur die doppelt negativen Zellen (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) in das Röhrchen gelangen. Nachdem die Säule mit zwei Millilitern MACS-Puffer gewaschen wurde, wurden die inkubierten Zellen zunächst abzentrifugiert, in einem Milliliter MACS-Puffer aufgenommen und auf die Säule gegeben. Nach zwei Mal Waschen der Säule mit je einem Milliliter MACS-Puffer, wurde erneut die positive Fraktion verworfen, während die negative Fraktion abzentrifugiert und in fünf Milliliter PBS aufgenommen wurde.

Zur Überprüfung der Reinheit, wurden die Zellen mit CD4, CD8, CD90 und  $\gamma\delta$ TCR gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessen.

#### *c) RNA-Isolation*

Um die RNA der separierten Zellen zu isolieren, wurde für die doppelt-negativen Zellen das Qiagen Micro-Kit verwendet und für die doppelt-positiven Zellen das Qiagen Mini-Kit (jeweils nach Anleitung des Herstellers). Da die Zellzahl der gesamten Thymozyten zu hoch für diese Kits war, wurde das NucleoSpin Kit von Macherey-Nagel für die RNA Isolation der Thymozyten verwendet.

Die isolierte RNA wurde anschließend mithilfe des NanoDrops gemessen, um sowohl die Menge als auch die Reinheit der isolierten RNA zu bestimmen.

#### *d) Expressionsanalyse anhand der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion*

Um die Expression von Stat5a, Stat5b, Trp53, IL7R, Notch1 und Notch3 zu untersuchen, wurde zunächst die isolierte RNA der gesorteten Proben verwendet und in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das „High capacity Transription kit“ von Applied Biosystems verwendet und anhand des Protokolls des Herstellers gearbeitet. Anschließend wurde mithilfe von RNase-freiem Wasser, SYBR-Green und den entsprechenden Primern ein Mastermix hergestellt, der in eine 96-well Platte pipettiert wurde. Darauffolgend wurde die Platte im Roche Light Cycler 490 96-well mit dem in Tabelle 9 beschriebenen analysiert und mit der

Software des LightCyclers ausgewertet. Als Referenz diente dabei  $\beta$ -Aktin, während die Kalibrierung mit einem internen Standard durchgeführt wurde. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte über GraphPadPrism.

**Tabelle 9: Cycler Programm für die Genexpressions-Analyse**

Zyklen	Dauer	Temperatur	Funktion
1	5 Min.	95°C	Präinkubation
45	10 Sek.	95°C	Denaturierung
	10 Sek.	60°C	Primerhybridisierung
	10 Sek.	72°C	Elongation

*e) Analyse des Notch-Signalweges anhand eines Arrays*

Um den Notch-Signalweg näher zu untersuchen, wurden vorgefertigte PCR Platten von Qiagen verwendet, bei denen für den Signalweg spezifische Primer in den Wells vorgelegt sind. Die RNA Proben wurden ebenfalls in cDNA umgeschrieben und anschließend preamplifiziert. Danach wurde die Probe, zusammen mit SYBR Green und Nuklease-freiem Wasser, in die Wells pipettiert und folgendes Programm im Roche Light Cycler 480 verwendet:

**Tabelle 10: Cycler Programm für die Notch-Signalweg-Analyse**

Zyklen	Dauer	Temperatur	Funktion
1	10 Min.	95°C	Denaturierung
45	15 Sek. 1 Min.	95°C 60°C	Primerhybridisierung Elongation

*f) Analyse des IL-7R-Signalweges*

Der IL-7/IL-7R-Signalweg wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinexpressionsebene untersucht.

Analyse auf RNA-Ebene mittels quantitativer PCR

Für die Analyse auf RNA-Ebene wurde die oben beschriebene Methode der Genexpressionsanalyse des IL7-Rezeptors mittels qPCR durchgeführt.

Analyse auf Protein-Ebene mittels Durchflusszytometrie

Um die Stat5-Phosphorylierung in Thymozyten auch auf Protein-Ebene genauer zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst für zwei Stunden in RPMI Medium im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde ein Teil der Zellen mit IL-7 und als positive Kontrolle mit PMA / Ionomycin für 15 Minuten stimuliert.

Nach der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und gefärbt. Dabei wurde eine extrazelluläre Färbung, bestehend aus CD90 – APC, CD8a – FITC und CD4 – Pacific Blue verwendet. Nach 15 Minuten wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend mithilfe des Lyse/Fix Buffers (BD Biosciences) für 10 Minuten fixiert. Nachdem die erneut gewaschenen Zellen mithilfe des Perm Buffer (BD Biosciences) für eine halbe Stunde permeabilisiert wurden, konnten sie jeweils intrazellulär entweder mit pStat5 – PE, pAkt – PE oder Iso-Typ- PE gefärbt werden. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Zellen einmal gewaschen und anschließend in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen, um die Durchflusszytometrie anzuwenden. Dabei war es wichtig eine Kompensation durchzuführen, die es verhindert, dass eine Farbe in einen Kanal einer anderen Farbe strahlt und damit unerwünschte Überschneidungen stattfinden. Durch Einmessen gleichbehandelter Proben, die jeweils nur mit einer Farbe markiert waren, konnte die BD FACSDiva Software eine Kompensation durchführen, wodurch falsch positive Ergebnisse vermieden werden konnten. Die Messung wurde am FACS Canto II durchgeführt und die Ergebnisse anschließend mit Hilfe der FlowJo Software ausgewertet.

#### *g) Leukämie Array*

Die isolierte RNA der doppelt-negativen und doppelt-positiven Proben, die mithilfe des Nano-Drops als rein gemessen wurde (zwischen 1,8 und 2,2), wurde anhand des RT<sup>2</sup> First strand Kits von Qiagen nach Anleitung des Herstellers in cDNA umgeschoben und preamplifiziert.

Mit der dadurch gewonnen cDNA wurde ein Leukämie Array mit dem RT<sup>2</sup> Profiler PCR Leukemia array von Qiagen ebenfalls nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und anschließend anhand der Qiagen-Vorlagen analysiert.



**Tabelle 11: Cycler Programm für die Leukämie-Signalweg-Analyse**

Zyklen	Dauer	Temperatur	Funktion
1	10 Min.	95°C	Aktivierung der Taq-Polymerase
45	15 Sek.	95°C	Denaturierung
	1 Min.	60°C	Primerhybridisierung Elongation

### **2.2.3 Statistische Analysen**

Die statistischen Analysen wurden entsprechend der Beschreibungen der Abbildungen durchgeführt. Dabei wurden alle quantitativen PCRs anhand des Programms „GraphPad Prism“ ausgewertet, die Ergebnisse auf Normalverteilung geprüft und anschließend mit dem geeigneten Test die Signifikanzen berechnet. Daten, die mithilfe spezieller Kits erhoben wurden, wurden anhand der vorgefertigten Programme der jeweiligen Firma bearbeitet. Die statistische Analyse erfolgte nach Anleitung des Herstellers mithilfe eines studentischen t-Tests. Die Abbildungen wurden mit FlowJo und GraphPad Prism erstellt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Analyse des Notch-Signalweges in SLy1 KO Thymozyten**

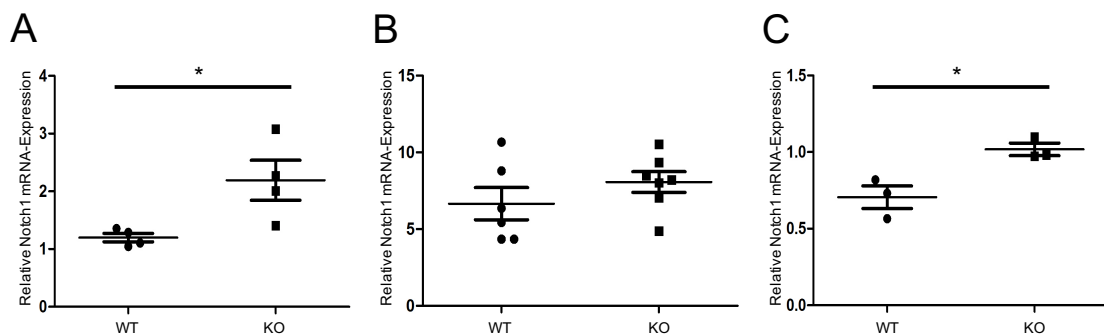
Der Notch-Signalweg ist essentiell für die Proliferation und Differenzierung der DN-Thymozyten, da er während der  $\beta$ -Selektion in Kombination mit dem TZR-Signal für das Überleben der T-Zell-Vorläufer sorgt (Aster et al., 2011). Ohne das Notch1-Signal ist die Weiterentwicklung vom DN- zum DP-Stadium nicht möglich (Suliman et al., 2011). Frühere Studien haben gezeigt, dass SLy1-defiziente Mäuse eine Reduktion in ihrer Thymozytenanzahl aufweisen, welcher durch einen Entwicklungsstopp zwischen dem DN- und dem DP-Stadium bedingt ist (Reis et al., 2009). Um mögliche Auswirkungen eines SLy1-Defekts auf verschiedene Komponenten des Notch-Signalweges zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe der quantitativen PCR der Expressionsstatus von Notch1 und Notch3, sowie weiterer involvierter Gene analysiert.

#### **3.1.1 Erhöhte Notch1- und Notch3-Expression in SLy1 KO Thymozyten**

Die Expression von Notch1 wird in gesunden Zellen im DN-Stadium der Thymozytenentwicklung stark hochreguliert, um dann im DP-Stadium wieder herunter reguliert zu werden. Sobald dieser Mechanismus gestört ist, sind unreife T-Zell-Vorläufer nicht in der Lage, sich vom DN-Stadium in das nächste Stadium zu differenzieren und erfahren einen Entwicklungsstopp. Wie aus Abbildung 4 A ersichtlich, ist die Expression von Notch1 in SLy1-defizienten Gesamt-Thymozyten signifikant erhöht. Dies bestätigt die bisherige Vermutung, dass SLy1 in sich entwickelnden T Zellen mit der Notch-Signalkaskade in Verbindung steht. Um herauszufinden, in welchem speziellen Entwicklungsstadium der Thymozyten Notch1 vermehrt exprimiert wird, wurde der Expressionsstatus

zusätzlich in isolierten DN Thymozyten (Abbildung 4 B) und DP Thymozyten (Abbildung 4 C) untersucht.

Im DN-Stadium lassen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede erkennen, während im DP-Stadium eine deutlich erhöhte Notch1-Expression in SLy1-defizienten Thymozyten vorliegt (Abbildung 4B und 4C). Dies deutet darauf hin, dass die natürliche Herunterregulation von Notch1 im DP-Stadium in Abwesenheit von SLy1 nicht mehr gewährleistet werden kann. Zusätzlich bestätigen diese Ergebnisse, dass Notch1 im DN-Stadium um ein Zehnfaches höher exprimiert wird, als im darauffolgenden DP-Stadium. Daraus lässt sich schließen, dass die physiologische Hochregulation von Notch1 auch in Abwesenheit von SLy1 funktioniert, während die darauffolgende Herunterregulation im DP-Stadium beeinträchtigt ist und die Thymozyten an ihrer natürlichen Entwicklung gehindert werden.



**Abbildung 4: Expressionsanalyse von Notch1 in SLy1 KO und WT Thymozyten.**

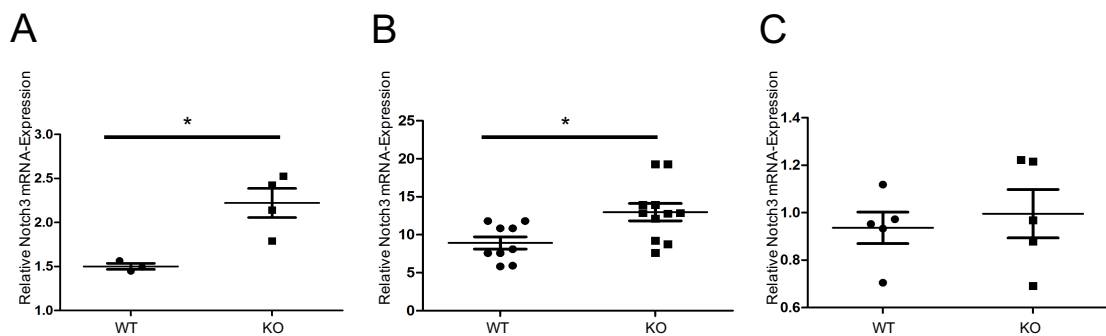
Die Notch1-Expression wurde mittels qPCR in (A) Gesamt-Thymozyten, (B) isolierten DN-Thymozyten und (C) isolierten DP-Thymozyten gemessen. Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SEM von n=3-7 Mäusen. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; \*  $p < 0,05$ ; Studentischer t-Test.

Neben Notch1 spielt gleichermaßen Notch3 eine entscheidende Rolle bei der Thymozytenentwicklung. Vor allem im DN3-Stadium wird die Notch3 mRNA stark hochreguliert, wobei davon ausgegangen wird, dass dies ebenfalls einen notwendigen Schritt für die nachfolgende  $\beta$ -Selektion darstellt (Suliman et al., 2011). Wie Notch1 wird auch Notch3 in gesunden Zellen bei der Differenzierung

zum DP-Stadium wieder stark herunterreguliert, um damit die weitere Entwicklung der Zellen einzuleiten (Felli M.P. et al., 1999). Weiterhin ist davon auszugehen, dass Notch3 downstream von Notch1 einzuordnen ist (Suliman et al., 2011). Um zu überprüfen, ob eine SLy1-Defizienz auch die Notch3-Expression beeinflusst, wurde mittels qPCR in SLy1-defizienten und WT Thymozyten der Notch3-Expressionsstatus gemessen. Erneut wurde die Expression in den verschiedenen Entwicklungsstadien einzeln geprüft, um die Auswirkungen in SLy1 KO Thymozyten besser einordnen zu können.

In Abbildung 5 A ist erkennbar, dass auch Notch3 in den Gesamthymozyten der SLy1 KO Mäuse signifikant hochreguliert wird. Interessanterweise konnte in diesem Fall im DN-Stadium eine signifikant höhere Notch3-Expression festgestellt werden, wogegen im DP-Stadium kein signifikanter Unterschied festzustellen ist (Abbildung 5B und 5C).

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Abwesenheit des SLy1-Proteins die physiologische Hochregulation von Notch3, insbesondere im DN-Thymozytenstadium, verstärkt, während im späteren Entwicklungsstadium keine Auswirkungen zu beobachten sind.

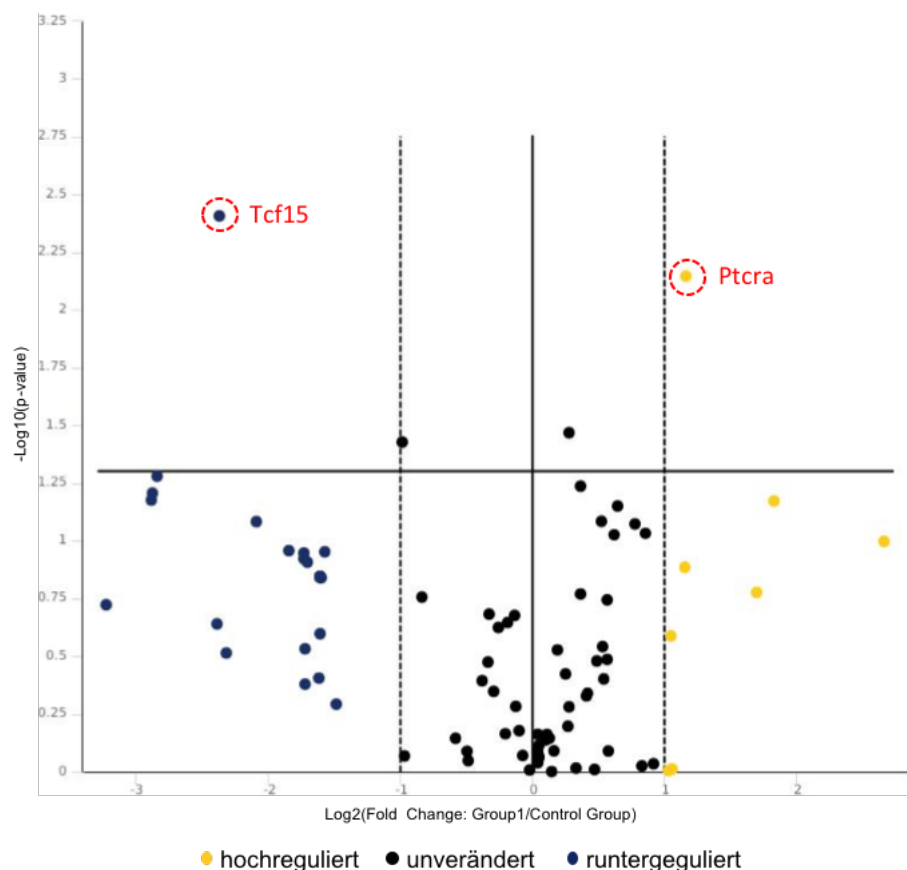


**Abbildung 5: Expressionsanalyse von Notch3 im Vergleich WT und SLy1 KO Mäusen.**

Die Notch3-Expression wurde (A) in Gesamt-Thymozyten, (B) in isolierten DN-Thymozyten und (C) in isolierten DP-Thymozyten mittels qPCR gemessen. Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SEM von n=4-8 Mäusen. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; \*  $p < 0,05$ ; Studentischer t-Test.

### 3.1.2 Weitere Auswirkungen der SLy1-Defizienz im Notch-Signalweg

Da die ersten Ergebnisse auf eine Beteiligung des SLy1-Proteins innerhalb des Notch-Signalweges hinweisen, wurde ein vorgefertigtes Array durchgeführt. Dieses enthält eine Reihe relevanter Gene, die für einen funktionierend ablaufenden Notch-Signalweg obligat sind. Um zu überprüfen, ob und in welchem Entwicklungsstadium das Fehlen von SLy1 Einfluss auf die Expression anderer Zielgene im Notch-Signalweg nimmt, wurden auch hier isolierte DN- und DP-Thymozyten verwendet und unabhängig voneinander untersucht.



**Abbildung 6: Notch-Array mit SLy1 KO DP Thymozyten.**

Volcano Plot zur Darstellung der Expression der Notch-Signalweg-relevanten Gene im Vergleich von SLy1 WT zu SLy1 KO Mäusen mittels Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array; Die Abbildung zeigt den Mittelwert von n=8 Mäusen/Genotyp aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zunächst wurden isolierte DP-Thymozyten analysiert (Abbildung 6). Dabei ist deutlich erkennbar, dass das Fehlen von SLy1 sowohl zu einer Hochregulation (in Gelb dargestellt), als auch zu einer Herunterregulation (in Blau dargestellt) verschiedener Gene führt.

Um einen besseren Überblick zu gewinnen, sind die dysregulierten Gene in Tabelle 12 aufgelistet.

Auffällig ist hierbei die über sechsfach höhere Expression von Jag1 (Jagged1) in SLy1-defizienten DP-Thymozyten. Jag1 ist eines der fünf Oberflächenproteine (Liganden), welche mit den vier Rezeptoren des Notch-Signalweges interagieren können. Sobald eine Interaktion zwischen Jag1 und dem Notch-Rezeptor stattfindet, beginnt eine Kaskade von proteolytischen Spaltungen, welche wiederum die Aktivierung der Transkription nachgeschalteter Zielgene bewirkt.

Auffällig stark herunterreguliert ist im Gegenzug das Protein Frzb, welches einen Antagonist des Wnt-Signalweges darstellt (Leyns L., Bouwmeester T., Kim S., Piccolo S., & E., 1997). Der Wnt-Signalweg ist neben dem Notch-Signalweg einer der zwei wichtigsten Signalkaskaden, die für die ersten Schritte der T-Zell-Entwicklung essentiell sind und auch bei der Entstehung von Leukämien eine Rolle spielen (Weerkamp et al., 2006).

Durch die vorliegende Herunterregulation von Frzb fällt somit die Antagonisierung des Wnt-Signalweges weg, wodurch dieser verstärkt ablaufen kann. Der derzeitige Forschungsstand vermutet eine Interaktion des Notch- und des Wnt-Signalweges, wobei beide Signalwege die T-Zell-Entwicklung begünstigen (Weerkamp et al., 2006).

Eine weitere Auffälligkeit ist die Hochregulation von Hes5, ein basic-helix-loop-helix Protein welches downstream von Notch als Transkriptionsinhibitor fungiert (Weerkamp et al., 2006). Hes5 ist unter anderem essentiell für die Entwicklung der Vorläuferzellen in Richtung der T-Zell-Linie, da in dessen Abwesenheit eine Vermehrung der B-Zell-Population beobachtet werden konnte (Varnum-Finney, Dallas, Kato, & Bernstein, 2008). Damit könnte die erhöhte Hes5-Expression eine Gegenregulation der Zellen sein, der reduzierten T-Zell-Anzahl, die in SLy1 KO Mäusen vorzufinden ist, entgegenzuwirken.

Darüber hinaus ist die signifikante Hochregulation des *Ptcra* Genes zu erwähnen, welches für das Protein pTα kodiert. Dieses stellt ein weiteres Zielgen des Notch-Signalweges dar und ist ein essentieller Teil für den Zusammenbau des Prä-TZR-Komplexes (Reizis & Leder, 2002). Die Notch-vermittelte Induktion der pTα-Expression garantiert somit den erfolgreichen Ablauf der T-Zell-Entwicklung, wobei die erhöhte Expression des *Ptcra* Genes das verstärkte Notch-Signal in den vorherigen Ergebnissen widerspiegelt.

Signifikant herunterreguliert wird hingegen der Transkriptionsfaktor 15 (*Tcf15*), welcher einen wichtigen Faktor für die Differenzierung embryonaler Stammzellen darstellt (Davies et al., 2013). Auf Basis des aktuellen Forschungsstandes ist wenig über die Rolle von *Tcf15* im Notch-Signalweg, beziehungsweise in der T-Zell-Entwicklung, bekannt.

**Tabelle 12: Hoch- und runterregulierte Gene in SLy1 KO DP Thymozyten.**

Gen	Hochreguliert	Gen	Runterreguliert
Jag1	6.32	Frzb	-9.36
Hes5	3.56	Id4	-7.40
Fjx1	3.23	Hes7	-7.33
<i>Ptcra</i> *	2.23	S1pr3	-7.18
Snai1	2.22	Cxcl1	-5.22
Foxf1	2.08	<i>Tcf15</i> *	-5.16
Pdgfb	2.07	Krt14	-4.99
Cx3cl1	2.05	Nodal	-3.29
		Ptgs2	-3.29
		Pcdh8	-3.06
		Cxcl12	-3.05
		Il33	-3.05
		Igfbp3	-3.05
		Wnt5a	-3.05
		MGDC	-3.05
		Kitl	-3.05

Pdgfra	-3.05
Myf5	-3.05
Msc	-3.05
Tnc	-3.05
Mark1	-3.05
Foxd3	-3.05
Dkk1	-3.05
Efna1	-3.05
Bdnf	-3.05
Adamts1	-3.05
Edn1	-3.05
Hey2	-3.02

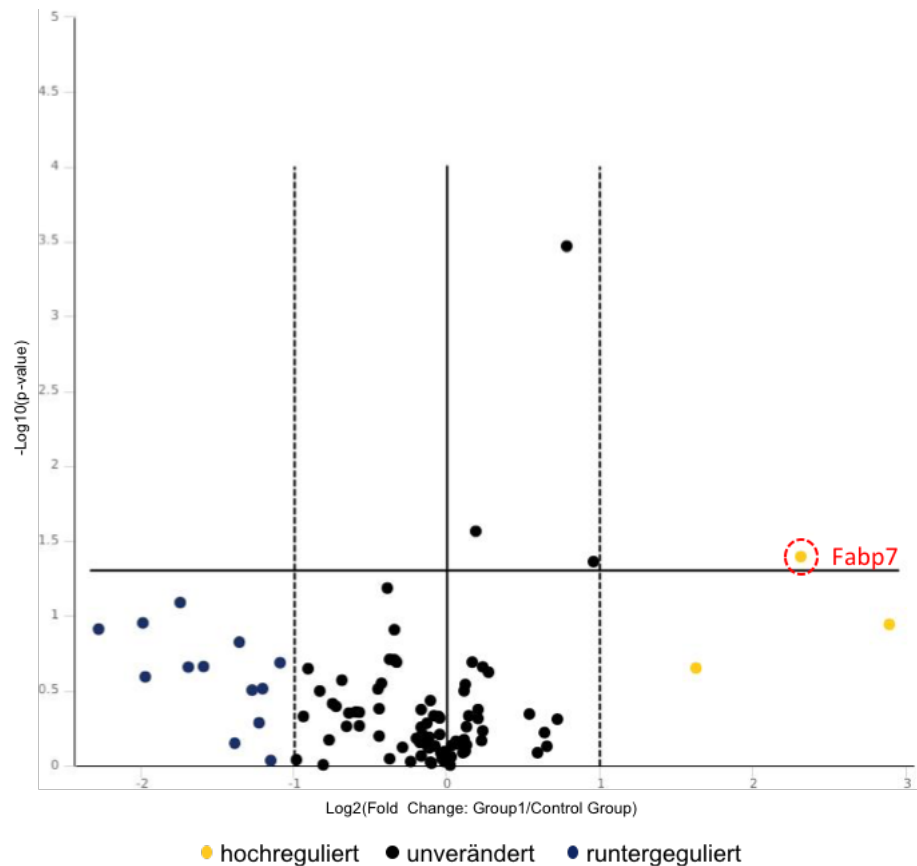
---

Tabelle der hoch- (links dargestellt) und runterregulierten Gene (rechts dargestellt) in SLy1 KO DP Thymozyten im Vergleich zum Wildtyp. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz \*  $p < 0,05$ .

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass auch im späteren Entwicklungsstadium der SLy1-defizienten Thymozyten Gene dysreguliert werden, die für die Differenzierung und Proliferation von Vorläufer-T-Zellen unverzichtbar sind. Diese korrespondieren mit der hochregulierten Notch-mRNA und verursachen somit gemeinsam eine verstärkte Notch-Signalkaskade in SLy1 KO Thymozyten.

Um herauszufinden, ob eine SLy1-Defizienz bereits im frühen DN-Stadium der Thymozyten zu veränderten Expressionslevels entwicklungsrelevanter Gene führt, wurden anschließend die DN Populationen der WT und SLy1 KO Mäuse untersucht. In Abbildung 7 ist das hierbei entstandene Expressionsmuster von DN-Thymozyten aus SLy1 KO und WT Mäusen gegenübergestellt. Wie bereits zuvor für das DP-Stadium beobachtet, resultiert das Ausschalten von SLy1 in einer Dysregulation verschiedener Gene.





**Abbildung 7: Notch-Array mit SLy1 KO DN Thymozyten.**

Volcano Plot zur Darstellung der Expression der Notch-Signalweg-relevanten Gene in isolierten DN-Thymozyten im Vergleich von SLy1 WT zu SLy1 KO Mäusen mittels Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array; Die Abbildung zeigt den Mittelwert von n=8 Mäusen/Genotyp aus zwei unabhängigen Experimenten.

Aus der detaillierten Auflistung der dysregulierten Gene in Tabelle 13 lässt sich erkennen, dass Fabp7 signifikant hochreguliert ist. Fabp7 ist eines der Fettsäurebindenden Proteine (Fatty Acid Binding Proteins, FABPs), welches eine Rolle bei der Aufnahme, dem Transport und dem Metabolismus von Fettsäuren spielt. Die Expression von Fabp7 wird in neuronalen Vorläuferzellen über die Notch-1-Aktivierung induziert und ist Teil der Entwicklung radialer Gliazellen (Anthony, Mason, Gridley, Fishell, & Heintz, 2005). Somit scheint sich die vermehrte Aktivierung von Notch1 in SLy1 KO Mäusen auch auf Komponenten außerhalb des Notch-Signalweges in Thymozyten auszuwirken.

Hinzu kommt, dass das Protein Msc stark hochreguliert ist. Msc ist ein Mitglied der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren, wobei seine Funktion in T-Lymphozyten noch nicht vollständig geklärt ist. Nach neusten Erkenntnissen scheint es in humanen T-Helferzellen einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Stat5b zu nehmen (Santarlaschi et al., 2017). Stat5b wiederum stellt einen wichtigen Teil des IL-7/IL7-R-Signalweges dar, welcher ebenfalls an der Entwicklung der unreifen Vorläuferzellen beteiligt ist. Da Vorarbeiten bereits zusätzliche Hinweise auf eine Rolle von SLy1 für IL-7-vermittelte Signale liefern, wurde als nächstes der IL-7/IL-7-R-Signalweg genauer untersucht.

**Tabelle 13: Hoch- und runterregulierte Gene in SLy1 KO DN Thymozyten.**

Gen	Hochreguliert	Gen	Runterreguliert
Msc	7.41	Adams1	-4.83
Fabp7 *	4.96	Hspb8	-3.97
Rbpjl	3.09	Igfbp3	-3.91
		Efna1	-3.35
		Pax6	-3.22
		Wisp1	-3.01
		Hey1	-2.61
		Bdnf	-2.56
		Pdgfra	-2.41
		Cx3cl1	-2.33
		Il33	-2.30
		Nes	-2.21
		Cxcl1	-2.12

Tabelle zur Übersicht der hoch- (links dargestellt) und runterregulierten Gene (rechts dargestellt) in SLy1 KO DN Thymozyten im Vergleich zum WT. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz \* p<0,05.

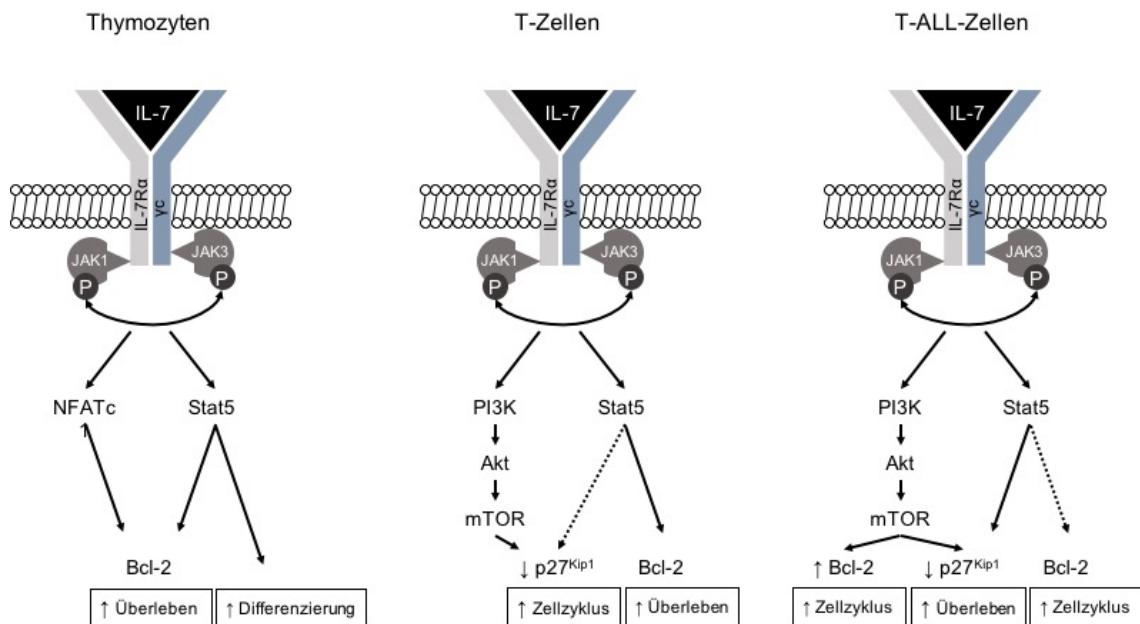
### **3.2 Analyse des IL-7/IL-7R-Signalweges in SLy1 KO Thymozyten**

Ein fehlerfreies Funktionieren des IL-7/IL-7R-Signalweges und seiner Komponenten ist unerlässlich für die normale Thymozytenentwicklung in der Maus. Während eine gestörte IL-7/IL-7R-Signalkaskade zu diversen Immundefizienzen führen kann, begünstigt eine unkontrollierte Hochregulation des Signalweges die Entwicklung lymphoider Leukämien sowie eine Resistenz gegenüber Chemotherapien (Oliveira et al., 2017). Je nach Entwicklungsstadium induziert IL-7 Signale über den Mediator Stat5, den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg oder MEK/Erk Kinasen (Oliveira, Akkapeddi, Ribeiro, Melao, & Barata, 2019). Dabei ist das Hauptziel des IL-7/IL-7R-Signalweges, sowohl das Überleben als auch die Differenzierung von T-Vorläuferzellen zu gewährleisten.

Vorarbeiten haben bereits Hinweise geliefert, dass SLy1 den IL-7/IL-7R-Signalweg beeinflusst. Dabei war zu beobachten, dass die Expression des Apoptose-regulierenden Proteins Bcl-2 in SLy1-defizienten Mäusen deutlich erhöht ist (Schäll, 2015). Bcl-2 ist ein wichtiger Bestandteil der T-Zellentwicklung und sichert über eine JAK/STAT-vermittelte Aktivierung das Überleben der DN-Thymozyten während ihrer Reifung (Wen et al., 2001).

In heranreifenden T-Zellen scheint die IL-7-Stat5-Achse essentiell für die Ausbildung eines intakten prä-TCR zu sein, wobei weitere Studien den IL-7/NFATc1-Signalweg als zusätzlichen wichtigen Faktor identifizierten (Niu & Qin, 2013). Beide Signalwege scheinen bei der Regulation der Thymozytenentwicklung in feiner Abstimmung zu kooperieren (Patra et al., 2013). NFATc1 ist ein Mitglied der NFAT-Transkriptionsfaktor Familie, welche einen wichtigen Beitrag zur Differenzierung und Funktion von T-Zellen leistet. Es wird vermutet, dass auch NFATc1 die Bcl-2 Expression verstärkt und dabei eventuell mit Stat5 interagiert (Niu & Qin, 2013).

In reifen T-Zellen wird die Bcl-2-Transkription ebenfalls über ein Signal von Stat5 initiiert, während in T-ALL-Zellen die Hochregulation von Bcl-2 unabhängig von Stat5 über den PI3K/Akt/mTOR Signalweg gesteuert wird (Oliveira et al., 2017). Anhand der Abbildung 8 sollen die verschiedenen Signalkaskaden in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien verdeutlicht werden.



**Abbildung 8: Die IL-7/IL-7R Kaskade in Thymozyten, gesunden und malignen T-Zellen.**

In Thymozyten sorgt die IL-7/IL-7R-Signalkaskade für das Überleben und die Differenzierung der unreifen Vorläuferzelle. Dabei wird das Signal über NFATc1 und Stat5 an Bcl-2 weitergeleitet, wodurch das Überleben der Zelle garantiert wird. In peripheren T Zellen hingegen wird der Zellzyklus durch IL-7 über den PI3K/Akt/mTOR Signalweg reguliert und das Überleben hängt von der Stat5-vermittelten Hochregulation von Bcl-2 ab. Anders verhält sich die Kaskade in T-ALL Zellen, wobei Bcl-2 über den PI3K/Akt/mTOR Signalweg vermittelt, hochreguliert wird und der Zellzyklus dadurch gesteuert wird. Im Gegensatz zu gesunden Vorläufer-/T-Zellen bewirkt Stat5 aber keine Hochregulation von Bcl-2, wenn eine maligne Transformation stattgefunden hat. Abbildung modifiziert (Oliveira et al., 2019).

Um herauszufinden, ob SLy1 tatsächlich einen Teil des IL-7/IL-7R-Signalweges darstellt und welche der involvierten Zielgene moduliert werden, wurden Expressionsanalysen bezüglich verschiedener Komponenten dieses Signalweges durchgeführt. Dabei konzentriert sich diese Arbeit auf die in Thymozyten relevante Stat5-Achse, wobei in zukünftigen Experimenten auch die weiteren Komponenten, dabei vor allem die NFATc1-Signalgebung, untersucht werden sollten.

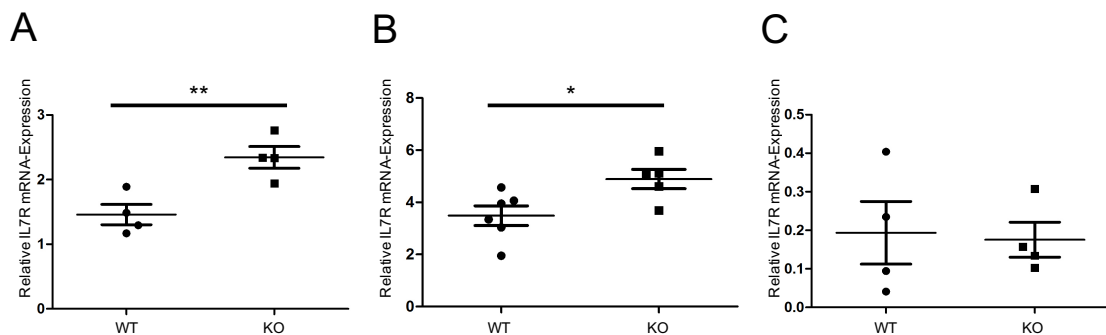
### **3.2.1 Expressionsanalyse des IL-7R, Stat5a und Stat5b**

Die bisherigen Erkenntnisse unserer Gruppe weisen eine signifikante Erhöhung der Expression des IL-7-Rezeptors in SLy1-defizienten Thymozyten auf (Schäll, 2015). Um herauszufinden, in welchem spezifischen Stadium der Thymozytenentwicklung die Expression verändert ist, wurde mittels qPCR eine Expressionsanalyse des IL-7R in isolierten DN- und DP-Thymozyten durchgeführt. Zunächst zeigen die Ergebnisse in Abbildung 9 A eine Bestätigung der vorherigen Studien, da eine signifikant höhere Expression des IL-7R in SLy1-defizienten Gesamthymozyten detektiert werden konnte. Nach weiteren detaillierten Analysen konnte festgestellt werden, dass die erhöhte Expression im Pool der Gesamthymozyten speziell auf die Population des DN-Stadiums zurückzuführen ist (Abbildung 9 B).

Im physiologischen Zustand der Zellen muss die Expression des IL-7R im DN3-Stadium (CD44-CD25+) durch die Signale der rekombinierten  $\beta$ -Kette und des prä-TCRs ( $pT\alpha$ ) erhalten bleiben, um auch bei geringeren Konzentrationen von IL-7 eine Entwicklung zum DN4 Stadium (CD44-CD25-) zu ermöglichen (Ribeiro et al., 2013). Da der IL-7R $\alpha$  jedoch die Transkription wichtiger Faktoren, die für die Weiterentwicklung zum DP-Stadium notwendig sind, hemmt, muss dieser im DN4-Stadium wieder herunter reguliert werden (Ribeiro et al., 2013). Ist dieser Mechanismus gestört, wird die Weiterentwicklung zum DP-Stadium verhindert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der IL-7/IL-7R-Signalweg durch die erhöhte Expression des IL-7R in SLy1-defizienten DN-Thymozyten verstärkt

abzulaufen scheint. Außerdem bestätigt die insgesamt über zehnfach höhere IL-7R-Expression in DN-Thymozyten von WT als auch KO Thymozyten im Vergleich zu den DP-Thymozyten, dass der IL-7R vor allem im frühen Stadium exprimiert wird, um die Weiterentwicklung der Zelle zu ermöglichen. Das Ergebnis in Abbildung 9 C weist zusätzlich daraufhin, dass die Zellen, die sich zu DP-Thymozyten weiterentwickeln konnten, keine vermehrte Expression des IL-7R im Vergleich zum WT aufweisen und die Expression des IL-7R sowohl in WT- als auch in SLy1-defizienten Thymozyten physiologisch abzulaufen scheint.



**Abbildung 9: Expressionsanalyse des IL-7R in WT und SLy1 KO Thymozyten.**

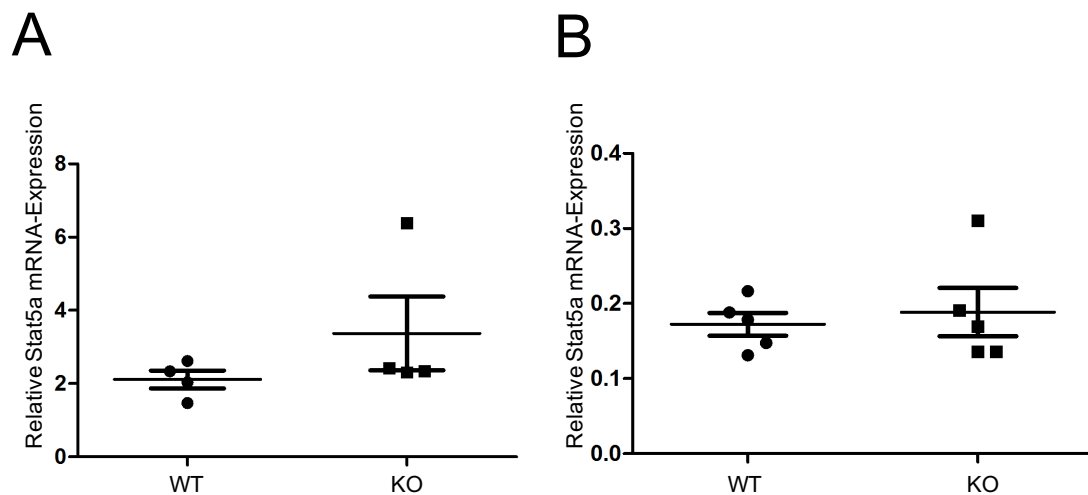
IL-7R-Expression in (A) Gesamt-Thymozyten, (B) DN-Thymozyten und (C) DP-Thymozyten mittels qPCR. Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SEM von n=4-6 Mäusen/Genotyp. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; Studentischer t-Test.

Wie Abbildung 8 verdeutlicht, initiiert die Bindung von IL-7 an seinen Rezeptor die Heterodimerisierung von IL-7R $\alpha$  und IL-7R $\gamma$ c, wobei diese Konformationsänderung die Transphosphorylierung von JAK1 und JAK3 bewirkt. Anschließend ermöglicht die Phosphorylierung von Tyrosinresten im zytoplasmatischen Rest des IL-7R $\alpha$ , dass Effektormoleküle wie Stat5 andocken und die Signalkaskade in Gang bringen können (Ribeiro et al., 2013).

Um zu überprüfen, ob die erhöhte IL-7R-Expression auch zu einer Hochregulation der mRNA nachfolgender Zielgene des Thymozyten-relevanten Signalweges führt, wurde anschließend die Stat-Achse genauer untersucht.

Dafür wurde sowohl der Expressionsstatus von Stat5a als auch von Stat5b gemessen.

Bemerkenswerterweise ergaben unsere Studien, dass eine SLy1-Defizienz den Expressionsstatus von Stat5a nicht zu beeinflussen scheint (Abbildung 10). Dies gilt sowohl für die Gesamthymozytenpopulation (10 A) als auch für die Zellen des DN-Stadiums (10 B). Interessanterweise sind gleichzeitig deutlich höhere Stat5 mRNA Level in Gesamthymozyten, als in DN-Thymozyten vorzufinden. Da nicht ausreichend Material vorhanden war, konnten die mRNA-Level in doppelt positiven Thymozyten nicht untersucht werden.

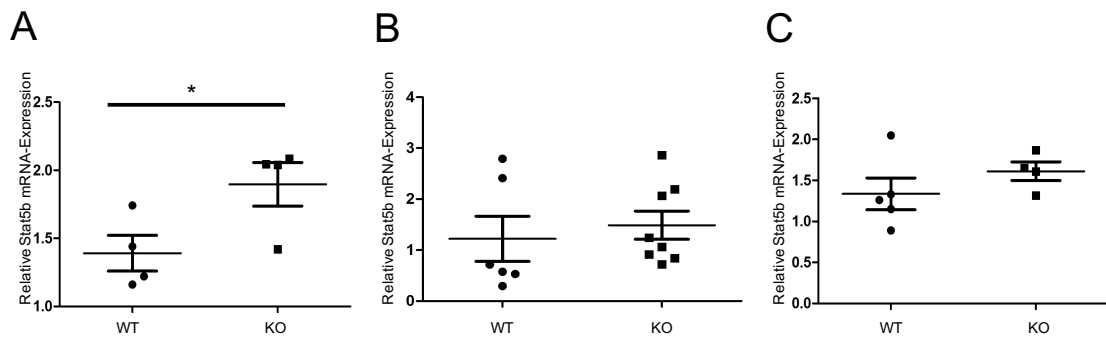


**Abbildung 10: Expressionsanalyse von Stat5a in WT und SLy1 KO Thymozyten.**

Stat5a-Expression in (A) Gesamt-Thymozyten und (B) DN-Thymozyten mittels qPCR. Graphen zeigen die Mittelwerte +SEM von (A) n=4; (B) n=5 Mäusen.

Neben Stat5a gehört auch Stat5b zur Stat-Familie und stellt einen weiteren wichtigen Teil der IL-7-vermittelten Signalkaskade dar. Stat5b transloziert nach der Phosphorylierung von Jak in den Nukleus und interagiert hier mit verschiedenen Zielgenen, unter anderem auch mit Bcl-2 (Kanai, Jenks, & Nadeau, 2012). Um zu überprüfen, ob die in früheren Studien nachgewiesene erhöhte Bcl-2 Expression durch eine vermehrte Expression von Stat5b bedingt ist, wurde diese ebenfalls mittels qPCR analysiert.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, konnte in der Tat eine signifikant höhere Expression von Stat5b in SLy1-defizienten Gesamthymozyten gemessen werden. Nach genauerer Untersuchung der isolierten DN- und DP-Thymozyten konnte jedoch unerwarteter Weise in keinem der beiden Stadien ein signifikanter Unterschied detektiert werden.



**Abbildung 11: Expressionsanalyse von Stat5b im Vergleich WT und SLy1 KO Mäusen.**

Analyse der Stat5b-Expression in (A) Gesamt-Thymozyten, (B) DN-Thymozyten und (C) DP-Thymozyten mittels qPCR. Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SEM von (A) n=4; (B) n=6-8; (C) n=4-5 Mäusen.. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; \* p<0,05; Studentischer t-Test.

Im DN-Stadium (Abbildung 11 B) ist eine deutliche Streuung der WT-Proben erkennbar, wobei auch im DP-Stadium (Abbildung 11 C) die Werte der WT-Proben uneinheitlicher sind, als es bei den KO-Proben der Fall ist. Unter genauerer Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Stadien, wird sowohl im DN- als auch im DP-Stadium eine Tendenz zur Hochregulation von Stat5b ersichtlich.

Somit scheint die in Gesamthymozyten gemessene, signifikante Erhöhung der Stat5b-Expression das Ergebnis einer Addition der Tendenzen innerhalb der einzelnen Stadien widerzuspiegeln.

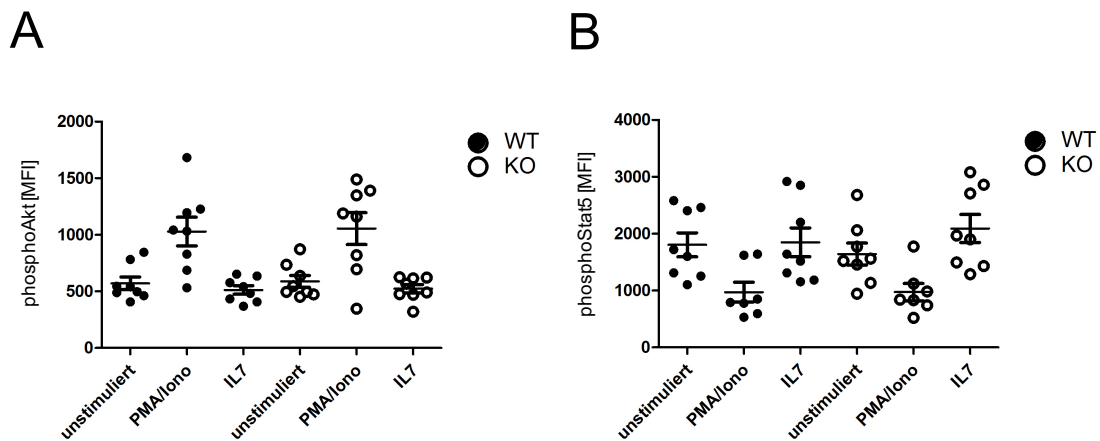


### **3.2.2 Verstärkte Stat5-Phosphorylierung in SLy1 KO Thymozyten**

Da mit den bisherigen Ergebnissen ausschließlich Aussagen über die Expression auf mRNA-Ebene gemacht werden können und diese den Aktivitätsgrad des Signalweges nicht exakt wiedergibt, wurden ergänzend Untersuchungen des IL-7-Signalweges auf Protein-Ebene durchgeführt. Hierfür wurde mittels Durchflusszytometer der Phosphorylierungsstatus der Stat5-Proteine überprüft. Dazu wurden Thymozyten von SLy1 KO und WT Mäusen isoliert, 15 Minuten entweder mit Medium, PMA und Ionomycin als Kontrolle oder mit IL-7 inkubiert, anschließend mit extrazellulärer (CD4 und CD8 Marker) und intrazellulärer Färbung (pStat5 und pAkt als Kontrolle) markiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Um den Versuch zu etablieren, wurde zunächst ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem der Phosphorylierungsstatus von Akt untersucht wurde. Es ist bekannt, dass Akt vor allem in Kombination von PMA und Ionomycin stimuliert und phosphoryliert wird (Miyamoto, 2000). Eine Stimulation mit IL-7 hingegen sollte keine Phosphorylierung von Akt bewirken, da Akt kein Induktor des IL-7R-Signalwegs darstellt. Die vorliegenden Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen, dass pAkt tatsächlich vor allem in mit PMA und Ionomycin stimulierten Proben vorzufinden ist, womit die Etablierung des Versuchs erfolgreich war.

Als nächstes wurde der Phosphorylierungsstatus von Stat5 in SLy1 KO und WT Thymozyten gemessen. Bei der intrazellulären Färbung mit Stat5 wird das Signal hauptsächlich in den mit IL-7 stimulierten Proben erwartet, da es über den IL-7 Signalweg phosphoryliert wird. Wie in Abbildung 12 erkennbar, ist der Phosphorylierungsstatus im unstimulierten und im IL-7 stimulierten Zustand sehr ähnlich, während durch die Stimulation mit PMA und Ionomycin die Phosphorylierung unterdrückt zu sein scheint.

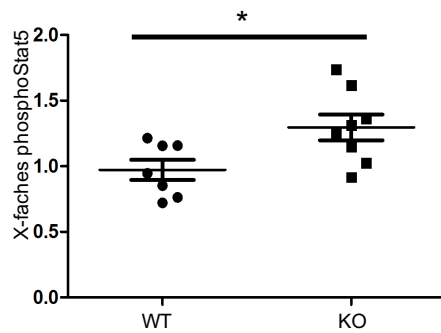


**Abbildung 12: Ex vivo Phosphorylierungsanalyse von Stat5 und Akt als Kontrolle.**

FACS-Analyse in isolierten SLy1 KO und WT Thymozyten im unstimulierten, mit PMA und Ionomycin-stimulierten und IL-7-stimulierten Zustand. (A) Messung des phosphorylierten Akt (pAkt) in SLy1 KO und WT Thymozyten; (B) Messung des phosphorylierten Stat5 (pStat5) in SLy1 KO und WT Thymozyten. Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SEM von n=8 Mäusen aus vier unabhängigen Experimenten.

Vergleicht man nun die in Abbildung 12 unstimulierten Proben mit den IL-7-stimulierten Proben der WT Thymozyten, ist nur ein sehr geringfügiger Unterschied erkennbar. Werden allerdings die unstimulierten und IL-7-stimulierten Proben der SLy1 KO Thymozyten untereinander verglichen, wird erkennbar, dass die SLy1 KO Thymozyten bei IL-7-Zugabe im Vergleich zu den unstimulierten Proben vermehrt pStat5 aufweisen.

Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung bei IL-7-Zugabe bei SLy1 KO Thymozyten tatsächlich deutlich mehr zunimmt, als bei den WT Proben, wurde als nächstes das Verhältnis der unstimulierten und IL-7-stimulierten Proben der WT und SLy1 KO Thymozyten berechnet. Dieser Vergleich ergab, dass die Abwesenheit von SLy1 tatsächlich zu einer verhältnismäßig erhöhten Phosphorylierung von Stat5 und damit zu einer verstärkten Signalkaskade in SLy1-defizienten Thymozyten führt (Abbildung 13).



**Abbildung 13: IL7-induzierte Stimulation der Stat5 Phosphorylierung.**

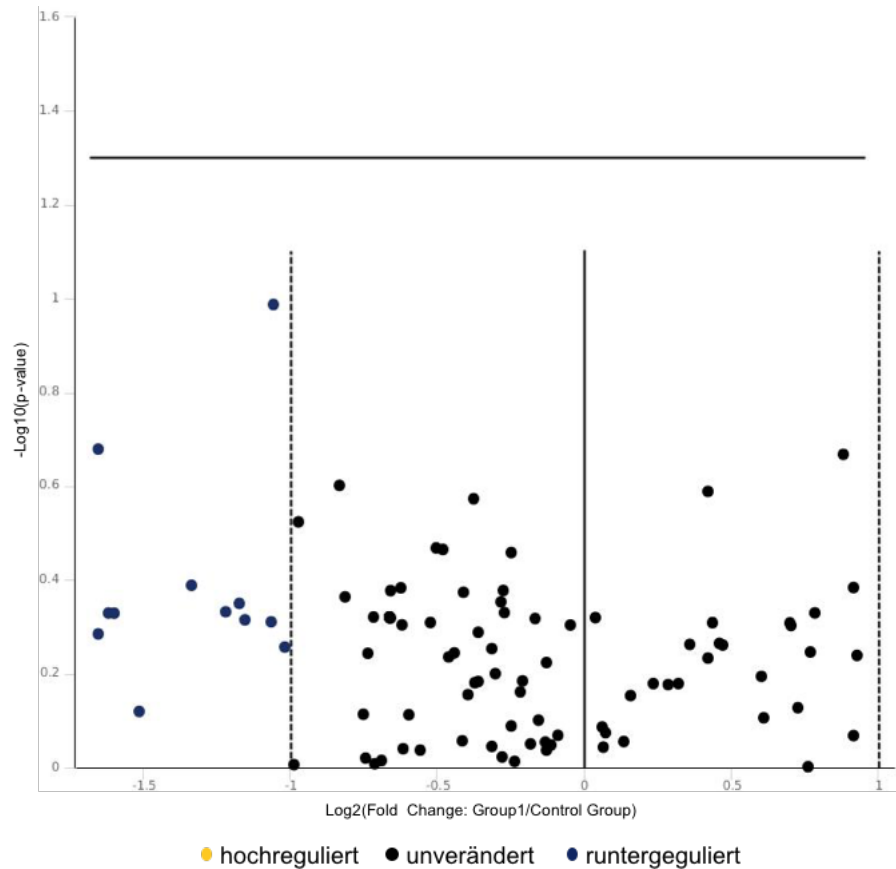
Division der IL-7-stimulierten Proben und der unstimulierten Proben von Wildtyp- und KO-Mäusen im Vergleich. Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$ SEM von n=8 Mäusen aus vier unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; \*  $p < 0,05$ ; Studentischer t-Test.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Ausschalten von SLy1 eine erhöhte IL-7R-Expression bewirkt und als Konsequenz nachgeschaltete Zielgene des Signalweges, wie zum Beispiel Stat5b, hochreguliert werden. Allerdings wird nicht nur die mRNA-Expression verändert, auch auf Proteinebene konnte festgestellt werden, dass es in SLy1-defizienten Thymozyten zur vermehrten Phosphorylierung von Stat5 kommt. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass das SLy1-Protein unerlässlich für eine normale Thymozytenentwicklung ist. Bei einem Wegfall, kommt es zu einer verstärkten IL-7/IL-7R-Signalkaskade, wie sie auch in über 10% der pädiatrischen T-ALL Erkrankungen beobachtet werden kann (Oliveira et al., 2019). Um nun weitere Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen SLy1-Defizienz und der Entwicklung einer T-ALL zu bekommen, wurde als nächstes ein Leukämie-Array durchgeführt.

### **3.3 Veränderte Expression Leukämie-relevanter Gene bei SLy1-Defizienz**

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit liegt die Vermutung nahe, dass SLy1 bei der Pathogenese der T-ALL eine Rolle spielen könnte. Sowohl im Notch-Signalweg, der in 60% der T-ALL-Fälle dysreguliert ist, als auch im IL-7R-Signalweg, der in über 10% der pädiatrischen T-ALL Fälle dysreguliert ist, sind Veränderungen zu beobachten, sobald SLy1 fehlt. Um zu überprüfen, ob SLy1 einen Einfluss auf weitere Leukämie-relevante Gene nimmt, wurde im Folgenden ein Leukämie-Array angewendet. Somit können weitere Gene detektiert werden, die in Abwesenheit von SLy1 hoch- oder runterreguliert werden. Zunächst wurden DP-Thymozyten untersucht (Abbildung 14). In diesem Fall führt die Abwesenheit von SLy1 interessanterweise nur zu einer Herunterregulation (in Blau dargestellt) diverser Gene (schematisch aufgeführt in Tabelle 14).

Hierbei ist keines der Gene signifikant dysreguliert, was rückschließen lässt, dass das Fehlen von SLy1 nur geringe Auswirkungen auf Leukämie-relevante Gene im späteren DP-Stadium der Thymozytenentwicklung hat. Dies verstärkt die Hypothese, dass SLy1 seine Funktion hauptsächlich in der früheren Entwicklung erfüllt.



**Abbildung 14: Leukämie-Array mit DP Thymozyten.**

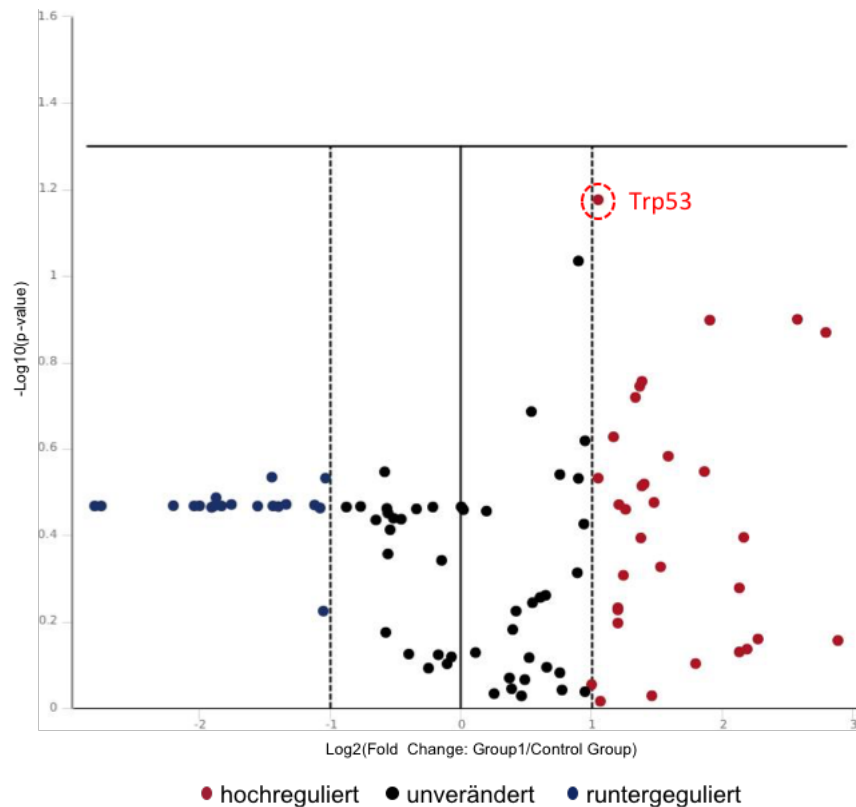
Volcano Plot zur Darstellung der Expression der Leukämie-relevanten Gene in isolierten DP-Thymozyten im Vergleich von SLy1 WT zu SLy1 KO Mäusen mittels Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array; Die Abbildung zeigt den Mittelwert von n=8 Mäusen/Genotyp aus zwei unabhängigen Experimenten.

**Tabelle 14: Runterregulierte Gene in SLy1 KO DP Thymozyten.**

Gen	Runterreguliert
Il4	-3,14
Gas2l3	-3,14
Tlx1	-3,07
Baalc	-3,03
Lyl	-2,85
Csf3	-2,52
Mertk	-2,33
Hck	-2,25
Lmo2	-2,22
Gusb	-2,09
Alox5	-2,08
Dkk3	-2,02

Tabelle zur Übersicht der runterregulierten Gene in SLy1 KO DP Thymozyten im Vergleich zum WT.

Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wurde das Array als nächstes mit DN-Thymozyten durchgeführt (Abbildung 15). Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass bei einer SLy1-Defizienz viele Gene in diesen Zellen stärker exprimiert werden.



**Abbildung 15: Leukämie-Array mit DN Thymozyten.**

Volcano Plot zur Darstellung der Expression der Leukämie-relevanten Gene in isolierten DN-Thymozyten im Vergleich von SLy1 WT zu SLy1 KO Mäusen mittels Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array; Die Abbildung zeigt den Mittelwert von n=8 Mäusen/Genotyp aus zwei unabhängigen Experimenten.

In der nachfolgenden Tabelle 15 sind die dysregulierten Gene, welche in Abbildung 15 zu sehen sind, aufgeführt. Zunächst fällt auf, dass sowohl Stat5a als auch Stat5b hochreguliert sind, was im Einklang mit vorherigen Ergebnissen steht und eine Aktivierung der IL-7/IL-7R-Signalkaskade bestätigt. Eine erhöhte Expression konnte auch für das Protein Lmo2 (LIM domain Only 2) beobachtet werden. Lmo2 ist in neoplastischen Lymphoblasten bei der T-ALL exprimiert, während es in Thymozyten von normalem Thymus oder Thymomen nicht vorhanden ist (Jevremovic, Roden, Ketterling, Kurtin, & McPhail, 2016). Studien zeigen, dass Lmo2 ebenfalls zu einer erhöhten Notch1-Expression führen kann, welche wiederum oftmals in der Entwicklung einer T-ALL resultiert (Smith et al.,

2014). Die Hochregulation von Lmo2 unterstreicht also die Erkenntnis, dass das Fehlen von SLy1 zu einer vermehrten Aktivierung des Notch-Signalweges führt. Auffällig ist außerdem auch Trp53, welches in den SLy1-defizienten DN-Thymozyten stark hochreguliert wird. Das Trp53 Gen kodiert für den Tumorsuppressor p53 und ist das am häufigsten mutierte Gen menschlicher Krebserkrankungen. p53 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose als Reaktion auf DNA-Schäden. Es ist davon auszugehen, dass p53 die Apoptose von Thymozyten bewirken kann, wenn diese die  $\beta$ -Selektion der Entwicklung nicht überwinden können (Chen, Foreman, Sant'Angelo, & Krangel, 2016). Das vorliegende Array liefert damit erste Hinweise darauf, dass die reduzierte Thymozytenanzahl zusätzlich aufgrund einer Fehlregulation des p53-Signalweges zustande kommen könnte.

**Tabelle 15: Hoch- und herunterregulierte Gene in SLy1 KO DN Thymozyten.**

Gen	Hochreguliert	Gen	Runterreguliert
Trp53	7.38	Tlx3	-6.96
Lmo2	6.95	Wif1	-6.73
Stat5a	5.97	Pml	-4.60
Sfrp2	4.85	Hck	-4.10
Il10	4.55	Fgr	-3.99
Cebpb	4.49	Alox5	-3.74
Ccl3	4.39	Bmpr1b	-3.71
Stat5b	4.38	Gas2l3	-3.65
Rac2	3.74	Cd34	-3.55
Runx1	3.65	Smo	-3.37
Apaf1	3.47		
Tlx1	3.00		

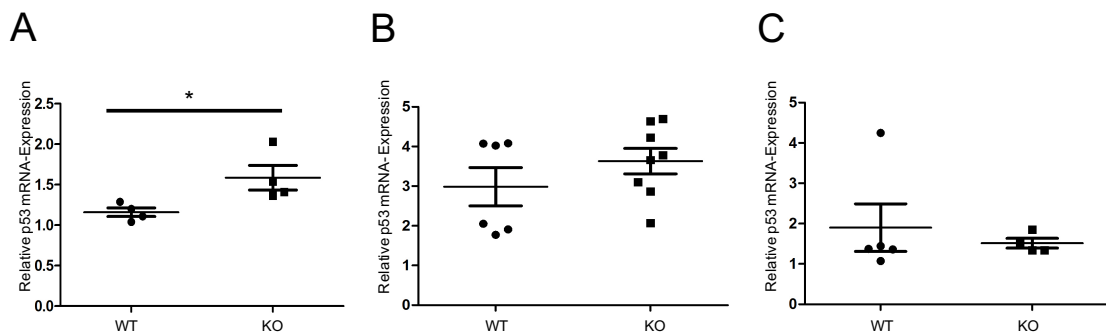
Tabelle der hoch- (links dargestellt) und runterregulierten Gene (rechts dargestellt) in SLy1 KO DN Thymozyten im Vergleich zum Wildtyp.



### **3.4 Veränderte p53-Expression im Zusammenhang mit dem IL7-R-Signalweg**

Interessanterweise scheint der IL-7/IL-7R-Signalweg mit dem p53-Signalweg verknüpft zu sein. Dabei hat die vermehrte Phosphorylierung von Stat5 eine Hemmung von p53 zur Folge, was in einer erhöhten Überlebensrate der Zellen resultiert (Ren et al., 2016). Zur Überprüfung, ob die gestörte IL-7/IL-7R-Signalkaskade in SLy1-defizienten Thymozyten mit einer Fehlregulation von p53 in Verbindung stehen könnte, wurde dessen Expressionsstatus mittels qPCR in Gesamthymozyten, in DN- und DP-Thymozyten analysiert.

Wie Abbildung 16 zeigt, wurden in den einzelnen Entwicklungsstadien keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und SLy1-defizienten Thymozyten festgestellt (Abbildung 16 B und C). Da die vermehrte Expression von Trp53 im Leukämie-Array in den DN-Thymozyten beobachtet werden konnte, wäre eine erhöhte Expression in DN-Thymozyten in der qPCR zu erwarten gewesen, bei der sich jedoch im vorliegenden Ergebnis nur eine Tendenz erkennen lässt (Abbildung 16 B). In den Gesamthymozyten der SLy1 KO Mäuse konnte jedoch eine signifikant erhöhte p53-Expression detektiert werden. Dies erklärt zum einen die reduzierte Thymozytenanzahl in SLy1 KO Mäusen, als auch die erhöhte Expression von Zielgenen des p53 Signalweges, wie Bcl-2.



**Abbildung 16: Expressionsanalyse von p53 im Vergleich WT und SLy1 KO Mäusen.**

p53-Expression in (A) Gesamt-Thymozyten, (B) DN-Thymozyten und (C) DP-Thymozyten mittels qPCR. Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SEM von (A) n=4; (B) n=6-8; (C) n=4-5 Mäusen. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; \* p<0,05; Studentischer t-Test.

Zusammenfassend untermauern diese Ergebnisse, dass SLy1 einen deutlichen Einfluss auf spezielle Leukämie-relevante Gene und Signalwege nimmt. Vor allem der IL-7/IL-7R-Signalweg scheint durch das Fehlen von SLy1 durch eine erhöhte Expression des IL-7-Rezeptors, nachfolgender Gene wie Stat5b, als auch einer erhöhten Phosphorylierung der Stat-Proteine selbst vermehrt aktiviert zu werden. Die verstärkte Phosphorylierung der Stat-Proteine bewirkt in Thymozyten unter normalen Umständen eine Hemmung von p53, wodurch das IL-7-Signal letztendlich für das Überleben der Zellen in der Entwicklung sorgt. In der vorliegenden Arbeit wäre bei vermehrt aktiviertem IL-7/IL-7R-Signalweg folglich eine niedrigere Expression von p53 zu erwarten und zeitgleich ein vermehrtes Überleben der Zellen. Allerdings konnte genau das Gegenteil beobachtet werden, wobei sowohl p53 in SLy1-defizienten Thymozyten hochreguliert war, als auch deren Überlebensrate insgesamt abnahm (Schäll, 2015). Somit lassen die vorliegenden Ergebnisse die Vermutung zu, dass eine SLy1-Defizienz die p53-Signalkaskade im Hinblick auf die Überlebensförderung unterbricht und die Zellen diesen Defekt durch eine vermehrte Aktivierung der untersuchten Signalwege zu kompensieren versuchen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Rolle von SLy1 im Notch-Signalweg

Bekannt ist, dass die Thymozytenentwicklung in SLy1-defizienten Mäusen eine Beeinträchtigung aufweist, wodurch sich eine reduzierte Gesamtzellzahl im Thymus ergibt. Die Ergebnisse der Doktorarbeit von Bernhard Reis und Daniel Schäll legen nahe, dass das Fehlen von SLy1 in einem Entwicklungsstopp von DN- zu DP-Thymozyten resultiert (Reis et al., 2009; Schäll, 2015). Da die Proliferation und Differenzierung der DN-Thymozyten sowohl von einem prä-TZR, als auch von einem Notch-Signal abhängig sind, wurde in Vorarbeiten der Zusammenhang zwischen dem Fehlen von SLy1 und der Funktion des Notch-Signalweges untersucht. Dazu wurden SLy1 KO x RAG1 KO Mäuse generiert, mit deren Hilfe das prä-TZR Signal als Ursache ausgeschlossen werden kann und der Notch-Signalweg genauer untersucht werden konnte. Ist das prä-TZR-Signal nicht vorhanden, können sich die Thymozyten zwar nicht weiterentwickeln, doch durch das Notch-Signal überleben. Wenn SLy1 also in den Notch-Signalweg involviert wäre, würde laut Hypothese das Überleben der Zelle in der Abwesenheit von SLy1 durch die Unterbrechung des Notch-Signalweges nicht länger garantiert werden können und es käme zu einer erhöhten Sterblichkeit. Diese Hypothese wurde jedoch nicht bestätigt, da die Apoptoserate in SLy1 KO x RAG1 KO Thymozyten nicht höher als in SLy1 WT x RAG1 KO Thymozyten war (Schäll, 2015). Da der Notch-Signalweg jedoch mit vielen weiteren Signalwegen verknüpft ist und das Überleben nicht ausschließlich vom Notch-Signal abhängt, könnte der SLy1-Defekt in diesem Modell eventuell durch andere Mechanismen kompensiert worden sein. Darüber hinaus ist möglich, dass SLy1 nicht direkt in den Signalweg einzubinden ist, jedoch durch dessen Fehlen gegenregulatorische Maßnahmen des Notch-Signalweges ergriffen werden. Damit wäre eine erhöhte Apoptose als Grundlage der reduzierten DP-Thymozytenanzahl zwar ausgeschlossen, aber die Ursache könnte eine Fehlregulation bei der weiteren Entwicklung sein. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Expressionsstatus von Notch1 und Notch3 gemessen, um herauszufinden, ob die Abwesenheit von SLy1 indirekte Auswirkungen auf

den Notch-Signalweg und nicht nur die Apoptoseinduktion der Zellen hat. Die erhöhte Notch1-Expression, die in Gesamthymozyten gemessen werden konnte, liefert erste Hinweise, dass das Fehlen von SLy1 sich tatsächlich auf die Aktivität des Notch-Signalweges auswirkt. Bemerkenswerterweise konnte jedoch nur im DP-Stadium der Entwicklung ein signifikanter Unterschied der Notch1-Expression gemessen werden. Bei der DN-Population hingegen liegt eine vermehrte Streuung der Ergebnisse vor, wobei trotzdem eine Tendenz zu einer Hochregulation von Notch1 in SLy1-defizienten Thymozyten zu beobachten ist. Da jedoch in SLy1 KO Mäusen im Verhältnis vermehrt DN-Thymozyten zu finden sind, könnte das Ergebnis der Gesamthymozyten auch eine erhöhte Notch1-Expression der DN-Thymozyten aufzeigen und es ist davon auszugehen, dass der relevante Unterschied in der Notch1-Expression vor allem im DN-Stadium stattfindet. Um diese Hypothese zu bestärken, wären allerdings weitere Proben notwendig um die Streuung der Ergebnisse zu minimieren.

Dass der Signalweg jedoch vermehrt aktiviert zu sein scheint, bestätigten die weiteren Ergebnisse bezüglich des Notch3-Expressionsstatus. Dieser wird wie bei Notch1 physiologischerweise im DN-Stadium hochreguliert, um eine Entwicklung zum DP-Stadium zu ermöglichen. In den vorliegenden Daten ist die Notch3 Expression der SLy1-defizienten DN-Thymozyten im Vergleich zum WT signifikant erhöht. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von SLy1 auch im Hinblick der Notch3-Signalkaskade zu einer vermehrten Aktivierung führt. Dies spiegelt sich auch im Ergebnis der Gesamthymozyten wider, in welchen Notch3 ebenfalls hochreguliert wird, wenn SLy1 fehlt. Im Vergleich zu Notch1 wird Notch3 im DP-Stadium jedoch nicht hochreguliert. Bei der beobachteten Hochregulation von Notch1 im DP Stadium würde man bei einem physiologisch ablaufenden Signalweg eine ebenfalls vermehrte Expression von Notch3 erwarten, da sich dieses downstream von Notch1 befindet. Da die vorliegenden Ergebnisse jedoch eine gleichbleibende Expression von Notch3 im DP Stadium aufzeigen, scheint die Signalkaskade in Zellen, die dieses Stadium erreicht haben, beeinträchtigt zu sein.

Interessanterweise wurde in Studien gezeigt, dass eine erzwungene Expression von Notch3-IC (der trunkierten Form von Notch, die nur die aktive intrazelluläre

Komponente enthält) auf T-Zell-Linien ein starker Induktor einer T-Zell-Leukämie in Mausmodellen ist (Bellavia D. et al., 2000). Außerdem kann eine Notch3-Überexpression rezidivierende akute lymphoblastische Leukämien in menschlichen T-Zellen hervorrufen (Bellavia et al., 2002). Diese Erkenntnis unterstützt die Hypothese, dass die Fehlregulation in SLy1-defizienten Thymozyten mit der Entwicklung einer T-ALL einhergehen könnte.

Bei den weiteren Notch-Array-Analysen ergaben sich weitere interessante Hinweise. Auffällig war unter anderem die Hochregulation des Notch3-Liganden Jag1 in den SLy1-defizienten DP-Thymozyten. Die intrazelluläre Domäne von Jag1 ist in der Lage, die Notch-Signalaktivität zu stärken und in einer positiven Rückkopplung gleichzeitig die Transkriptionsaktivierung von Jag1 selbst zu erhöhen (Pelullo et al., 2014). Neben diesem autokrinen Effekt wirkt sich die Freisetzung der löslichen extrazellulären Jag1-Domäne ebenfalls positiv auf die Aktivierung des Notch-Signals in benachbarten Zellen aus, was als parakriner Effekt bezeichnet wird (Pelullo et al., 2014). Damit scheint der Signalweg auf verschiedene Arten aktiviert zu werden, um der fehlenden Weiterentwicklung der SLy1-defizienten Thymozyten entgegenzuwirken. Zusammenfassend stehen die erhöhte Notch1-, Notch3- und Jag1- Expression im Einklang und bestätigen die Hypothese, dass die Deletion von SLy1 gegenregulatorische Maßnahmen des Signalweges zur Folge hat. Zudem ist beschrieben, dass eine erhöhte Jag1-Expression ebenfalls die nachgeschaltete Notch1-Signalübertragung in T-ALL-Zellen bewirkt (Bellon, Moles, Chaib-Mezrag, Pancewicz, & Nicot, 2018). Die Studie zeigt, dass bei einer Notch-induzierten T-ALL, bei dem der Retrovirus HTLV-1 für die maligne Erkrankung verantwortlich ist, eine Blockade von Jag1 zu einer verminderten Notch1-Signalübertragung führt und damit die Zellmigration transformierter ATL-Zellen vermindert (Bellon et al., 2018). Somit verstärkt sich auch hier die Vergleichbarkeit der Zustände zwischen der Fehlregulation in T-ALL-Zellen und in Thymozyten, welchen das SLy1-Protein fehlt.

Eine weitere Auffälligkeit bei den SLy1-defizienten DP-Thymozyten ist die verminderte Expression von Frzb. Dies ist ein Antagonist des G-Protein-Rezeptors Frizzled, welcher sich auf der Zelloberfläche befindet und einen Teil

des Wnt-Signalweges darstellt. Die verminderte Expression von Frzb resultiert somit in einer verstärkten Wnt-Signalkaskade, welche in Kombination mit dem Notch-Signal die Entwicklung der unreifen Vorläuferzellen begünstigt. (Weerkamp et al., 2006).

Somit stützt auch die verminderte Expression von Frzb die Hypothese, dass der Notch-Signalweg in SLy1-defizienten Thymozyten verändert zu sein scheint und die Zelle durch Dysregulation verschiedener Gene eine normale T-Zell-Entwicklung anzustreben versucht. Diese Tatsache wird weiterhin durch die signifikant erhöhte Expression des Ptcra Gens gestützt. Da dieses für das pTα Protein kodiert, welches in Kombination mit dem Notch-Signal die weitere T-Zell-Entwicklung vom DN- in das DP-Stadium ermöglicht, beweist auch dieses Ergebnis die verstärkte Notch-Signalgebung in SLy1 KO Thymozyten.

Zusätzlich konnte im Notch-Array der SLy1-defizienten DN-Thymozyten eine signifikant erhöhte Expression von Fabp7 festgestellt werden. Die Expression von Fabp7 wird dabei in neuronalen Vorläuferzellen über die Notch1-Aktivierung reguliert (Anthony et al., 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass die verstärkte Notch-Signalgebung in SLy1 KO Mäusen sich tatsächlich auch außerhalb der lymphatischen Zellen bemerkbar machen könnte, was anhand weiterer Studien in der Zukunft überprüft werden sollte.

Weiterhin ist in den Ergebnissen des Arrays auch Msc (Musculin) stark hochreguliert, welches als Mitglied der Helix-loop-helix (HLH) Familie von Transkriptionsfamilien gilt und erstmals in Vorläufern des Skelettmuskels der Maus und später auch in B-Zell-Lymphomen entdeckt wurde. Dabei wurde Msc als Transkriptioninhibitor beschrieben, während seine Rolle bei der T-Zell-Entwicklung weitestgehend unverstanden war. Neueste Studien zeigen jedoch, dass eine erhöhte Expression von Msc in humanen T-Helferzellen eine verringerte IL-2-Signalübertragung aufgrund einer verringerten Phosphorylierung von Stat5b bewirkt (Santarlaschi et al., 2017).

Wie bereits erwähnt, ist Stat5b auch in den IL-7/IL-7R-Signalweg involviert und eröffnet damit die Möglichkeit, dass der Notch- und der IL-7/IL-7R-Signalweg miteinander interagieren könnten. Hinzu kommt, dass Notch1 eine

Hochregulation des IL-7-Rezeptors bewirkt. Hierbei scheint IL-7 $\alpha$  auch bei der durch Notch vermittelten Leukämie-Entwicklung mitzuspielen (Gonzalez-Garcia et al., 2009). Um an weitere Hinweise über den Zusammenhang zwischen dem Notch- und dem IL-7-Signalweg in SLy1-defizienten Mäusen zu gelangen, wurde zunächst der IL-7-Signalweg genauer untersucht.

## **4.2 Die Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf den IL-7R-Signalweg**

Der IL-7/IL-7R-Signalweg ist wichtig für die Thymozytenentwicklung, da er für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung unreifer Vorläuferzellen sorgt. Er wird ab dem DN-Stadium für die Vorläuferzellen relevant, da er die Weiterentwicklung zum DP-Stadium garantiert. Dabei wird der IL-7R vor allem im DN3-Stadium exprimiert, um anschließend im DN4-Stadium wieder stark herunterreguliert zu werden. Ist dieser Mechanismus gestört und findet keine Herunterregulation statt, wird die Weiterentwicklung zum DP-Stadium unterbunden. Der bisherige Forschungsstand zeigt, dass eine erhöhte IL-7R $\alpha$ -Expression in Thymozyten und die daraus resultierende erhöhte Expression von Bcl-2 eine verstärkte IL-7/IL-7R-Signalkaskade in SLy1-defizienten Thymozyten bewirkt und die verringerte DP-Zellzahl in SLy1 KO Mäusen dadurch teilweise erklärt werden kann (Schäll, 2015). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die erhöhte Expression des IL-7R, welche vor allem im DN-Stadium zu beobachten ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Abwesenheit von SLy1 zu einer vermehrten Aktivierung des Signalweges führt und die physiologische Hochregulation des IL-7R im DN-Stadium weiter erhalten bleibt. Um zu überprüfen, ob der Signalweg auch downstream des IL-7R vermehrt aktiviert wird, wurden weitere Zielgene des Signalweges untersucht. Stat5b, eines dieser Zielgene, ist in den Gesamthymozyten signifikant erhöht, während weder im DN- noch im DP-Stadium ein Unterschied in dessen Expression festzustellen ist. Unter genauerer Betrachtung der Ergebnisse, lässt sich jedoch eine Tendenz der Hochregulation in SLy1-defizienten DN-Thymozyten erkennen, welche im

Einklang mit der leicht erhöhten Expression von Stat5b im Leukämie-Array im DN-Stadium steht. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, sollten zukünftig weitere Proben analysiert werden.

Die im vorherigen Kapitel beschriebene erhöhte Msc Expression verhält sich interessanterweise gegensätzlich zur veränderten Stat5b-Expression. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen dem dysregulierten Notch-Signalweg in SLy1-defizienten Thymozyten und den Veränderungen im IL-7/IL-7R-Signalweg hindeuten. Da die vorliegenden Ergebnisse allerdings nur Aussagen über die RNA-Expression zulassen und diese nicht unbedingt die tatsächliche Aktivität auf Proteinebene widerspiegelt, sollte der Aktivitätsgrad der Msc-Signalkaskade zukünftig auch auf Proteinebene näher untersucht werden.

Die Expression von Stat5a in den qPCRs hingegen zeigt keinen Unterschied zwischen SLy1 WT und KO Thymozyten. Um genauere Erkenntnisse über den Aktivitätsgrad des IL-7/IL-7R-Signalweges zu erlangen, wurde anschließend der Phosphorylierungsstatus von Stat5 in SLy1 KO Thymozyten im Vergleich zum Wildtyp gemessen.

Stat5 wird normalerweise downstream des IL-7-Rezeptors nach Bindung des Zytokins IL-7 stimuliert und anschließend phosphoryliert, während bei den unstimulierten Proben und bei der Stimulation mit PMA/Ionomycin keine vermehrte Phosphorylierung zu erwarten ist. Interessanterweise scheint die Stimulation mit PMA und Ionomycin die Phosphorylierung von Stat5 sogar zu inhibieren. Dasselbe Ergebnis beobachtete 1999 Lee in seiner Studie über die Inhibierung des IL-2-Signalweges, wobei die Stimulation mit PMA und Ionomycin ebenfalls die Phosphorylierung von Stat5 unterbinden konnte (Lee I., Li W.P., Hisert K.B., & L.B., 1999). Weiterhin zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass bei der Stimulation mit IL-7 keine signifikant stärkere Phosphorylierung von Stat5 im Vergleich zu den unstimulierten Proben vorliegt. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Notwendigkeit der richtigen Konzentration des Zytokins. Da die Konzentration von IL-7 einen Einfluss auf die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche und damit die nachfolgende Signalgebung hat, ist es von großer



Bedeutung die richtige Menge an Zytokin für die Stimulation zu verwenden. Darüber hinaus demonstrieren auch andere Studien, dass die eingesetzte IL-7-Konzentration entscheidend für die Phosphorylierung von Stat5 ist (Drake et al., 2016). Da das in dieser Arbeit vorliegende Ergebnis jedoch vermuten lässt, dass in SLy1 KO Thymozyten bei IL-7-Zugabe Stat5 verhältnismäßig stärker phosphoryliert wird als in WT Thymozyten, wurden die jeweiligen Differenzen direkt untereinander verglichen und die IL-7-spezifische Stimulation der Stat5-Phosphorylierung berechnet. Tatsächlich zeigt dieser Vergleich, wie in Abbildung 13 zu sehen ist, einen signifikanten Unterschied, wobei Stat5 in SLy1-defizienten Thymozyten vermehrt phosphoryliert wird. Um die Störung etwaiger Einflussfaktoren, wie zum Beispiel die Stimulationszeit oder die Zytokinmenge, so gering wie möglich zu halten, ist eine Wiederholung der Experimente mit Titration der IL-7 Konzentration und weiteren Stimulationszeiten notwendig. Außerdem sollte zukünftig der Phosphorylierungsstatus von Stat5 zusätzlich mithilfe eines Western Blots untersucht werden.

### **4.3 Der Zusammenhang zwischen dem IL-7R-Signalweg und der p53-Signalgebung**

Der Tumorsuppressor p53 schützt Zellen unter homöostatischen Bedingungen vor einer malignen Transformation und spielt bei der Entstehung vieler Krebsarten eine entscheidende Rolle. In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe des Leukämie-Arrays gezeigt werden, dass das Trp53-Gen, welches für das Protein p53 kodiert, in der Abwesenheit von SLy1 in DN-Thymozyten vermehrt exprimiert wird.

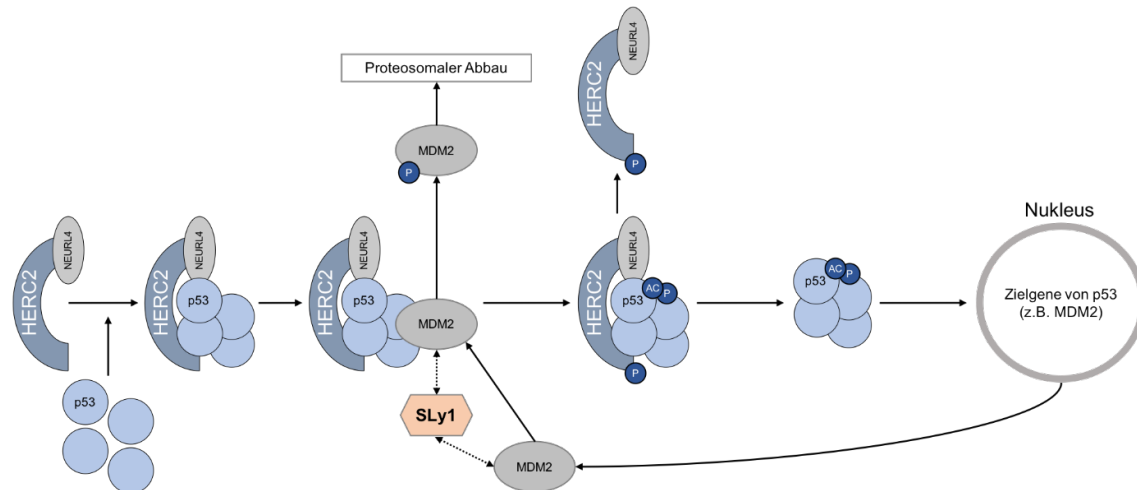
Ergänzende Expressionsanalysen ergaben eine signifikant erhöhte Expression von p53 in der Population der Gesamthymozyten, während in DN- und DP-Thymozyten kein Unterschied zwischen SLy1-defizienten und WT Thymozyten erkennbar ist. Zieht man allerdings die starke Streuung der WT Proben in Betracht, so lässt sich in DN-Thymozyten durchaus eine Tendenz zu einer erhöhten p53-Expression erkennen. Diese sollte zukünftig anhand weiterer

Proben genauer analysiert werden, um die vorliegenden Ergebnisse ergänzen und vervollständigen zu können. Zusätzlich liefern die Ergebnisse nur Aussagen auf RNA-Ebene, interessant wäre aber zu überprüfen, ob sich der Aktivitätszustand von p53 auch auf Proteinebene verändert, wenn SLy1 fehlt. Dafür sollten zukünftig weitere Experimente mittels Western Blot und FACS-Analysen erfolgen, in denen der Zustand von p53 auf Proteinebene zwischen WT und SLy1-defizienten Thymozyten verglichen werden kann.

Es ist hervorzuheben, dass die p53-Signalgebung und der IL-7/IL-7R-Signalweg im Zusammenhang stehen. Bei der Untersuchung von IL-7R<sup>-/-</sup> p53<sup>-/-</sup> Mäusen konnte festgestellt werden, dass der p53-Signalweg in Abwesenheit des IL-7/IL-7R-Signalweges aktiviert wird (Kibe et al., 2012). In Studien mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen konnte bei der Aktivierung von IL-7/IL-7R-Signalen eine Erhöhung von Bcl-2 in Kombination mit einer Verringerung von p53 und dem Bcl-2 assoziierten X Protein festgestellt werden (Liu Z. et al., 2014).

Nachfolgend konnten Ren et al. den Zusammenhang genauer entschlüsseln, indem sie zeigten, dass pStat5 über NPM1 und MDM2 die Expression von p53 reguliert (Ren et al., 2016). Dabei hat pStat5 eine inhibierende Wirkung auf BRCA1 und BARD1, welche wiederum NPM1 aktivieren. NPM1 hat ebenfalls eine aktivierende Funktion auf p53, während die Aktivierung von MDM2 über pStat5 die Aktivität von p53 inhibiert (Ren et al., 2016). Dieser Mechanismus wurde 2019 durch García-Cano und seine Forschungsgruppe genauer geklärt. Sie stellten fest, dass p53 durch die Ubiquitin E3 Ligase MDM2 reguliert wird, welches über einen negativen Feedbackmechanismus wiederum die Expression von p53 regulieren kann. In Abbildung 17 wird der Zustand in gesunden Zellen, die beispielsweise oxidativen Stress erfahren, abgebildet. MDM2 bindet dabei an den Komplex bestehend aus p53, HERC2 und NEURL4, welcher dadurch stabilisiert wird. Erfährt die Zelle Stress, findet ein proteosomaler Abbau von MDM2 statt und p53 kann phosphoryliert und acetyliert werden (Garcia-Cano et al., 2020). Während MDM2 dissoziiert, bindet das dadurch aktivierte p53 im Zellkern an Bindungsstellen seiner Zielgene um deren Transkription zu aktivieren oder zu unterdrücken (Garcia-Cano et al., 2020). MDM2 ist ebenso eines dieser Zielgene und wird über ein negativen Rückkopplungsmechanismus von p53

reguliert, wobei Kinasen die Fähigkeit von MDM2 zur Polyubiquitylierung von p53 hemmen und einen MDM2-Selbstabbau induzieren (Garcia-Cano et al., 2020).



**Abbildung 17: Der HERC2/NEURL4/MDM2 Komplex im p53 Signalweg.**

Es ist die Interaktion von p53 mit dem HERC2/NEURL4/MDM2-Komplex dargestellt, wobei DNA-Schäden und Stress das Ablösen von MDM2 vom Komplex bewirken, wodurch wiederum p53 frei wird und im Nukleus die Transkription verschiedener Gene bewirken kann. SLy1 könnte hierbei ebenfalls einen Interaktionspartner des Komplexes oder einer anderen Komponente darstellen. Modifizierte Abbildung (Garcia-Cano et al., 2020).

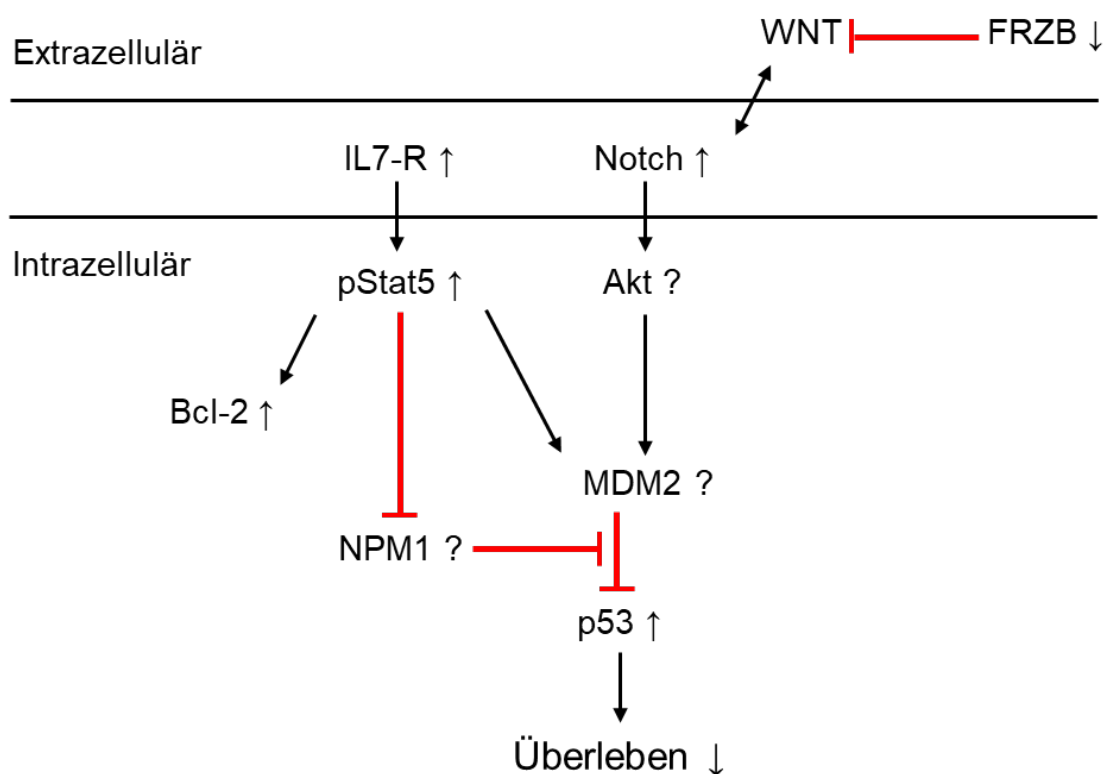
Interessant wäre es in zukünftigen Experimenten den Expressionsstatus und das Verhalten von MDM2 als auch NPM1 in SLy1-defizienten Mäusen genauer zu untersuchen, um damit eine bessere Einordnung von SLy1 in den Signalweg zu ermöglichen.

#### **4.4 SLy1 und seine Einordnung in die für eine T-ALL relevanten Signalwege**

Insgesamt zeigen die untersuchten Signalwege der vorliegenden Arbeit einen entscheidenden Zusammenhang.

Zum einen wirkt sich das Fehlen von SLy1 auf den IL-7/IL-7R-Signalweg aus und resultiert in einer vermehrten Aktivierung. Sowohl anhand der qPCR-Analysen, der Leukämie-Arrays als auch der FACS-Analysen konnte eine vermehrte Stat5-Signalgebung beobachtet werden, was physiologischerweise zu einer Inhibierung von p53 und damit zu einem erhöhten Überleben der Thymozyten führen sollte. Der IL-7/IL-7R-Signalweg ist dabei ebenfalls in über 10% der T-ALL Fälle mit verantwortlich für die Pathogenese (Zenatti et al., 2011) und liefert damit die ersten Vermutungen, dass das Fehlen von SLy1 ebenfalls in einer T-ALL resultieren könnte.

Außerdem hat eine Defizienz des SLy1-Proteins Auswirkungen auf den Notch-Signalweg, da die Expression von Notch1 und Notch3 erhöht wird und auch weitere Zielgene des Signalweges dysreguliert sind. Unter anderem auch Jag1, dessen Interaktion mit Notch3 das Überleben, die Proliferation und Invasion von Lymphomzellen unterstützt und damit zur Entwicklung einer Notch-abhängigen T-ALL beitragen kann (Pelullo et al., 2014). Weitere Studien ergaben, dass auch Notch über Akt das Protein MDM2 regulieren kann, wodurch der IL-7/IL-7R- und der Notch-Signalweg miteinander verknüpft zu sein scheinen und beide über p53 das Überleben der Zellen steuern (Demarest, Ratti, & Capobianco, 2008). In Abbildung 18 wird der zuvor beschriebene Zusammenhang veranschaulicht und der Expressionsstatus der beteiligten Gene in SLy1-defizienten Thymozyten demonstriert.



**Abbildung 18: Modell der T-ALL-relevanten Signalwege in SLy1 KO Thymozyten.**

In der Abbildung wird der Zusammenhang des Notch- und des IL-7/IL-7R-Signalweges in SLy1 KO Thymozyten vereinfacht dargestellt. Dabei sind die untersuchten Gene aufgelistet und mittels Pfeilen wird signalisiert, ob eine Hoch- oder Herunterregulation in SLy1 KO Thymozyten beobachtet wurde. Die Gene, die mit Fragezeichen gekennzeichnet sind, sollen zukünftig untersucht werden, um den Signalweg und die Einordnung von SLy1 in diesen weiter aufklären zu können.

In normalen Zellen ist die Entwicklung sowohl vom IL-7-Signalweg, als auch vom Notch-Signalweg abhängig. Beide haben Einfluss auf das pro-apoptische p53 und sorgen in gesunden Zellen über MDM2 dafür, dass p53 gehemmt wird und die Zellen nicht in Apoptose übergehen. In SLy1-defizienten Thymozyten konnte jedoch trotz vermehrter Aktivierung des IL-7/IL-7R- und Notch-Signalweges eine erhöhte Expression von p53 festgestellt werden. Weiterhin zeigen vorherige Studien eine verringerte Thymozytenanzahl der SLy1 KO Mäuse in Kombination eines Entwicklungsstopps im DN-Stadium der Thymozyten. Daher galt zunächst die Hypothese, dass eventuell einer der Signalwege, die für die Entwicklung notwendig sind, nicht funktionieren. Überraschenderweise zeigen die Ergebnisse

der vorliegenden Arbeit genau das Gegenteil, da sowohl der IL-7/IL-7R-Signalweg, als auch der Notch-Signalweg in SLy1-defizienten Thymozyten vermehrt aktiviert sind. Dies führt zur Überlegung, ob das Fehlen von SLy1 die Kette des Signalweges unterbricht, wodurch es nicht zur gewünschten Hemmung von p53 kommt und die Zellen gegenregulatorisch versuchen die Signalwege weiter zu verstärken, um eine normale Thymozyten-Entwicklung und das Überleben zu garantieren.

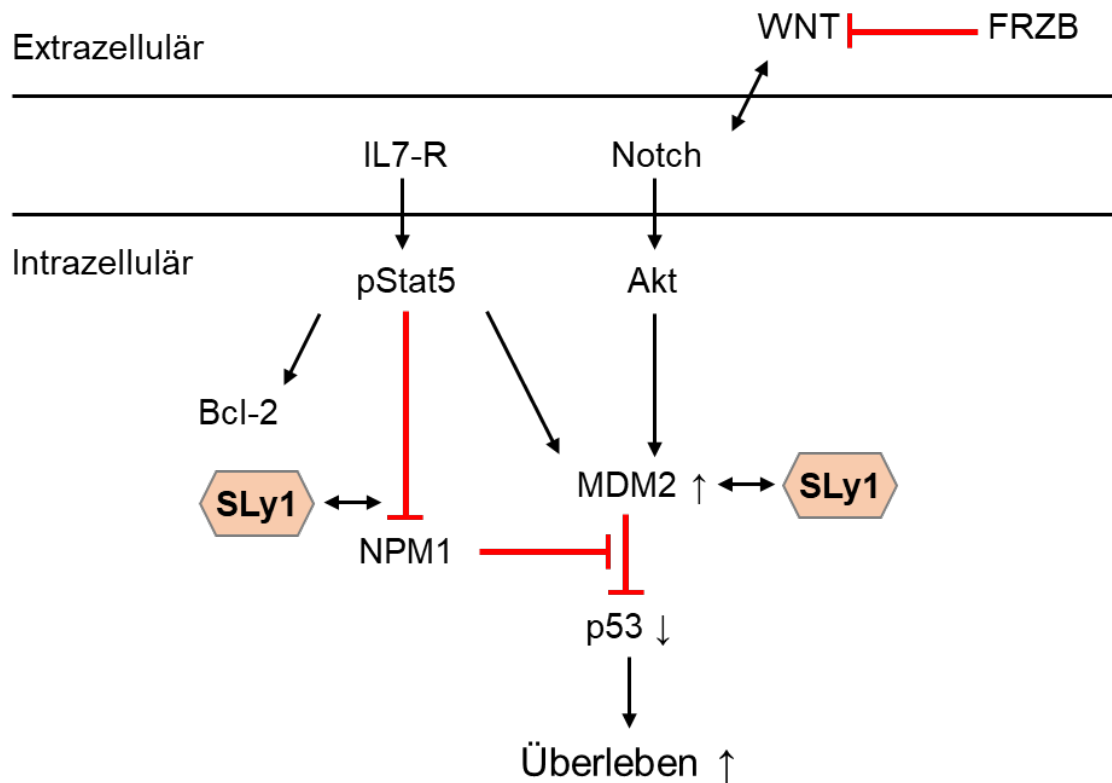
Eine weitere wichtige Erkenntnis aus dieser Arbeit ist, dass auch die Expression von Lmo2 eine Veränderung in SLy1-defizienten Thymozyten erfährt, da es in DP-Thymozyten herunter- und in DN-Thymozyten stark hochreguliert wird. Derzeitige Studien beschreiben Lmo2 als einen Marker für thymische Neoplasien, da es ausschließlich in neoplastischen Vorläuferzellen der T-ALL detektiert werden konnte, während es in normalen gesunden Thymozyten oder Thymomen nicht vorhanden war (Jevremovic et al., 2016). Frühere Studien zeigen außerdem, dass LMO2-transgene Mäuse eine erhöhte Selbsterneuerung in frühen T-Zell-Vorläufern im Thymus zeigen und anfällig für die Entwicklung von T-ALL bei Anhäufung zusätzlicher Mutationen sind. Es scheint, dass der Transkriptionskomplex, der Lmo2 enthält, direkt auf das Hhex-Gen abzielt oder zu einer Notch1-Hochregulierung in diesen Zellen führt (Jevremovic et al., 2016). Damit wäre nicht nur eine weitere Ursache für die vorliegende Notch-Hochregulation in SLy1-defizienten Thymozyten geklärt, sondern weiterhin ein Hinweis auf eine maligne Entartung der DN-Zellen aufgrund der Hochregulation von Lmo2 gegeben. Interessanterweise zeigt eine durch Lmo2 verursachte T-ALL einen Entwicklungsstopp der Thymozyten ebenfalls im DN-Stadium, wobei die erhöhte Selbsterneuerung dieser Zellen mit vermehrten Mutationen einhergeht, die ebenfalls zu einer Leukämie führen (Smith et al., 2014).

Zusammengefasst stehen die Hochregulation von Lmo2, die vermehrte Aktivierung des Notch- und des IL-7/IL7R-Signalweges im Einklang und können jeweils einzeln, oder auch in Kombination zu der Entwicklung einer T-ALL führen. Zunächst vermitteln die vorliegenden Ergebnisse also den Eindruck, dass zwischen den Vorläuferzellen der T-ALL und den SLy1-defizienten Thymozyten viele Parallelen bestehen, die die Vermutung nahe legen, dass die Thymozyten

sobald SLy1 fehlt, eine maligne Entartung in Richtung einer T-ALL erfahren und SLy1 ein vermeintlicher Tumordinhibitor sein könnte. Allerdings kam es trotz der Aktivierung der Signalwege nicht zu dem eigentlichen Resultat, nämlich der erhöhten Überlebensrate durch die Hemmung von p53. Gegenteilig kann eine verringerte Entwicklung vom DN- zum DP-Stadium einhergehend mit einer verminderten Thymozytenanzahl beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass SLy1 im späteren Teil der Signalkaskaden notwendig ist. Fehlt dieses, werden die Signalwege kompensatorisch hochreguliert, was jedoch nur bis zu einem gewissen Teil der Kaskade erfolgreich ablaufen kann. SLy1 ist damit ein essentieller Teil in der p53-Signalübertragung und damit ein wichtiger Faktor für das Überleben und die Differenzierung früher Vorläuferzellen. Notwendig wäre nun die durchgeführten Experimente auch in SLy1 transgenen Mäusen durchzuführen um überprüfen zu können, ob eine erhöhte SLy1-mRNA-Expression dieselben Effekte wie eine verstärkte Notch- oder IL-7/IL-7R-Signalkaskade bewirken kann. Wäre dies der Fall, könnte SLy1 ebenfalls als Onkogen klassifiziert werden und zukünftig als Biomarker einer T-ALL dienen. Auch sollte der p53-Signalweg sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene genauer untersucht werden, um die Zusammenhänge zwischen der Fehlregulation des Signalweges und dem Fehlen von SLy1 besser aufklären zu können.

Das Modell in Abbildung 19 stellt dar, wie eine Thymozyten-spezifische SLy1-Überexpression in die untersuchten Signalwege eingreifen könnte. SLy1 könnte hierbei zum Beispiel mit MDM2 interagieren oder als nachgeschaltetes Protein fungieren. Eine Überlegung wäre, dass vermehrt exprimiertes SLy1-Protein trotz intakter Expression des IL-7- und des Notch-Rezeptors durch Aktivierung von MDM2 eine Leukämie begünstigen könnte und damit ein bisher nicht identifiziertes Onkogen darstellt. Hierbei wäre zu klären, ob SLy1 die Expression oder den Zustand von MDM2 verändern kann, was in weiteren Experimenten geklärt werden sollte. Doch nicht nur MDM2 könnte mit SLy1 interagieren, sondern auch NPM1. Hierbei könnte SLy1 beispielsweise die Hemmung von Stat5 auf NPM1 regulieren oder auch direkt mit NPM1 kooperieren. Außerdem könnte SLy1 bei der Bildung des HERC2/NEURL4/p53-Komplexes mitwirken,

wobei eine Stabilisierung des Komplexes die Funktion von p53 indirekt unterdrücken kann. Der nächste wichtige Schritt zur Klärung der Forschungsfrage wäre somit einen potentiellen Bindungspartner von SLy1 zu detektieren.



**Abbildung 19: Modell der zusammenhängenden Signalwege bei SLy1-Überexpression.**

In der Abbildung wird exemplarisch der Zusammenhang des Notch- und des IL-7/IL-7R-Signalweges in SLy1 transgenen Thymozyten vereinfacht dargestellt. Während man bei SLy1 KO Thymozyten davon ausgeht, dass sowohl der Notch- als auch der IL7-/IL-7R-Signalweg kompensatorisch hochreguliert werden, um das Überleben, die Differenzierung und Proliferation der Thymozyten zu sichern, das Fehlen von SLy1 aber die Signalkaskade unterbricht, vermutet man das hier dargestellte Modell in SLy1 transgenen Thymozyten. Hierbei sind mögliche Interaktionsstellen von SLy1 gekennzeichnet und die Vermutung, wie sich die Aktivität der Gene als auch das Überleben downstream von SLy1 verändert.



## 4.5 SLy1 - Klinische Relevanz und Ausblick

Resümierend wirkt sich die Abwesenheit von SLy1 in Thymozyten vor allem im DN-Stadium der Thymozytenentwicklung aus, womit sich die Funktion von SLy1 in die frühe Differenzierung der T-Zell-Vorläufer einordnen lässt. In den verschiedenen Signalwegen, welche für die Weiterentwicklung der Vorläuferzellen essentiell sind, konnten Veränderungen beobachtet werden, die vor allem in einer Aktivierung den jeweiligen Signalkaskaden resultieren, was dem Zustand der Vorläuferzellen einer T-ALL entspricht.

Weder beim Notch-Signalweg, noch beim IL-7/IL-7R-Signalweg konnten bisher direkte Interaktionspartner von SLy1 detektiert werden. Zusätzlich resultiert die vermehrte Aktivierung der Signalwege nicht in einem erhöhten Überleben der Thymozyten, wie es bei der T-ALL der Fall ist, sondern p53 wird sogar stärker hochreguliert, was eine verringerte Thymozytenanzahl und Differenzierung der SLy1-defizienten Thymozyten zur Folge hat. Damit lässt sich SLy1 als essentieller Faktor in den Signalweg einordnen, der die Signalübertragung von p53 garantiert.

Durch die vorliegende Arbeit entsteht die Theorie, dass vermehrte SLy1 mRNA zu denselben Effekten wie eine vermehrte Notch- oder IL-7-Signalkaskade führen kann und damit ebenfalls als Onkogen fungieren könnte. Tatsächlich wurde bereits in Daniel Schäll's Arbeit in mehreren T-ALL Fällen eine erhöhte SLy1 mRNA gemessen, die diese Hypothese unterstützt (Schäll, 2015).

In weiteren Experimenten soll SLy1 genauer in den p53 Signalweg eingeordnet werden und gegebenenfalls Interaktionspartner detektiert werden. Kann diese Hypothese bestätigt werden, wäre eine gezielte Hemmung des Adapterproteins ein denkbarer klinisch therapeutischer Ansatz, um der Entartung der Zellen entgegenzuwirken.

Derzeit finden bereits eine Reihe von Inhibitoren therapeutische Anwendung, unter anderem des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, des Bcl-2 Proteins und der JAK-STAT-Faktoren, wobei sich einige noch in der Testphase befinden (Man, 2017). Noch kann man nicht beurteilen, ob die Inhibitoren bei der T-ALL zu einer besseren Prognose führen, da sie dennoch bei anderen hämatologischen malignen Erkrankungen schon einen wichtigen Stellenwert einnehmen,

gewinnen sie zunehmend auch bei der T-ALL an Bedeutung (Man, Morris, & Keng, 2017).


Daher wäre es durchaus vorstellbar, für SLy1 ebenfalls einen solchen Inhibitor zu entwickeln, um die Progression entarteter Zellen zu unterbinden. Dafür sollten zukünftig weitere Experimente an Tumor-Mausmodellen erfolgen und die Einbindung von SLy1 in den p53-Signalweg, vor allem auf Proteinebene, genauer geklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die T-Zell-Entwicklung im Thymus wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signalkaskaden gesteuert. Bereits geringe Fehlregulationen diverser Signale können dabei zu einer Entartung der Vorläuferzellen führen. Die T-Zell-akute lymphatische Leukämie (T-ALL) ist eine der häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen im Kindesalter, die aus malignen Thymozyten hervorgeht. Um gezieltere Therapien mit weniger Nebenwirkungen und einem besseren Outcome zu ermöglichen, versucht man die Pathogenese hinter der T-ALL besser zu verstehen. Bisher bekannte Mechanismen der T-ALL umfassen die Fehlregulation im IL-7/IL-7R- und dem Notch-Signalweg. Durch Fehlregulationen vermehren sich unreife Vorläuferzellen ungebremst, wodurch die Hochregulation der entsprechenden Signalkaskaden das Überleben der entarteten Zellen garantiert (Oliveira et al., 2017). SLy1 ist ein Adapterprotein und spielt eine wichtige Rolle bei der Thymozytenentwicklung. So ist in dessen Abwesenheit die Thymozytenanzahl aufgrund einer fehlenden Weiterentwicklung der Zellen signifikant reduziert. In der vorliegenden Arbeit konnten erste Hinweise gefunden werden, dass die verminderte Thymozytenanzahl in SLy1-knockout (KO) Mäusen auf Fehlregulationen des Notch- und IL-7/IL-7R-Signalweges zurückzuführen ist. Hierbei konnte als Ursache eine Hochregulation verschiedener Komponenten der Signalwege, als auch eine verstärkte Signalgebung auf Proteinebene beobachtet werden. Es konnten erste Zusammenhänge zwischen dem Notch- und dem IL-7/IL-7R-Signalweg, welche unter anderem über die p53-Regulation das Überleben der Zelle steuern, gefunden werden. Die Resultate dieser Arbeit demonstrieren, dass bei SLy1-Defizienz die Signalübertragung des Notch- und des IL-7/IL-7R-Signalweges auf die p53-Signalkaskade nicht mehr intakt ablaufen kann und zeigen somit, dass SLy1 ein fundamentaler Bestandteil der p53-Signalgebung ist. Gleichzeitig unterstützen die erhöhte p53-Expression und das verminderte Überleben der Thymozyten in SLy1 KO Mäusen die Annahme, dass SLy1 ein anti-apoptotisches Protein ist. Im Gegensatz dazu vermuten wir, dass bei einer vermehrten SLy1-Expression die p53-Expression sinkt und das Überleben der Thymozyten steigt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Amsen, D., Helbig, C., & Backer, R. A. (2015). Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered. *Trends Immunol*, 36(12), 802-814. doi:10.1016/j.it.2015.10.007
- Anthony, T. E., Mason, H. A., Gridley, T., Fishell, G., & Heintz, N. (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev*, 19(9), 1028-1033. doi:10.1101/gad.1302105
- Arefanian, S., Schall, D., Chang, S., Ghasemi, R., Higashikubo, R., Zheleznyak, A., . . . Krupnick, A. S. (2016). Deficiency of the adaptor protein SLY1 results in a natural killer cell ribosomopathy affecting tumor clearance. *Oncoimmunology*, 5(12), e1238543. doi:10.1080/2162402X.2016.1238543
- Aster, J. C., Blacklow, S. C., & Pear, W. S. (2011). Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *J Pathol*, 223(2), 262-273. doi:10.1002/path.2789
- Astoul, E., Laurence, A. D., Totty, N., Beer, S., Alexander, D. R., & Cantrell, D. A. (2003). Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 278(11), 9267-9275. doi:10.1074/jbc.M211252200
- Beer, S., Scheikl, T., Reis, B., Huser, N., Pfeffer, K., & Holzmann, B. (2005). Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice. *Mol Cell Biol*, 25(21), 9646-9660. doi:10.1128/MCB.25.21.9646-9660.2005
- Beer S., Simins A.B., Schuster A., & B., H. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1520, 89-93.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Checquolo, S., Balestri, A., Biondi, A., Cazzaniga, G., . . . Screpanti, I. (2002). Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6), 3788-3793. doi:10.1073/pnas.062050599
- Bellavia D., Campese A.F., Alesse E., Vacca A., Felli M.P., Balestri A., . . . I., S. (2000). Constitutive activation of NF-kB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *The EMBO Journal*, 19, 3337-3348.
- Bellon, M., Moles, R., Chaib-Mezrag, H., Pancewicz, J., & Nicot, C. (2018). JAG1 overexpression contributes to Notch1 signaling and the migration of HTLV-1-transformed ATL cells. *J Hematol Oncol*, 11(1), 119. doi:10.1186/s13045-018-0665-6
- Beverly, L. J., Felsher, D. W., & Capobianco, A. J. (2005). Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res*, 65(16), 7159-7168. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1664

- Bosselut, R. (2004). CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals. *Nat Rev Immunol*, 4(7), 529-540. doi:10.1038/nri1392
- Brandt, S. (2010). Interaktionsanalyse der Adapterproteine SLy1 und SLy2.
- Brandt, S., Ellwanger, K., Beuter-Gunia, C., Schuster, M., Hausser, A., Schmitz, I., & Beer-Hammer, S. (2010). SLy2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(9), 1472-1481. doi:10.1016/j.biocel.2010.05.004
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S3-23. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980
- Chen, L., Foreman, D. P., Sant'Angelo, D. B., & Krangel, M. S. (2016). Yin Yang 1 Promotes Thymocyte Survival by Downregulating p53. *J Immunol*, 196(6), 2572-2582. doi:10.4049/jimmunol.1501916
- Claudio J., Zhu Y.X., Benn S., Shukla A.H., McGlade J., Falcioni N., & K., S. (2001). HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. *Oncogene*, 20, 5373-5377.
- D., G., J., K., T., S., & A., Z. (1993). A Developmental Pathway Involving Four Phenotypically and Functionally Distinct Subsets of CD3-CD4-CD8- Triple-Negative Adult Mouse Thymocytes Defined by CD44 and CD25 Expression. *The Journal of Immunology*, 150, 4244-4252.
- Dalla-Favera, R. (2012). Lymphoid malignancies: many tumor types, many altered genes, many therapeutic challenges. *J Clin Invest*, 122(10), 3396-3397. doi:10.1172/JCI66307
- Davies, O. R., Lin, C. Y., Radziszewska, A., Zhou, X., Taube, J., Blin, G., . . . Lowell, S. (2013). Tcf15 primes pluripotent cells for differentiation. *Cell Rep*, 3(2), 472-484. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.017
- Demarest, R. M., Ratti, F., & Capobianco, A. J. (2008). It's T-ALL about Notch. *Oncogene*, 27(38), 5082-5091. doi:10.1038/onc.2008.222
- Demir, S., Boldrin, E., Sun, Q., Hampp, S., Tausch, E., Eckert, C., . . . Meyer, L. H. (2020). Therapeutic targeting of mutant p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 105(1), 170-181. doi:10.3324/haematol.2018.199364
- Drake, A., Kaur, M., Iliopoulou, B. P., Phennicie, R., Hanson, A., & Chen, J. (2016). Interleukins 7 and 15 Maintain Human T Cell Proliferative Capacity through STAT5 Signaling. *PLoS One*, 11(11), e0166280. doi:10.1371/journal.pone.0166280
- Ellisen L.W., Bird J., West D.C., Soreng A.L., Reynolds T.C., Smith S.D., & J., S. (1991). TAN-I, the Human Homolog of the Drosophila Notch Gene, Is Broken by Chromosomal Translocations in T Lymphoblastic Neoplasms. *Cell*, 66, 649-661.
- Ellmeier, W., Sawada, S., & Littman, D. R. (1999). The Regulation of CD4 and CD8 Coreceptor gene expression during T cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 1999, 17, 523-554.
- Farber, D. L., Netea, M. G., Radbruch, A., Rajewsky, K., & Zinkernagel, R. M. (2016). Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nat Rev Immunol*, 16(2), 124-128. doi:10.1038/nri.2016.13

- Felli M.P., Maroder M., Mitsiadis T.A., Campese A.F., Bellavia D., acca A., . . . I., I. S. (1999). Expression pattern of Notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand–receptor interactions in intrathymic T cell development. *International Immunology*, *11*, 1017-1025.
- Franke, F. C., Muller, J., Abal, M., Medina, E. D., Nitsche, U., Weidmann, H., . . . Janssen, K. P. (2019). The Tumor Suppressor SASH1 Interacts With the Signal Adaptor CRKL to Inhibit Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, *7*(1), 33-53. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.08.007
- Garcia-Cano, J., Sanchez-Tena, S., Sala-Gaston, J., Figueras, A., Vinals, F., Bartrons, R., . . . Rosa, J. L. (2020). Regulation of the MDM2-p53 pathway by the ubiquitin ligase HERC2. *Mol Oncol*, *14*(1), 69-86. doi:10.1002/1878-0261.12592
- Gonzalez-Garcia, S., Garcia-Peydro, M., Martin-Gayo, E., Ballestar, E., Esteller, M., Bornstein, R., . . . Toribio, M. L. (2009). CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R $\alpha$  gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med*, *206*(4), 779-791. doi:10.1084/jem.20081922
- Han, Z., Liang, J., Li, Y., & He, J. (2019). Drugs and Clinical Approaches Targeting the Antiapoptotic Protein: A Review. *Biomed Res Int*, *2019*, 1212369. doi:10.1155/2019/1212369
- Hong, C., Luckey, M. A., & Park, J. H. (2012). Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development. *Semin Immunol*, *24*(3), 151-158. doi:10.1016/j.smim.2012.02.002
- Hosokawa, H., & Rothenberg, E. V. (2017). Cytokines, Transcription Factors, and the Initiation of T-Cell Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi:10.1101/cshperspect.a028621
- Husby S., & K., G. (2017). Mature lymphoid malignancies: origin, stem cells, and chronicity. *blood advances*, *1*, 2444-2455. doi:10.1182/©
- Jaufmann, J., Franke, F. C., Sperlich, A., Blumendeller, C., Kloos, I., Schneider, B., . . . Beer-Hammer, S. (2021). The emerging and diverse roles of the SLy/SASH1-protein family in health and disease-Overview of three multifunctional proteins. *FASEB J*, *35*(4), e21470. doi:10.1096/fj.202002495R
- Jevremovic, D., Roden, A. C., Ketterling, R. P., Kurtin, P. J., & McPhail, E. D. (2016). LMO2 Is a Specific Marker of T-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Am J Clin Pathol*, *145*(2), 180-190. doi:10.1093/ajcp/aqv024
- Kanai, T., Jenks, J., & Nadeau, K. C. (2012). The STAT5b Pathway Defect and Autoimmunity. *Front Immunol*, *3*, 234. doi:10.3389/fimmu.2012.00234
- Kibe, R., Zhang, S., Guo, D., Marrero, L., Tsien, F., Rodriguez, P., . . . Cui, Y. (2012). IL-7R $\alpha$  deficiency in p53null mice exacerbates thymocyte telomere erosion and lymphomagenesis. *Cell Death Differ*, *19*(7), 1139-1151. doi:10.1038/cdd.2011.203
- Kim, H. O., & Cho, J. H. (2017). T Cell's Sense of Self: a Role of Self-Recognition in Shaping Functional Competence of Naive T Cells. *Immune Netw*, *17*(4), 201-213. doi:10.4110/in.2017.17.4.201

- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*, 14(6), 377-391. doi:10.1038/nri3667
- Koichi Akashi K., Kondo M., von Freeden-Jeffry, U., Murray R., & I.L., W. (1997). Bcl-2 Rescues T Lymphopoiesis in Interleukin-7 Receptor–Deficient Mice. *Cell*, 89, 1033-1041.
- Kukuk, L., Dingley, A. J., Granzin, J., Nagel-Steger, L., Thiagarajan-Rosenkranz, P., Ciupka, D., . . . Koenig, B. W. (2019). Structure of the SLy1 SAM homodimer reveals a new interface for SAM domain self-association. *Sci Rep*, 9(1), 54. doi:10.1038/s41598-018-37185-3
- Kurochkina, N., & Guha, U. (2013). SH3 domains: modules of protein-protein interactions. *Biophys Rev*, 5(1), 29-39. doi:10.1007/s12551-012-0081-z
- Lee I., Li W.P., Hisert K.B., & L.B., I. (1999). Inhibition of Interleukin 2 Signaling and Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)5 Activation during T Cell Receptor–mediated Feedback Inhibition of T Cell Expansion. *J. Exp. Med.*, 190, 1263-1274.
- Leyns L., Bouwmeester T., Kim S., Piccolo S., & E., D. R. (1997). Frzb-1 Is a Secreted Antagonist of Wnt Signaling Expressed in the Spemann Organizer. *Cell*, 88, 747-756.
- Liu Z., Wang M., Ren H., Qu W., Sun L., Zhang Q., . . . E., W. (2014). Interleukin 7 signaling prevents apoptosis by regulating bcl-2 and bax via the p53 pathway in humannon-small cell lung cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 870-881.
- Man, L. M., Morris, A. L., & Keng, M. (2017). New Therapeutic Strategies in Acute Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*, 12(3), 197-206. doi:10.1007/s11899-017-0380-3
- Marrack, P., & Kappler, J. (1997). Positive selection of thymocytes bearing  $\alpha\beta$  T cell receptors. *Current Opinion in Immunology* 1997, 9, 250-255.
- Miyamoto, S., Kimball, S.R., Safer, B. (2000). Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494, 28-42.
- Niu, N., & Qin, X. (2013). New insights into IL-7 signaling pathways during early and late T cell development. *Cell Mol Immunol*, 10(3), 187-189. doi:10.1038/cmi.2013.11
- Oliveira, M. L., Akkapeddi, P., Alcobia, I., Almeida, A. R., Cardoso, B. A., Fragoso, R., . . . Barata, J. T. (2017). From the outside, from within: Biological and therapeutic relevance of signal transduction in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell Signal*, 38, 10-25. doi:10.1016/j.cellsig.2017.06.011
- Oliveira, M. L., Akkapeddi, P., Ribeiro, D., Melao, A., & Barata, J. T. (2019). IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An update. *Adv Biol Regul*, 71, 88-96. doi:10.1016/j.jbior.2018.09.012
- Park, J. H., Adoro, S., Guintier, T., Erman, B., Alag, A. S., Catalfamo, M., . . . Singer, A. (2010). Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol*, 11(3), 257-264. doi:10.1038/ni.1840

- Patra, A. K., Avots, A., Zahedi, R. P., Schuler, T., Sickmann, A., Bommhardt, U., & Serfling, E. (2013). An alternative NFAT-activation pathway mediated by IL-7 is critical for early thymocyte development. *Nat Immunol*, *14*(2), 127-135. doi:10.1038/ni.2507
- Pelullo, M., Quaranta, R., Talora, C., Checquolo, S., Cialfi, S., Felli, M. P., . . . Bellavia, D. (2014). Notch3/Jagged1 circuitry reinforces notch signaling and sustains T-ALL. *Neoplasia*, *16*(12), 1007-1017. doi:10.1016/j.neo.2014.10.004
- Puel A., Ziegler S.F., Buckley R.H., & W.J., L. (1998). Defective IL7R expression in T-B+NK+ severe combined immunodeficiency. *nature genetics*, *20*, 394-397.
- Reis, B., Pfeffer, K., & Beer-Hammer, S. (2009). The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development. *BMC Immunol*, *10*, 38. doi:10.1186/1471-2172-10-38
- Reizis, B., & Leder, P. (2002). Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev*, *16*(3), 295-300. doi:10.1101/gad.960702
- Ren, Z., Aerts, J. L., Vandenplas, H., Wang, J. A., Gorbenko, O., Chen, J. P., . . . De Greve, J. (2016). Phosphorylated STAT5 regulates p53 expression via BRCA1/BARD1-NPM1 and MDM2. *Cell Death Dis*, *7*(12), e2560. doi:10.1038/cddis.2016.430
- Ribeiro, D., Melao, A., & Barata, J. T. (2013). IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Adv Biol Regul*, *53*(2), 211-222. doi:10.1016/j.jbior.2012.10.005
- Richter-Pechanska, P., Kunz, J. B., Hof, J., Zimmermann, M., Rausch, T., Bandapalli, O. R., . . . Kulozik, A. E. (2017). Identification of a genetically defined ultra-high-risk group in relapsed pediatric T-lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*, *7*(2), e523. doi:10.1038/bcj.2017.3
- Riera Romo, M., Perez-Martinez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, *148*(2), 125-139. doi:10.1111/imm.12597
- Rimkus, C., Martini, M., Friederichs, J., Rosenberg, R., Doll, D., Siewert, J. R., . . . Janssen, K. P. (2006). Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer. *Br J Cancer*, *95*(10), 1419-1423. doi:10.1038/sj.bjc.6603452
- Santarlasci, V., Mazzoni, A., Capone, M., Rossi, M. C., Maggi, L., Montaini, G., . . . Annunziato, F. (2017). Musculin inhibits human T-helper 17 cell response to interleukin 2 by controlling STAT5B activity. *Eur J Immunol*, *47*(9), 1427-1442. doi:10.1002/eji.201746996
- Schäll, D. (2015). Das Adapterprotein SLy1 - Ein Zelltyp-spezifischer Regulator des Immunsystems.
- Schäll, D., Schmitt, F., Reis, B., Brandt, S., & Beer-Hammer, S. (2015). SLy1 regulates T-cell proliferation during *Listeria monocytogenes* infection in a Foxo1-dependent manner. *Eur J Immunol*, *45*(11), 3087-3097. doi:10.1002/eji.201545609
- Schlenner, S. M., Madan, V., Busch, K., Tietz, A., Laufle, C., Costa, C., . . . Rodewald, H. R. (2010). Fate mapping reveals separate origins of T cells



- and myeloid lineages in the thymus. *Immunity*, 32(3), 426-436. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.005
- Schmitt, F., Schall, D., Bucher, K., Schindler, T. I., Hector, A., Biedermann, T., . . . Beer-Hammer, S. (2015). SLy2 controls the antibody response to pneumococcal vaccine through an IL-5R $\alpha$ -dependent mechanism in B-1 cells. *Eur J Immunol*, 45(1), 60-70. doi:10.1002/eji.201444882
- Shah, D. K., & Zuniga-Pflucker, J. C. (2014). An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol*, 192(9), 4017-4023. doi:10.4049/jimmunol.1302259
- Silva, A., Laranjeira, A. B., Martins, L. R., Cardoso, B. A., Demengeot, J., Yunes, J. A., . . . Barata, J. T. (2011). IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Res*, 71(14), 4780-4789. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3606
- Singer, A., Adoro, S., & Park, J. H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol*, 8(10), 788-801. doi:10.1038/nri2416
- Smith, S., Tripathi, R., Goodings, C., Cleveland, S., Mathias, E., Hardaway, J. A., . . . Dave, U. P. (2014). LIM domain only-2 (LMO2) induces T-cell leukemia by two distinct pathways. *PLoS One*, 9(1), e85883. doi:10.1371/journal.pone.0085883
- Suliman, S., Tan, J., Xu, K., Kousis, P. C., Kowalski, P. E., Chang, G., . . . Guidos, C. (2011). Notch3 is dispensable for thymocyte beta-selection and Notch1-induced T cell leukemogenesis. *PLoS One*, 6(9), e24937. doi:10.1371/journal.pone.0024937
- Sun, R., Wang, J., & Young, K. H. (2017). Oncogenic Signaling Pathways and Pathway-Based Therapeutic Biomarkers in Lymphoid Malignancies. *Crit Rev Oncog*, 22(5-6), 527-557. doi:10.1615/CritRevOncog.2017020816
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*, 7(6), e577. doi:10.1038/bcj.2017.53
- Uchida, T., Nakao, A., Nakano, N., Kuramasu, A., Saito, H., Okumura, K., . . . Ogawa, H. (2001). Identification of Nash1, a novel protein containing a nuclear localization signal, a sterile alpha motif, and an SH3 domain preferentially expressed in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(1), 137-141. doi:10.1006/bbrc.2001.5722
- Van Vlierberghe, P., & Ferrando, A. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*, 122(10), 3398-3406. doi:10.1172/JCI61269
- Varnum-Finney, B., Dallas, M. H., Kato, K., & Bernstein, I. D. (2008). Notch target Hes5 ensures appropriate Notch induced T- versus B-cell choices in the thymus. *Blood*, 111(5), 2615-2620. doi:10.1182/blood-2007-03-079855
- Vicente, R., Swainson, L., Marty-Gres, S., De Barros, S. C., Kinet, S., Zimmermann, V. S., & Taylor, N. (2010). Molecular and cellular basis of T cell lineage commitment. *Semin Immunol*, 22(5), 270-275. doi:10.1016/j.smim.2010.04.016
- von Holleben, M., Gohla, A., Janssen, K. P., Iritani, B. M., & Beer-Hammer, S. (2011). Immunoinhibitory adapter protein Src homology domain 3 lymphocyte protein 2 (SLy2) regulates actin dynamics and B cell

- spreading. *J Biol Chem*, 286(15), 13489-13501. doi:10.1074/jbc.M110.155184
- Weerkamp, F., van Dongen, J. J., & Staal, F. J. (2006). Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 20(7), 1197-1205. doi:10.1038/sj.leu.2404255
- Wen, R., Wang, D., McKay, C., Bunting, K. D., Marine, J. C., Vanin, E. F., . . . Cleveland, J. L. (2001). Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol Cell Biol*, 21(2), 678-689. doi:10.1128/MCB.21.2.678-689.2001
- Weng A.P., Ferrando A.A., Lee W., Morris IV J.P., Silverman L.B., Sanchez-Irizarry C., . . . J.C., A. (2004). Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science*, 306.
- Wilson A., MacDonald H.R., & F., R. (2001). Notch 1-deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus. *J. Exp. Med.*, 194, 1003-1012.
- Yamada, H., Yanagisawa, K., Tokumaru, S., Taguchi, A., Nimura, Y., Osada, H., . . . Takahashi, T. (2008). Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 47(9), 810-818. doi:10.1002/gcc.20582
- Yu, Q., Erman, B., Park, J. H., Feigenbaum, L., & Singer, A. (2004). IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and ROR $\gamma$ mat: impact on thymocyte development. *J Exp Med*, 200(6), 797-803. doi:10.1084/jem.20032183
- Yui, M. A., & Rothenberg, E. V. (2014). Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat Rev Immunol*, 14(8), 529-545. doi:10.1038/nri3702
- Zeller, C., Hinzmann, B., Seitz, S., Prokoph, H., Burkhard-Goettges, E., Fischer, J., . . . Scherneck, S. (2003). SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. *Oncogene*, 22(19), 2972-2983. doi:10.1038/sj.onc.1206474
- Zenatti, P. P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M. C., Paganin, M., . . . Barata, J. T. (2011). Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 43(10), 932-939. doi:10.1038/ng.924

## **7 Eidesstattliche Erklärung**

### **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde im Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Beer-Hammer durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (insbesondere Claudia Müller) von mir mit Unterstützung durch Claudia Müller durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung des Instituts durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 15.03.2021

---

(Isabel Kloos)

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Besonders danken möchte ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Beer-Hammer und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Nürnberg, die diese Arbeit von Seiten des pharmakologischen Instituts ermöglicht und unterstützt haben. Vor allem danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Beer-Hammer für die hervorragende Betreuung und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Auch möchte ich Claudia Müller meinen Dank aussprechen, die mich im Rahmen der Promotionszeit mit Rat, Anregungen, produktiven Gesprächen und lieben Worten begleitet hat.

Desweiteren möchte ich Jennifer Jaufmann Danke sagen, die mir zum einen immer eine gute Freundin war und zum anderen meine Arbeit durch ihre Unterstützungen und Bemühungen ebenfalls geprägt hat.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die stetige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt dem interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung, welches durch finanzielle Unterstützung das Freisemester für die Doktorarbeit ermöglichte, als auch durch verschiedene Fortbildungen und Angebote eine große Hilfe bei der Anfertigung der Promotion war.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und Freunden für ihre Ermutigungen und guten Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.