

Aus dem

Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Pharmakogenomik der Universität Tübingen

Abteilung Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie

Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 in der T-Zell- Entwicklung

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

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

vorgelegt von

Schneider, Barbara

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatterin: Professorin Dr. S. Beer-Hammer

2. Berichterstatterin: Professorin Dr. E.-M. Grischke

Tag der Disputation: 13.09.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 T-Zellen	1
1.1.2 Die Entwicklung von $\alpha\beta$ -T-Zellen	2
1.2 Signalwege der T-Zell-Entwicklung	3
1.2.1 Der Notch-Signalweg	3
1.2.2 Der IL-7-Rezeptor-Signalweg	4
1.2.3 Der p53-Signalweg	5
1.3 SLy1	9
1.3.1 Die SLy-Proteinfamilie	9
1.3.2 Proteinstruktur	10
1.3.3 Funktion in Immunzellen	11
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	12
2 Methoden und Materialien	13
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Puffer	13
2.2 Tierversuche	15
2.2.1 Tierzucht und -haltung	15
2.2.2 Mausmodelle	15
2.2.3 Tötung und Organentnahme	16
2.3 Zellisolation	16
2.3.1 Isolation peripherer T-Zellen aus der Milz per MACS	17
2.3.2 Isolation DN Thymozyten per MACS	17

2.4	Analyse der Noxa-, PUMA- und Mdm2- Expression auf mRNA-Ebene . .	18
2.4.1	mRNA-Gewinnung	18
2.4.2	Umschreibung von mRNA zu cDNA	18
2.4.3	Quantitative PCR	19
2.5	Analyse von Protein-Expression und -Phosphorylierung per Western Blot	19
2.5.1	Proteingewinnung	20
2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	20
2.5.3	Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine	20
2.5.4	Western Blot	21
2.5.5	Antikörperfärbung und Entwicklung	21
2.6	Quantitative Bestimmung der Zellpopulation in lymphatischen Organen .	23
2.6.1	Zellisolation und -zählung	23
2.6.2	Färbung mit Fluorophor-konjugierten Antikörpern	23
2.6.3	Datenaufnahme mit dem Durchflusszytometer	23
2.6.4	Gatingstrategie	25
2.7	Statistische Auswertung und Darstellung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Analyse von Expression und Phosphorylierung der Kinasen Jak1 und Jak3 des IL-7R-Signalwegs	28
3.1.1	Jak1 und Jak3 in Thymozyten	28
3.1.2	Jak1 und Jak3 in DN Thymozyten	30
3.2	Phosphorylierungsanalyse des p53-Signalwegs auf Protein-Ebene	32
3.2.1	Der p53-Signalweg in Thymozyten	32
3.2.2	Der p53-Signalweg in DN Thymozyten	38
3.2.3	Der p53-Signalweg in T-Zellen	40
3.3	Analyse der Mdm2-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene	41
3.3.1	Mdm2-Expression und -Phosphorylierung in Thymozyten	42
3.3.2	Mdm2 in DN und DP Thymozyten	43
3.3.3	Mdm2-Expression und -Phosphorylierung in T-Zellen	43
3.4	Analyse von p53-Downstream-Apoptosemarkern auf mRNA-Ebene	45
3.4.1	Noxa und PUMA in Thymozyten	45
3.4.2	Noxa und PUMA in DN und DP Thymozyten	46
3.4.3	Noxa und PUMA in T-Zellen	47
3.5	Die T-Zell-Entwicklung in Tieren mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz	48
3.5.1	Überprüfung der T-Zell-spezifischen p53-Defizienz	48
3.5.2	Wahl einer geeigneten Kontrollgruppe	49

Inhaltsverzeichnis

3.5.3	Entwicklung der Zellzahlen in lymphatischen Organen	51
3.5.4	Veränderungen in den Thymozyten-Populationen	53
3.5.5	Veränderungen in den Splenozyten- und Lymphknoten-Populationen	57
3.6	Eingeschränktes Überleben und Tumorentwicklung bei p53-Defizienz . .	60
3.6.1	Durchflusszytometrische Untersuchung entarteter Zellen	61
3.6.2	Überlebensanalyse bei p53-Defizienz	64
4	Diskussion	66
4.1	Aktivierung des p53-Signalwegs in SLy1 ^{KO} -Thymozyten	66
4.2	Aktivierung des IL-7R-Signalwegs in SLy1 ^{KO} -Thymozyten	69
4.3	Mögliche Ursachen der Veränderungen in der Signalweg-Aktivierung . .	70
4.4	Entartung bei T-Zell-spezifischer p53-Deletion in Abhängigkeit von der SLy1-Expression	72
4.4.1	Auswirkung der Cre-Rekombinase unabhängig von einer p53- Defizienz	72
4.4.2	p53 ist nicht Effektor der SLy1 ^{KO} -induzierten Veränderungen . .	73
4.4.3	Reduziertes Überleben von p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT/KO} -Tieren . .	74
4.4.4	Veränderung der Lichtstreuungseigenschaften von p53-defizienten Zellen	74
4.5	Ausblick	76
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	79
7	Anhang	88
A	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	I
B	Veröffentlichungen	II
C	Danksagung	III

Abbildungsverzeichnis

1	Der IL-7-Rezeptor-Signalweg	5
2	Der p53-Signalweg	6
3	Das Protein SLy1	9
4	Genotypen bei T-Zell-spezifischer p53-Deletion	16
5	Gatingstrategie DN Thymozyten	25
6	Gatingstrategie Thymozyten	26
7	Gatingstrategie Lymphozyten in Lymphknoten und Milz	27
8	Expression und Phosphorylierung von Jak1 in Thymozyten	29
9	Expression und Phosphorylierung von Jak3 in Thymozyten	30
10	Expression und Phosphorylierung von Jak1 in DN Thymozyten	31
11	Expression und Phosphorylierung von Jak3 in DN Thymozyten	31
12	Expression und Phosphorylierung von p53 in Thymozyten	33
13	Expression und Phosphorylierung von ATR in Thymozyten	34
14	Expression und Phosphorylierung von Chk1 in Thymozyten	35
15	Expression und Phosphorylierung von ATM in Thymozyten	36
16	Expression und Phosphorylierung von Chk2 in Thymozyten	37
17	Expression und Phosphorylierung von p53 in DN Thymozyten	39
18	Expression und Phosphorylierung von ATM in DN Thymozyten	39
19	Expression von p53 in SLy1 ^{KO} -T-Zellen	40
20	Expression und Phosphorylierung von ATM in T-Zellen	41
21	Mdm2 mRNA- und Protein-Expression und -Phosphorylierung in Thymozyten	42
22	Mdm2 mRNA-Expression in DN und DP Thymozyten	43
23	Mdm2 mRNA- und Protein-Expression und -Phosphorylierung in T-Zellen	44
24	Noxa und PUMA mRNA-Expression in Thymozyten	45
25	Noxa und PUMA mRNA-Expression in DN und DP Thymozyten	46
26	Noxa und PUMA mRNA-Expression in T-Zellen	47
27	Überprüfung der p53-Defizienz in p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{het} -Thymozyten	48

Abbildungsverzeichnis

28	Thymozytenzahl im Alter von 10 und 25 Wochen in allen Kontrollgruppen	49
29	Thymozytenpopulationen in allen Kontrollgruppen	50
30	Zellzahlen in Thymus, Milz und Lymphknoten in $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ - Tieren im Alter von 10 und 25 Wochen	52
31	Thymozytenpopulationen in $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ - und $p53^{+/+}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ -Tieren im Alter von 10 Wochen	54
32	Thymozytenpopulationen in $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ - und $p53^{+/+}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ -Tieren im Alter von 25 Wochen	55
33	SSC- und FSC-Werte der Thymozyten in allen Kontrollgruppen	56
34	Lymphozytenpopulationen in Milz und inguinalen LK von $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ -Tieren im Alter von 10 Wochen	58
35	Lymphozytenpopulationen in Milz und inguinalen LK von $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ -Tieren im Alter von 25 Wochen	59
36	Thymom- und Lymphomphänotyp $p53$ -defizienter Tiere	60
37	Durchflusszytometrische Untersuchung der Thymozytenpopulationen bei Entartung	62
38	Durchflusszytometrische Untersuchung der LK- und Milz-Zellen bei Ent- artung	63
39	Überleben von $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ -Tieren	65
40	Proteinexpression der DDR-Kinasen und $p53$ in $SLy1^{KO}$ -Thymozyten	67
41	Veränderungen der SSC- und FSC-Werte von $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO-}$ - Thymozyten bei Entartung	75
42	Thymozytenzahl, SSC- und FSC-Werte in allen Kontrollgruppen darge- stellt nach $SLy1$ -Expression	88
43	Thymozytenpopulationen in allen Kontrollgruppen dargestellt nach $SLy1$ - Expression	89

Tabellenverzeichnis

1	T-Zell-Entwicklung im Thymus	3
2	Geräte	13
3	Verbrauchsmaterialien und Kits	13
4	Puffer und Lösungen	14
5	MACS: Beads und Säulen	17
6	qPCR: LightCycler-Programm	18
7	qPCR: Master Mix	19
8	qPCR: Primer	19
9	Western Blot: Primäre Antikörper	21
10	Western Blot: Sekundäre Antikörper	22
11	FACS: Antikörper-Panel Thymus 1 (DN1-4)	24
12	FACS: Antikörper-Panel Thymus 2 (DN, DP, SP)	24
13	FACS: Antikörper-Panel Lymphknoten und Milz	24
14	Expression und Phosphorylierung von Jak1 und Jak3 in Thymozyten	30
15	Expression und Phosphorylierung von Jak1 und Jak3 in DN Thymozyten	32
16	Expression und Phosphorylierung von p53 und den DDR-Kinasen in Thymozyten	37
17	Expression und Phosphorylierung von p53 und der DDR-Kinase ATM in DN Thymozyten	38
18	Expression und Phosphorylierung von p53 und der DDR-Kinase ATM in T-Zellen	40
19	mRNA-Expression von Mdm2	43
20	Expression und Phosphorylierung von Mdm2 in Thymozyten und T-Zellen	44
21	mRNA-Expression von Noxa und PUMA	47
22	Entwicklung der Zellzahlen in lymphatischen Organen in Abhängigkeit vom Alter	51
23	Überleben von p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT/KO} -Tieren	65
24	Todes- und Zensurzeitpunkte der p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT/KO} -Tiere	90

25	Statistische Auswertung der Überlebenskurven	90
----	--	----

Abkürzungsverzeichnis

ATM	<i>ataxia teleangiectasia mutated-Kinase</i>
ATR	<i>ataxia teleangiectasia and Rad3 related-Kinase</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Chk1 / 2	Checkpoint-Kinase 1 / 2
DN Thymozyten	Thymozyten in der CD4- und CD8-negativen Vorstufe
DP Thymozyten	Thymozyten in der CD4- und CD8-positiven Vorstufe
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
flox / fl	von loxP-Stellen flankiert (<i>flanked by loxP</i>)
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie (<i>forward scatter scale</i>)
het	heterozygot
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradisch peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Jak1 / 3	Januskinase 1 / 3
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LN	Lymphknoten (<i>lymph node</i>)
loxP	<i>locus of crossing over x in P1</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
Mdm2	<i>murine double minute 2 homolog-Ligase</i>
nf	fettfrei (<i>non-fat</i>)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLS	nukleäres Lokalisationssignal

Abkürzungsverzeichnis

NPM	Nukleophosmin
ns	nicht signifikant
p	phosphoryliert
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
SAM	steriles α Motiv
Ser	Serin
SLy1	SH3-Lymphozytenprotein
SP Thymozyten	Thymozyten, die entweder CD4- oder CD8-positiv sind (<i>single positive</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie (<i>side scatter scale</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
Stat5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
Thr	Threonin
Thymozyten	alle Thymozyten ohne Isolierung (Synonym: Gesamtthymozyten)
Tyr	Tyrosin
TZR	T-Zell-Rezeptor
WT	Wildtyp

1

Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellen, chemischer und mechanischer Barrieren und Botenstoffe, die den Körper vor pathogenen Keimen aus der Umwelt und entarteten Zellen des eigenen Organismus schützen.

Das angeborene Immunsystem reagiert unspezifisch auf unbekannte Strukturen, während das erworbene Immunsystem zielgerichtet bestimmte Pathogene zerstören kann. Um ausreichenden Schutz zu gewähren, bei größtmöglicher Sicherheit für die eigenen Körperzellen, ist eine komplexe Ausbildung der entsprechenden Zellen notwendig und eine ausgiebige Selektion, bevor diese das lymphatische System patrouillieren. Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und erkennen über Mustererkennungsrezeptoren unspezifisch und schnell Krankheitserreger. NK-Zellen dienen hier vor allem der Immunabwehr von Viren und Tumorzellen. B-Zellen sind als Teil des erworbenen Systems für die gezielte Abwehr mit Hilfe von Antikörpern verantwortlich. Sie entwickeln sich im Knochenmark und werden über Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen oder direktem Kontakt mit Erregern aktiviert. Auf ihren Oberflächenrezeptor präsentieren sie Antigenanteile, die von T-Helfer-Zellen erkannt werden und die B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen.

Im Folgenden soll weiter auf Funktion und Entwicklung der T-Zellen als Teil des erworbenen Immunsystems eingegangen werden.

1.1.1 T-Zellen

Als T-Zellen bezeichnet man hämatopoetische Zellen der lymphatischen Reihe, die im Thymus die Reifung zu ihrer adulten Form erfahren. Man kann drei Haupttypen unterscheiden. $\alpha\beta$ -T-Zellen können über den $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor (TZR) identifiziert werden und tragen in ihrer adulten Form entweder den CD4- oder CD8-Rezeptor an ihrer Zelloberfläche. CD4⁺ T-Zellen (auch: T-Helfer-Zellen) erkennen Antigene auf den MHCII-Rezeptoren Antigen-präsentierender Zellen und helfen durch Zytokinausschüttung mit bei der Akti-

vierung von B-Zellen und Makrophagen, während CD8⁺ T-Zellen (auch: zytotoxische T-Zellen) eigenständig die Lyse virusinfizierter oder entarteter Zellen einleiten können.

$\gamma\delta$ -T-Zellen, die etwa 5% aller T-Zellen ausmachen, halten sich vor allem in Haut, Lunge und Schleimhäuten des Gastrointestinaltrakts auf. Über Besonderheiten ihrer Funktion ist bisher wenig bekannt.

T-Zellen können zum Entstehen verschiedener Krankheiten führen, hierzu zählen Leukämien und Lymphome, sowie Immundefizienzen. Im Folgenden soll genauer auf die Entwicklung der $\alpha\beta$ -T-Zellen und im Abschnitt 1.2 auf die relevanten Signalwege der Entwicklung eingegangen werden.

1.1.2 Die Entwicklung von $\alpha\beta$ -T-Zellen

Der Thymus dient als Entwicklungsorgan der $\alpha\beta$ - sowie $\gamma\delta$ -T-Zellen. Ihre direkten Vorläufer entstammen dem Knochenmark und bevölkern den Thymus hämatogen (Donskoy und Goldschneider 1992). Zu diesem Zeitpunkt ist noch die Entwicklung zu verschiedenen Lymphozyten möglich (Donskoy und Goldschneider 1992). Die Entscheidung der neu eingewanderten Stammzellen zur T-Zell-Linie ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehört die Bindung des Transmembranproteins Notch1 an den Liganden Delta1, der von den Epithelzellen des Thymus exprimiert wird (Radtko et al. 1999).

Die frühesten T-Zell-Vorläufer durchlaufen nun das doppelt negativ (DN)-Stadium, in dem sie weder CD4- noch CD8-Rezeptoren an ihrer Oberfläche präsentieren, und stattdessen über die Expression von CD44 und CD25 in die Entwicklungsstufen DN1 bis DN4 eingeteilt werden (s. Tab. 1) (Godfrey et al. 1993). Das Rearrangement der für den T-Zell-Rezeptor relevanten Gene TZR β , TZR γ und TZR δ findet RAG1- und RAG2-abhängig im DN2-Stadium statt (Godfrey et al. 1994; Capone et al. 1998; Livak et al. 1999). Die TZR β -Kette bildet gemeinsam mit der invarianten präTZR α -Kette den prä-T-Zell-Rezeptor (präTZR) und verhindert damit eine Apoptose bei mangelnder Differenzierung im Rahmen der β -Selektion (Dudley et al. 1994; Michie und Zuniga-Pflucker 2002).

Im weiteren Verlauf exprimieren Thymozyten im DP-Stadium CD4- und CD8-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Im frühen DP-Stadium findet ein RAG1- und RAG2-abhängiges Rearrangement der TZR α -Kette statt, um nun den finalen TZR zu bilden. Dies geschieht so lange, bis das Erkennen von Selbst-Peptid / Selbst-MHC-Komplexen im Rahmen der positiven Selektion erfolgreich ist (Kisielow et al. 1988; Petrie et al. 1993). Bei der nachfolgenden negativen Selektion werden Zellen aussortiert, die sehr stark auf Selbst-Peptid / Selbst-MHC-Komplexe ansprechen, um die Ausbildung autoreaktiver T-Zellen zu vermeiden (Starr et al. 2003). Weniger als 5% der DP Thymozyten überstehen diese beiden Auswahlsschritte (Starr et al. 2003).

Tabelle 1. T-Zell-Entwicklung im Thymus

T-Zellen entwickeln sich im Thymus und durchlaufen hier verschiedene Entwicklungsstadien.

Stadium	Oberflächenrezeptoren	Ereignisse
DN	1 CD44	RAG1/2-abh. Rearrangement TZR β -Kette β -Selektion, Expression des präTZR Proliferation
	2 CD25 und CD44	
	3 CD25; präTZR	
	4 präTZR	
DP	früh CD4 und CD8; präTZR	Prolif.; RAG1/2-abh. Rearrangement TZR α -Kette positive und negative Selektion
	spät CD4 und CD8; TZR	
SP	CD4 oder CD8	

Thymozyten verlassen als einfach positive (SP) Thymozyten mit entweder CD4- oder CD8-Rezeptor den Thymus und gehen als naive T-Zellen in den Blutkreislauf über. Bei Kontakt mit einem entsprechenden Antigen erfolgt die Aktivierung und Reifung zur aktiven T-Zelle.

1.2 Signalwege der T-Zell-Entwicklung

Für Differenzierung, Proliferation und Vermeidung von DNA-Schäden sind im Thymus verschiedene Signalwege verantwortlich und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der T-Zell-Entwicklung aktiv.

1.2.1 Der Notch-Signalweg

Die Signalübertragung über Notch-Proteine und ihre Liganden ist hochkonserviert und wird in verschiedenen Zelltypen über Speziesgrenzen hinweg genutzt. In der Entwicklung von T-Zellen werden Notch-Proteine in der Kommunikation der Thymozyten mit den Thymusepithelzellen im Rahmen des sogenannten *thymus crosstalk* genutzt (Ewijk et al. 1994; Hozumi et al. 2008). Intrazellulär wirkt die Bindung entsprechender Liganden an den Notch-Rezeptor der Thymozyten durch die Aktivierung der Transkription verschiedener Gene. Diese stärken einerseits die Zugehörigkeit zur T-Zell-Entwicklung und lösen andererseits die Verhinderung der Expression des TZR α -Gens und damit der Bildung von prä-T-Zell-Rezeptoren auf (Bellavia et al. 2007).

1.2.2 Der IL-7-Rezeptor-Signalweg

Hauptfunktion des IL-7-Rezeptor (IL-7R)-Signalwegs in den Thymozyten ist die Gewährleistung der Proliferation, des Überlebens und der Differenzierung der sich rapide entwickelnden Zellen (Hong et al. 2012). Je nach Entwicklungsschritt der Thymozyten werden unterschiedlich starke Signale durch den Signalweg dieses Zytokins benötigt, damit die Weiterentwicklung der Zellen korrekt erfolgen kann (Hong et al. 2012). Hierbei wird die Quantität der Signalübertragung auf die Zelle nicht durch die Menge des extrazellulären IL-7, sondern durch die bedarfsgerechte Expression des IL-7-Rezeptors an der Zelloberfläche gesteuert (Hong et al. 2012; Jiang et al. 2005).

Die höchste IL-7R-Expression wird in DN1 und DN2 Thymozyten beobachtet, bei geringerer Expression in DN3 Thymozyten und weiter verringerter Expression in DN4 Thymozyten (ElKassar und Gress 2010). In DP Thymozyten wird zunächst kaum IL-7-Rezeptor exprimiert und erst nach der positiven Selektion wiederaufgenommen (Hong et al. 2012). Diesem Mechanismus wird ein altruistisches Motiv unterstellt, da die DP Thymozyten so nicht das IL-7 verbrauchen, für das die DN Thymozyten einen höheren Bedarf haben (Park et al. 2004).

Bei Binden des Zytokins an seinen Rezeptor wird die Bildung eines Heterodimers aus der für den IL-7R spezifischen IL-7R α Kette mit der für verschiedene Zytokine verwendeten γ -Kette ausgelöst (Jiang et al. 2005). So kommen das an die IL-7R α -Kette gebundene Jak1 und das mit der γ -Kette assoziierte Jak3 in räumliche Nähe und Jak3 kann Jak1 sowie die α -Kette phosphorylieren (s. Abb. 1) (Jiang et al. 2005). Jak1 hat Phosphorylierungsstellen an Tyr1034 und Tyr1035, die zur Aktivierung der Kinase-Aktivität und Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* (Stat5) führen (Liu et al. 1997). Für Jak3 sind unterschiedliche Phosphorylierungsstellen bekannt, wobei Tyr980 und Tyr981 Ziel der Autophosphorylierung sind. Die Phosphorylierung von Tyr980 hat eine aktivierende Funktion auf die Kinaseaktivität und erlaubt die Phosphorylierung der γ -Kette und Stat5, während die Phosphorylierung von Tyr981 eine hemmende Wirkung hat (Zhou et al. 1997).

An die phosphorylierte IL-7R α -Kette bindet Stat5 und wird durch die Tyrosinkinase phosphoryliert. Das phosphorylierte Stat5 transloziert in den Nukleus und verändert dort die Expression verschiedener zellzykluswirksamer Gene (Jiang et al. 2005). Erhöht wird die Expression der anti-apoptotisch wirksamen *B cell lymphoma 2* (Bcl-2) Genfamilie und des den Zellzyklus antreibenden *cell division cycle 25 homologue A* (CDC25A). Die pro-apoptotischen Gene des Bcl-2 assoziierten X Protein (BAX), des Bcl-2-interagierenden Mediator des Zelltods (BIM), sowie des Bcl-2-Antagonisten des Zelltods (BAD) werden hingegen in ihrer Expression durch die Wirkung von Stat5 reduziert (Mackall et al. 2011).

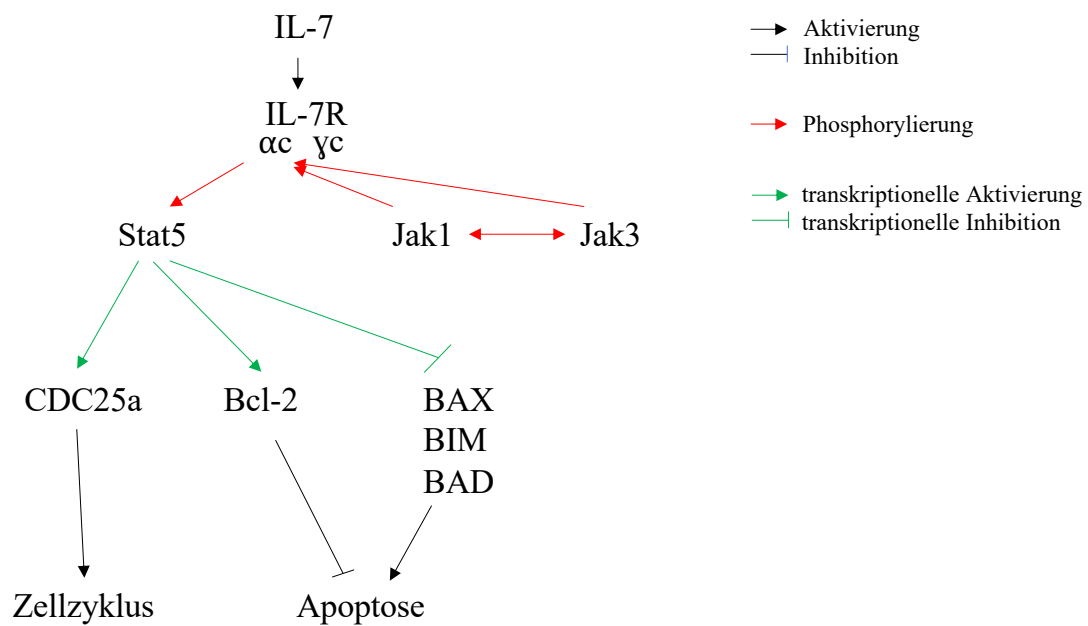


Abbildung 1. Der IL-7-Rezeptor-Signalweg

Nach Aktivierung des IL-7-Rezeptors wird durch das phosphorylierte Stat5 transkriptionell Proliferation und Überleben der Zelle gefördert (Jiang et al. 2005; Hong et al. 2012; Ren et al. 2016).

α : α -Kette des IL-7-Rezeptors

γ : γ -Kette des IL-7-Rezeptors

Das Ergebnis der Transkriptionsveränderung nach Aktivierung des IL-7R-Signalwegs auf den Zellzyklus ist also eine Förderung von Proliferation und Überleben. Auch ein zweiter Downstreamsignalweg von p-Stat5 mit dem Ergebnis einer p53-Hemmung führt zu ähnlichen Entwicklungen in der Zelle und wird im Abschnitt 1.2.3 beschrieben.

1.2.3 Der p53-Signalweg

p53

p53 ist ein zentraler Tumorsuppressor und wirkt indem er Wachstum bzw. Vermehrung von Zellen mit potentiell onkogen mutierter DNA verhindert. Da etwa 50% der menschlichen Tumore eine p53-Mutation zugrunde liegen haben, wird ihm besondere Bedeutung in der Verhinderung der Karzinogenese zugeschrieben (Klusmann et al. 2016).

Bestimmend für das Ausmaß der Funktion von p53 ist das zelluläre Proteinlevel, welches durch eine kurze Halbwertszeit gering gehalten wird (Levine 1997). p53 kann an mehreren Aminosäuren durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden und damit auf seine Funktion Einfluss genommen werden. Die beiden Kinasen Chk1 und Chk2 phosphorylieren p53 an den Aminosäureresten Ser15, Ser20 und Ser37 (Shieh et al. 2000), ATM phosphoryliert p53 an Ser15 (Khanna et al. 1998). Die Phosphorylierung an Ser15 und

1. Einleitung

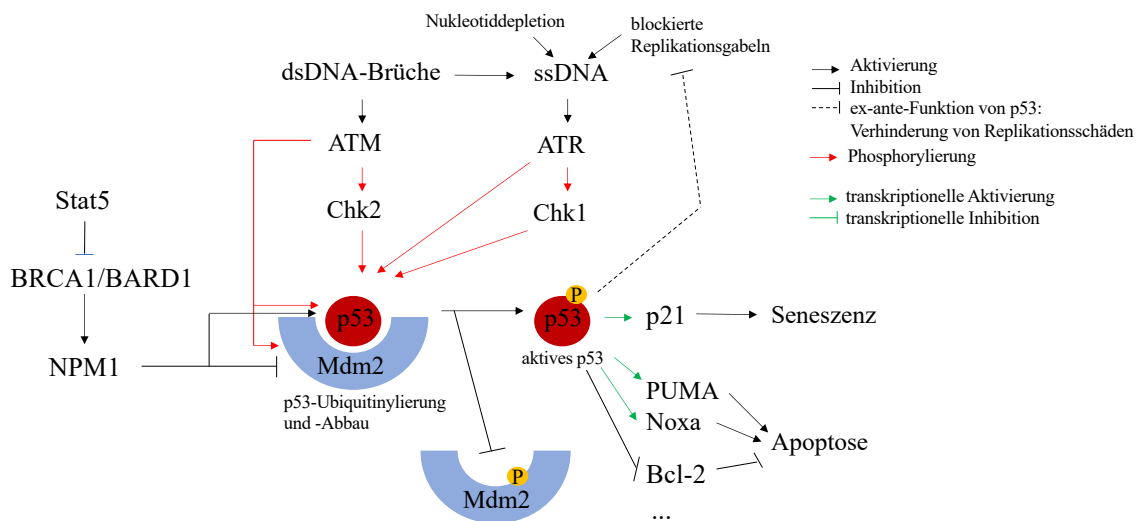


Abbildung 2. Der p53-Signalweg

Der Tumorsuppressor p53 wird als Folge von dsDNA-Brüchen und dem Vorliegen von ssDNA über die Signalkaskade der DDR-Kinasen phosphoryliert und damit aktiviert (Mihara et al. 2003). Mdm2 ist eine Ubiquitin-Ligase und inaktiviert im Ruhezustand p53 (Moll und Petrenko 2003). Wenn Mdm2 und p53 phosphoryliert werden, kann p53 als Transkriptionsfaktor Seneszenz und Apoptose induzieren und durch direkte Interaktion mit unter anderem Bcl-2 die Apoptose verhindern. Über den Stat5-Signalweg wird NPM1 über BRCA1/BARD1 inhibiert. NPM1 kann die Bindung von Mdm2 und p53 hemmen, so dass p53 als Tumorsuppressor wirken kann (Ren et al. 2016). Außerdem kann p53 auch die Entstehung von Replikationsschäden reduzieren (Klusmann et al. 2016).

Ser37 behindert die Bindung von Mdm2 an p53 und schränkt damit die Inaktivierung des Tumorsuppressors ein (s. Abb. 2) (Shieh et al. 1997).

Als Reaktion auf einen Schaden in der DNA hat p53 mehrere Möglichkeiten die Apoptose auszulösen, sowie die Möglichkeit die Zelle in die Seneszenz zu führen (Mihara et al. 2003). Die transkriptionsabhängige Apoptose wird von p53 durch eine Hochregulierung verschiedener pro-apoptotischer Gene, wie unter anderen den Bcl-2-homologen (BH)3-only Genen Noxa und PUMA, kombiniert mit der Transkriptionssinhibition von anti-apoptotischen Genen, wie Bcl-2, ausgelöst (Mihara et al. 2003). Zusätzlich gibt es die Möglichkeit einer transkriptionsunabhängigen Induktion der Apoptose durch p53, indem p53 direkt mit unter anderem Bcl-2 an der äußeren Mitochondrienmembran Komplexe bildet, die schützenden Proteine hierdurch deaktiviert und die äußere Mitochondrienmembran permeabel macht (Mihara et al. 2003).

Zusätzlich zu einer „ex-post“-Funktion von p53 durch die Elimination von Zellen nach stattgefundenem Zellschaden, schlagen Klusmann et al. (2016) eine „ex-ante“-Funktion von p53 während der S-Phase vor. p53^{KO}-Zellen haben eine verzögerte DNA-Replikation und mehr replikativen Stress im Vergleich zu ihren Wildtyp-Kontrollen (Klusmann et al. 2016). p53 trägt also nicht nur dazu bei die Konsequenzen eventueller Schäden der DNA-Replikation zu verhindern, sondern auch dazu, das Entstehen dieser Schäden zu verhindern.

Mdm2 und die Antagonisierung von p53

Mdm2 ist eine E3 Ubiquitin-Ligase und mit seiner Funktion der Hauptantagonist von p53 (Moll und Petrenko 2003). In Zellen, die keinem Stress ausgesetzt sind, ist das Protein ständig aktiv und verkürzt dadurch die Halbwertszeit von p53 von einigen Stunden auf fünf bis 30 Minuten (Moll und Petrenko 2003). Der Mechanismus dahinter ist eine Polyubiquitylierung von p53 im Nukleus unter Unterstützung durch p300 (CREB-binding protein) (Moll und Petrenko 2003). Diese führt zum Abbau von p53 durch ein 26S-Proteasom im Nukleus, was ein rasches Abschalten des p53-Signalwegs bei Bedarf ermöglicht (Moll und Petrenko 2003).

Aktivierend auf die Mdm2-p53-Interaktion wirkt die Akt-abhängige Phosphorylierung von Mdm2 an Ser166 und Ser186, welche notwendig ist für die Translokation von Mdm2 in den Nukleus, wo die Interaktion mit p53 stattfindet (Mayo und Donner 2001). Die Hemmung erfolgt über verschiedene Mechanismen. Auf DNA-Schaden hin wird Mdm2 von ATM noch vor der Akkumulation von p53 an Ser395 phosphoryliert und damit in seiner Bindung an p53 gehindert (Khosravi et al. 1999; Maya et al. 2001). Nach mehreren Stunden wird Mdm2 transkriptionell durch p53 hochreguliert (Wu und Levine 1997). Außerdem kann die Komplexbildung von Mdm2 und p53 durch Nukleophosmin (NPM1) gehemmt werden (Ren et al. 2016). NPM1 bindet die Aminosäuren 1-110 von Mdm2, welche unter anderem die Interaktionsdomäne für p53 beinhalten (Kurki et al. 2004). Durch diese Bindungsstelle kann NPM1 p53 kompetitiv von der Bindung mit Mdm2 verdrängen und dem Abbau entgegenwirken (Kurki et al. 2004).

Ren et al. (2016) haben einen Zusammenhang zwischen phosphoryliertem Stat5 (s. Abschnitt 1.2.2) und NPM1 entdeckt, der darauf hinweist, dass das zelluläre p53-Niveau in den Thymozyten nicht nur durch den DDR-Signalweg, sondern auch über den Jak-Stat5-Signalweg reguliert wird. Phosphoryliertes Stat5 induziert über BRCA1/BARD1 eine verringerte Expression von NPM1 und hemmt somit indirekt die p53-Mdm2-Komplexbildung (Ren et al. 2016). Auf diesem Weg hat IL-7 also neben seiner zuvor (s. Abschnitt 1.2.2) beschriebenen proliferationsfördernden Wirkung über die Transkription, eine zusätzliche antagonisierende Wirkung auf p53.

DDR-Signalweg: ATR und Chk1, ATM und Chk2

Um adäquat auf Schäden des Erbguts reagieren zu können, gibt es ein System aus Kinasen des DNA Damage Response (DDR)-Signalwegs (ATR, ATM, Chk1 und Chk2), die als Antwort auf entsprechende Schäden unter anderem eine Stabilisierung von p53 und damit das Aussetzen des Zellzyklus auslösen können.

ATM und Chk2 reagieren primär auf radiogen und genotoxisch ausgelöste Doppelstrang-

brüche der DNA (Matsuoka et al. 2000). Die Phosphorylierung von ATM an Ser1981 wird durch entsprechende Schäden ausgelöst und hat eine Monomerisierung in die aktive Form zur Folge (Bakkenist und Kastan 2003). Chk2 wird durch ATM an Thr68 phosphoryliert und wirkt unter anderem auf p53, indem es dieses an Ser15, Ser20 und Ser37 phosphoryliert, wodurch p53-Mdm2-Komplexe aufgelöst werden können (Chehab et al. 2000; Shieh et al. 2000). ATM kann auch direkt p53 und Mdm2 phosphorylieren (s. Abb. 2) (Chen et al. 2005).

Die Aktivierung von ATR durch einzelsträngige DNA (ssDNA) hat zur Folge, dass diese Kinase bei verschiedenen DNA-Ereignissen eingesetzt wird. Durch eine Nukleotiddepletion blockierte DNA-Replikationsgabeln lassen ssDNA entstehen, ebenso wie die Reparatur von dsDNA, wodurch eine Überlappung zwischen der Aktivierung von ATM und ATR entsteht (Smith et al. 2010). ATR wirkt also auch Downstream von ATM indem es durch die bei der Reaktion von ATM auf Doppelstrangbrüche entstehenden ssDNA aktiviert wird (Shiotani und Zou 2009). Bei Vorliegen von ssDNA wird ATR über Replikationsprotein A (RPA) und das ATR-interagierende Protein (ATRIP) rekrutiert (Shiotani und Zou 2009). Um nun aktiviert zu werden, wird außerdem ein 9-1-1-Komplex und das DNA Topoisomerase 2 bindende Protein (TopBP1) benötigt (Shiotani und Zou 2009). Als Folge von Strangbrüchen wird ATR an Ser428 phosphoryliert (Vauzour et al. 2007), wobei Smith et al. (2010) argumentieren, dass keine posttranslationale Modifikation von ATR notwendig ist für die Aktivierung und Liu et al. (2011) eine Autophosphorylierung an Thr1989 beschreiben, die als einzige notwendig sei für die Phosphorylierung von Chk1. Auf Chk1 wirkt ATR als Kinase und phosphoryliert Chk1 an Ser317 und Ser345 (Zhao und Piwnica-Worms 2001). Chk1 phosphoryliert daraufhin p53 an Ser15, Ser20 und Ser37 (s. Abschnitt 1.2.3) (Shieh et al. 2000). ATR kann p53 auch direkt an Ser15 und Ser37 phosphorylieren (Tibbetts et al. 1999).

Pelletier et al. (2020) schlagen darüber hinaus ein Modell vor, das einen Zusammenhang zwischen Onkogenexpression und DDR-abhängiger p53-Expression aufzeigt. Der vermehrte Nukleotidverbrauch durch die gesteigerte Zellproliferation sowie der erhöhte Ribosomgehalt der Zelle führen zu einem p21-medierten Eintritt der Zelle in die G1-Phase bei Durchlaufen des *impaired ribosome biogenesis checkpoint* (IRBC). Bei zunehmender Hemmung der Inosin Monophosphat Dehydrogenase und folglich zunehmendem Nukleotidmangel wird p21 abgebaut. Dies führt dazu, dass die Zelle in die S-Phase eintritt und die DDR-Proteine aktiviert werden (Pelletier et al. 2020).

1.3 SLy1

Das SH3-Lymphozytenprotein (SLy1) ist ein Lymphozyten-spezifisches Adapter-Protein, das zunächst durch Isolation der cDNA aus einem murinen T-Zell Lymphom entdeckt wurde (Beer et al. 2001). Das SLy1-Gen liegt auf dem X-Chromosom am Locus Xq25-26 in der Nähe anderer Gene, die für verschiedene Immunkrankheiten verantwortlich sind. Die Nukleotidsequenz des murinen SLy1-Gens ist zu 89% identisch mit der des Menschen, die Homologie der Aminosäuresequenz beträgt 94% (Beer et al. 2001).

1.3.1 Die SLy-Proteinfamilie

SLy1 gehört gemeinsam mit SLy2 und SASH1 zu einer Familie hochhomologer Adapterproteine (Jaufmann et al. 2021). Ihnen gemeinsam sind ein nukleäres Lokalisationssignal, eine *Src homology 3* (SH3)- sowie eine *sterile α motif* (SAM)-Domäne (s. Abb. 3).

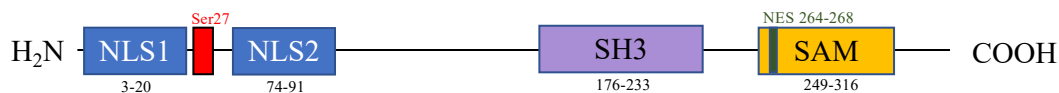


Abbildung 3. Das SLy1-Protein

Das SLy1-Protein weist wie die anderen Proteine der SLy-Familie die für Adapterproteine typische SH3- und eine SAM-Domäne auf. Das zweigeteilte nukleäre Lokalisationssignal erlaubt den intrazellulären Transport von SLy1. Auf TZR- sowie Notchsignal hin findet eine Phosphorylierung an Ser27 statt. Die Zahlen entsprechen den Aminosäuren-Lokalisationen. modifiziert nach Schäll 2015

SLy2 wird in hämatopoetischen Zellen sowie in Endothelzellen, Muskel, Herz, Gehirn, Lunge und Pankreas exprimiert. Es transloziert in Nukleus und Zytoplasma und interagiert mit 14-3-3-Proteinen (Brandt et al. 2010). SLy2 ist funktionell relevant für die Organisation des Zytoskeletts, die Regulation der B-Zell-Antwort und in der Krebsentwicklung (Jaufmann et al. 2021). Bei hepatozellulärem Karzinom, Magenkarzinom und multiplem Myelom können eine reduzierte SLy2-Expression beobachtet werden und teilweise mit einem verschlechterten Outcome assoziiert werden (Jaufmann et al. 2021).

SASH1 (auch SLy3 genannt) wird in vielen Geweben außer lymphatischen Zellen exprimiert. Wie SLy2 hat es eine Funktion in der Organisation des Zytoskeletts. Vor allem im Brust- und Darmkrebs kann eine Funktion von SASH1 als Tumorsuppressor beobachtet werden (Zeller et al. 2003; Rimkus et al. 2006). Eine reduzierte Expression sind mit einem verringerten Überleben und einer größeren Tumorgröße assoziiert (Jaufmann et al. 2021).

1.3.2 Proteinstruktur

SH3-Domänen haben vielfältige Funktionen und können unter anderem Protein-Protein-Interaktionen und daher die Bildung von Komplexen zur Signalübertragung beeinflussen (Kurochkina und Guha 2013). Durch die Kopplung von Downstream-Molekülen des Signalwegs mit Rezeptoren in der Zell-Membran können SAM-Domänen in der Zell-Zell-Signalübertragung medieren (Schultz et al. 1997). Wegen dieser Proteinstrukturen vermuteten Beer et al. (2001) eine Funktion von SLy1 in der Signalübertragung bei Immunreaktionen.

SLy1 besteht aus 380 Aminosäuren und besitzt neben der SH3- und SAM-Domäne am N-terminalen Ende ein zweigeteiltes nukleäres Lokalisationssignal und innerhalb der SAM-Domäne ein nukleäres Exportsignal (NES) (Beer et al. 2005) (s. Abb. 3). Kukuk et al. (2019) beschreiben eine Homodimerisierung der SAM-Domänen zweier SLy1-Moleküle. Die Bildung solcher Dimere ist bei Adapterproteinen bekannt und erlaubt ihnen über eine größere Fläche andere Proteine zu binden. Als Interaktionspartner von SLy1 sind 14-3-3-Proteine beschrieben, welche ebenfalls Dimere bilden können (Schäll et al. 2015). Hier wäre eine Interaktion zwischen einem SLy1-Dimer und einem 14-3-3-Dimer möglich (Kukuk et al. 2019).

Das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) (s. Abb. 3) ermöglicht SLy1 das Einwandern in den Nukleus. Bei Deletion des C-terminalen Anteils dieser Sequenz kann SLy1 nicht mehr im Nukleus dargestellt werden (Beer et al. 2005).

Die Phosphorylierung von SLy1 an der Aminosäure Ser27 erfolgt in peripheren T-Zellen auf T-Zell-Rezeptor (TZR)-Stimulation hin (Astoul et al. 2003). Allerdings kann phosphoryliertes SLy1 ebenfalls in zur Bildung des präTZR unfähigen Rag1^{-/-}-DN3 und DN4 Thymozyten detektiert werden, woraus das Vorhandensein einer TZR-unabhängigen Funktion in frühen Thymozytenstufen geschlussfolgert wird (Reis et al. 2009). In präTZR-defizienten Rag1^{KO} Thymozyten wird SLy1 auf ein Notch-Signal hin phosphoryliert, während es in Thymozyten mit präTZR (Rag1^{WT}) auf ein Notch-Signal hin zu einer Reduktion der SLy1-Phosphorylierung kommt (Reis et al. 2009). Reis et al. interpretieren dies als eine integrative Funktion von SLy1 in Thymozyten im Notch- und präTZR-Signalweg als Folge der β -Selektion, die die vorzeitige Apoptose in sich entwickelnden Thymozyten verhindern könnte.

1.3.3 Funktion in Immunzellen

SLy1 ist ein Lymphozyten-spezifisches Protein. SLy1-mRNA kann in Mäusen vor allem in den Lymphorganen Thymus, Lymphknoten, Peyer'sche Plaques, Knochenmark und in der weißen Pulpa der Milz gefunden werden (Beer et al. 2001).

Ein Maus-Modell mit Teildeletion des SLy1-Proteins (SLy1^Δ), dem die Phosphorylierungsstelle Ser27, sowie die zweite NLS fehlt (Beer et al. 2005), sowie Mäuse mit vollständig entferntem SLy1-Protein (SLy1^{KO}) (Reis et al. 2009) zeigen funktionelle Auswirkungen durch den Verlust von SLy1 auf das Immunsystem. Diese Veränderungen führen zu phänotypischen Veränderungen im Maus-Organismus wie der vollständige Knockout, wodurch von einer Hauptfunktion von SLy1 mit Translokation in den Nukleus ausgegangen werden kann (Beer et al. 2005; Reis et al. 2009).

Die SLy1^{Δ/Δ}-Mäuse entwickeln ein geschwächtes Immunsystem im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern, wodurch sie eine verlängerte Akzeptanz von Allotransplantaten und somit ein funktionelles Defizit zeigen (Beer et al. 2005). Grund für die beobachtete Schwäche des Immunsystems sind Funktionsstörungen der B-, T- und NK-Zellen bei SLy1-Defizienz. Bei der in-vitro-Untersuchung von Thymozyten und peripheren Lymphozyten aus SLy1^{Δ/Δ}-Mäusen haben Beer et al. (2005) gezeigt, dass die CD4-T-Zell-Entwicklung, die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion, sowie die Entwicklung und Proliferation der Marginalzonen-B-Zellen und der humoralen Immunantwort von SLy1 abhängig sind.

Die SLy1-Defizienz wirkt hemmend auf die T-Zell-Entwicklung und reduziert die Progression von DN zu DP Thymozyten (Reis et al. 2009). Die Zellzahlen in Thymus, Milz und Lymphknoten sind in SLy1^{KO}-Mäusen um 42-51% reduziert. Der relative Anteil der DN Thymozyten an den Gesamtthymozyten ist erhöht, der Anteil der DP Thymozyten reduziert. Auch innerhalb der DN-Stufen gibt es Unterschiede bei der Entwicklung in SLy1^{KO}- und WT-Tieren, wie erhöhte Anteile von Zellen im DN2 und DN3 Stadium, bei einem verringerten Anteil an Zellen im DN1 und DN4 Stadium zeigen (Reis et al. 2009).

In SLy1^{KO}-Mäusen wird außerdem eine reduzierte T-Zell-Immunantwort sichtbar, wie Schäll et al. (2015) mit einer *Listeria monocytogenes*-Infektion zeigen konnten, die bei SLy1-Knockout-Tieren häufiger letal ist als bei WT-Tieren. Das angeborene Immunsystem ist nicht durch den SLy1-Knockout eingeschränkt. In T-Zellen wurde jedoch nach Infektion eine reduzierte Proliferation von CD4- und CD8-T-Zellen beobachtet (Schäll et al. 2015).

Die peripheren SLy1^{KO}-T-Zellen zeigen eine reduzierte Proliferation durch Zellzyklusinhibition. Sie exprimieren mehr *p27*- und *p130* als WT-T-Zellen und verharren bei Stimulation in der S-Phase des Zellzyklus (Schäll et al. 2015).

Auch SLy1^{KO}-NK-Zellen sind in ihrer Funktion eingeschränkt. Sie sind *in vitro* weniger

effizient in der Bekämpfung von Tumorzellen und weisen *in vivo* eine erhöhte Tumorlast auf (Arefanian et al. 2016). Dies konnte mit einer reduzierten ribosomalen Stabilität bei SLy1-Defizienz assoziiert werden.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Entwicklung von T-Zellen ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signalwege und Interaktionspartner im Umfeld der heranreifenden Thymozyten. Das Adapter-Protein SLy1 ist als ein unverzichtbarer Faktor für die physiologische Entwicklung der Thymozyten und das effektive Funktionieren des Immunsystems bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, im Mausmodell mit dem Vergleich von SLy1^{KO}- und WT-Mäusen auf Proteinebene die Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf den p53-Signalweg in Thymozyten und peripheren T-Zellen genauer zu charakterisieren. Dazu soll die Phosphorylierung der Proteine im DDR-Signalweg, p53 und Mdm2 untersucht werden. Des Weiteren sollen Expression und Phosphorylierung der dem durch den SLy1^{KO} beeinträchtigten IL-7R-Signalweg angehörigen Proteine Jak1 und Jak3 auf eine Veränderung in den SLy1^{KO}-Thymozyten untersucht werden. Um Veränderungen Downstream von p53 aufzudecken, soll die mRNA-Expression der pro-apoptischen Gene Noxa und PUMA in Thymozyten und T-Zellen untersucht werden.

Darüber hinaus soll die Bedeutung des p53-Signalwegs für die SLy1-Funktion in einem Mausmodell mit T-Zell-spezifischer p53-Deletion untersucht werden. Hier soll geprüft werden, ob die durch den SLy1-Knockout ausgelösten Beeinträchtigungen der T-Zell-Entwicklung p53 als Effektorprotein benötigen oder auch unabhängig vom p53-Signalweg ausgelöst werden. Außerdem soll in diesem Mausmodell untersucht werden, ob das Risiko für eine Tumorentwicklung der Thymozyten und T-Zellen mit Hintergrund einer p53-Defizienz durch das Vorliegen oder Fehlen von SLy1 beeinflusst wird. Hierdurch soll die Hypothese überprüft werden, ob es sich bei SLy1, um ein Onkogen handelt, dessen Wirkung im prädisponierten Umfeld das Entstehen von Tumoren begünstigt.

2

Methoden und Materialien

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Puffer

Für die Durchführung der Versuche wurden verschiedene Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kits verwendet. Diese sind in den Tabellen 2 und 3 zu finden. Angaben zu den verwendeten Antikörpern und Primern sind in den jeweiligen Abschnitten zu finden.

Tabelle 2. Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences
LightCycler 480 II	Roche
Nano Photometer	Implem
VersaDoc	Bio-Rad Laboratories

Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien und Kits

Diese Materialien wurden zur Durchführung der Versuche genutzt.

Materialien / Kits	Verwendung	Hersteller
BSA	Verdünnung WB-Antikörper	Sigma-Aldrich
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	cDNA-Synthese	Applied Biosystems
Milchpulver	Verdünnung WB-Antikörper	Roth
PBS	Puffer für Zellsuspensionen	Sigma-Aldrich
Bio-Rad DC™ Protein Assay	Proteinbestimmung	Bio-Rad
SYBR	qPCR Master Mix	Bioline
WeStar SuperNova	Western Blot Detektion	Cyanagen
ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution	Western Blot Stripping	Millipore
Roti-Load 1, 4x konzentriert	Western Blot Probenpuffer	Roth

2. Methoden und Materialien

Tabelle 4. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die Vorbereitung von Proben und die Durchführung von Western Blots

Puffer	Zusammensetzung	
Erythrozytenlysepuffer	0,155M	NH ₄ Cl
	0,01M	KHCO ₃
	10,1mM	EDTA
MACS-Puffer	500ml	PBS
	0,5% (w/v)	BSA
	2,5mM	EDTA
NP40-Proteinlysepuffer	1%	NP40
	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
	1x	Proteinaseinhibitor
	1x	Phosphataseinhibitor pH 7,4
4x Sammelgelpuffer	0,5M	Tris/HCl pH 6,8
Sammelgel (5%)	1,875ml	Acrylamid Gel 30
	6,25ml	4x Sammelgelpuffer
	0,125ml	20% SDS
	4,118ml	ddH ₂ O
	0,0075ml	TEMED
	0,1ml	12,5%APS
4x Trenngelpuffer	1,5M	Tris/HCl pH 8,8
Trenngel (10%)	8,33ml	Acrylamid Gel 30
	6,25ml	4x Sammelgelpuffer
	0,125ml	20% SDS
	10,03ml	ddH ₂ O
	0,0125ml	TEMED
	0,2ml	12,5%APS
Tris-Glycin-SDS-Lauf-Puffer	2,5 mM	Tris
	19,2mM	Glycin
	0,1% (v/v)	SDS
		pH 8,3
Transferpuffer	100ml	Methanol absolut
	2,5mM	Tris
	19,2mM	Glycin
	800ml	ddH ₂ O
		pH 8,3
TBS/T	50mM	Tris
	150mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Tween20
Milch- bzw. BSA-Lösung	5% (w/v)	fettfreies (nf) Milchpulver bzw. BSA
	1000ml	TBS/T

2.2 Tierversuche

2.2.1 Tierzucht und -haltung

Alle Proben für die Versuche wurden Mäusen entnommen, die im spezifisch pathogenfreien Bereich der Tierhaltung Pharmakologie/Toxikologie der Medizinischen Fakultät Tübingen gezüchtet und gehalten werden. Hier wird ein zwölfständiger Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten und die Tiere haben freien Zugang zu Futter und Wasser. Der Nachwuchs wurde mit drei bis vier Wochen von den Eltern getrennt und ab dem Alter von acht Wochen verpaart. Durch die Verwendung heterozygoter Tiere zur Zucht, werden verschiedene Genotypen innerhalb eines Wurfs geboren. Im Alter von ca. drei Wochen wurden die Tiere mit Ohrlochmarkierungen versehen und diese Ohrbiopsate wurden zur Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Post mortem wurde die Genotypisierung zur Kontrolle an einer Schwanzbiopsie wiederholt. Die zum Versuch eingesetzten Tiere waren zwischen acht und 50 Wochen alt.

Sämtliche Tierexperimente erfolgten laut den Tierversuchangaben und wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Anzeige vom 26.04.2018).

2.2.2 Mausmodelle

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mausmodelle verwendet. Beide gehen auf C57BL/6N-Mäuse von Jackson Laboratories zurück.

SLy1^{KO}

Die Tiere dieses Stamms kennzeichnen sich durch einen Knockout des in Abschnitt 1.3 beschriebenen SLy1-Gens. Dieser wurde zuvor von Reis et al. (2009) beschrieben. Durch die Lokalisation des SLy1-Gens auf dem X-Chromosom entstehen bei der Zucht Wildtyp (SLy1^{WT})- und Knockout (SLy1^{KO})-Männchen, sowie SLy1^{WT}-, SLy1^{KO}- und heterozygote (SLy1^{het})-Weibchen.

T-Zell-spezifische p53-Defizienz

Zur Erforschung der wechselseitigen Wirkung von p53 und SLy1 auf die Entwicklung der Immunzellen, wurde ein weiteres Mausmodell mit T-Zell-spezifischer p53-Deletion und gleichzeitigem SLy1-Knockout genutzt. Diese Genetik wurde erzielt, indem im Labor Beer-Hammer Tiere mit einem von loxP-Stellen flankierten p53 Gen (p53^{fl/fl}) (Marino et al. 2000) mit Tieren mit rekombinanter Lck-gekoppelter Cre-Rekombinase (Lck^{+tg}) (Orban

et al. 1992) gekreuzt wurden. Anschließend wurden diese mit SLy1 heterozygoten Tieren gekreuzt, so dass Tiere mit rekombinanter p53-Deletion in T-Zellen und T-Zell-Vorläufern bei gleichzeitigem SLy1-Knockout geboren wurden (s. Abb. 4).

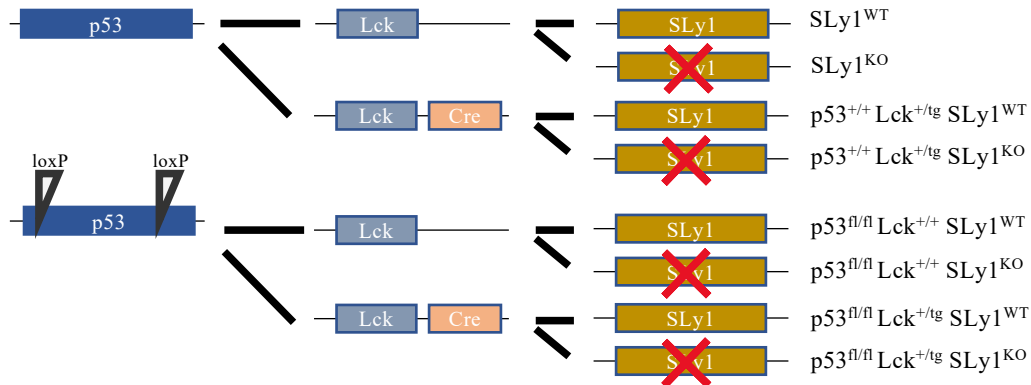


Abbildung 4. Die verwendeten Mausmodelle

Dargestellt sind die verschiedenen Genotypen, an denen Analysen der Zellpopulationen in den Immunorganen durchgeführt wurden. Die Lck-gekoppelte Cre-Rekombinase schneidet das p53-Gen an den loxP-Schnittstellen spezifisch in T-Zellen und ihren Vorläufern heraus. Dies wurde jeweils mit einem SLy1^{KO} und als Kontrolle mit einem SLy1^{WT} kombiniert.

Die in der rechten Spalte dargestellten Bezeichnungen entsprechen den in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen.

2.2.3 Tötung und Organentnahme

Die Tiere wurden mittels Isofluranbetäubung anästhesiert und mit anschließender zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die gewünschten Organe entnommen, in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) gelegt und weiterverarbeitet.

2.3 Zellisolation

Thymus, Milz und Lymphknoten wurden den Tieren entnommen und durch ein 70 µm Sieb gedrückt, um eine Einzellsuspension zu erhalten. Die Femuren wurden am proximalen und distalen Ende je so eröffnet, dass sie mit PBS durchspült werden konnten, um die Knochenmark-Zellen zu gewinnen.

Für die Versuche mit Durchflusszytometrie wurden die erythrozytenreichen Milz- und Knochenmark-Proben vor der Weiterverarbeitung je drei Minuten bei Raumtemperatur mit Erythrozytenlysepuffer (Tab. 4) behandelt. Dieser wurde mit kaltem PBS abgestoppt und die Zellen konnten nach einem Waschgang weiterverarbeitet werden. Wenn nachfolgend eine MACS-Isolation aus der Milz durchgeführt wurde, wurde keine Erythrozytenlyse durchgeführt.

2.3.1 Isolation peripherer T-Zellen aus der Milz per MACS

Um Analysen an den T-Zellen der Milz durchzuführen, wurden diese per magnetischer Zellsortierung (MACS) aufgereinigt. Die T-Zellen der Milz wurden gewonnen, indem die Splenozyten in MACS-Puffer (s. Tab. 4) gelöst wurden und mit CD90.2-Antikörper (s. Tab. 5) für 10 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden diese auf eine LS-Säule (s. Tab. 5) gegeben, so dass die magnetisch gebundenen CD90.2 Zellen zunächst gebunden wurden und anschließend abseits des Magneten aus der Säule gedrückt werden konnten.

Mit dieser Methode konnte eine per Durchflusszytometrie (APC-CD90.2 1:200 - Färbung) bestimmte Reinheit von ca. 85% erreicht werden.

Tabelle 5. MACS-Beads und -Säulen

Diese MACS-Materialien wurden zur Aufreinigung von DN Thymozyten aus dem Thymus und von T-Zellen aus der Milz benötigt.

Produktname	Hersteller	Bestellnummer
CD90.2 MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec	130-121-278
CD4 (TIL) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec	130-116-475
CD8a (Ly-2) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec	130-117-044
TZR $\gamma\delta$ + T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec	130-092-125
Anti-Ter119 MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec	130-049-901
LS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-401
LD Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-901

2.3.2 Isolation DN Thymozyten per MACS

Zur Isolation der DN Thymozyten wurden die Thymozyten zunächst mit dem TZR $\gamma\delta$ Isolation Kit und Anti-Ter119 (s. Tab. 5) für 5 Minuten inkubiert, bevor der Anti-Biotin-Antikörper hinzugegeben wurde und für weitere 15 Minuten inkubiert wurde. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300 rcf und Resuspension in MACS-Puffer wurden Erythrozyten, TZR $\gamma\delta$ -Zellen sowie CD11b- und CD45R-positive Zellen mit Hilfe einer LD-Säule (s. Tab. 5) depletiert. Die verbleibenden Zellen wurden nun für 15 Minuten mit CD4- und CD8a-Antikörper (s.Tab. 5) inkubiert, gewaschen und mit einer neuen LD-Säule aufgetrennt. Die Durchflussfraktion stellt die DN Thymozyten dar und erreichte eine per FACS (wie Tab. 12) gemessene Reinheit von ca. 83%.

2.4 Analyse der Noxa-, PUMA- und Mdm2-Expression auf mRNA-Ebene

Zur quantitativen Bestimmung des mRNA-Gehalts der Gene Noxa, PUMA und Mdm2 in den Thymozyten, DN und DP Vorstufen, sowie peripheren T-Zellen aus der Milz wurde eine quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) durchgeführt.

Das Prinzip ist eine temperaturgesteuerte Replikation von synthetisierter komplementärer DNA (cDNA) mit Primern, die die gewünschten Transkripte umfassen. Durch zyklisches Erwärmen der Proben auf 98°C und anschließendes Abkühlen auf 60°C (Tab. 6) trennen sich die Doppelstränge der cDNA, die Primer lagern sich an und werden mit den im Reagens enthaltenen fluoreszierenden Nukleotiden zu komplementären Strängen durch die ebenfalls enthaltene Polymerase verlängert.

Tabelle 6. LightCycler-Programm für die qPCR

Dargestellt ist das Temperaturprogramm des LightCyclers für die qPCR. Durch das zyklische Aufwärmen und Abkühlen trennen sich zunächst die Doppelstränge, anschließend können sich die Primer anlagern und zuletzt die Polymerase die Nukleotide anknüpfen.

Temperatur	Zeit
98°C	5 min
98°C - 60°C - 72°C	45 Zyklen zu je 10 sek
72°C	5 min

2.4.1 mRNA-Gewinnung

Die mRNA der Thymozyten, sowie der durch MACS isolierten (wie in Abschnitt 2.3) DN Thymozyten und peripheren T-Zellen wurden von Lena Gruber und Daniel Schäll gewonnen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die mRNA von per Flow Sorter isolierten DP Zellen wurde von Isabel Kloos gewonnen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Umschreibung von mRNA zu cDNA

Die cDNA wurde aus der mRNA mit dem Umschreibungs-kit „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ nach Anleitung des Herstellers Qiagen hergestellt. Um die geeignete Menge mRNA in der Reaktionslösung zu erreichen, wurde die Konzentration photometrisch mit dem NanoDrop bestimmt. Hier wurde außerdem das RNA-zu-Protein-Verhältnis bestimmt, um eine ausreichende Reinheit der Probe zu gewährleisten. Anschließend wurde

zur umgeschriebenen cDNA RNase-freies H₂O gegeben, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. Dies waren für die Thymozyten und peripheren T-Zellen 20 ng/μl und für die DN sowie DP Thymozyten 2 ng/μl.

2.4.3 Quantitative PCR

Der verwendete Reaktionsansatz für die qPCR besteht je Probe aus 5 μl 2xSYBR bioline, 0,4 μl 10 μM Primer je Richtung und 1,7 μl Wasser (7). Hierzu kommen 2,5 μl der cDNA-Probe. Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie die Zielgene Noxa, PUMA und Mdm2 umfassen (Tab. 8). Als Referenzgen wurde β-Aktin verwendet. Um eine relative Quantifizierung durchzuführen, wurde ein internes cDNA-Gemisch als Kalibrator verwendet und H₂O als Negativprobe zum Vergleich genommen. Um ein valides Ergebnis zu erhalten, wurde jede Probe zwei- bzw. dreifach pipettiert und die gleiche Anzahl an KO- und Kontrollproben innerhalb eines Versuchs untersucht.

Tabelle 7. Master Mix für die qPCR

Für jede Probe wurde je Gen ein Master Mix wie folgt hergestellt und zusammen mit 2,5 μl der cDNA-Probe in ein Well der qPCR-Platte gegeben.

Master Mix Ansatz für die qPCR, je Probe von 2,5 μl	
5 μl	2xSYBR bioline
0,4 μl	10 μM Primer right, bzw. forward
0,4 μl	10 μM Primer left, bzw. reverse
1,7 μl	RNase-freies H ₂ O

Tabelle 8. Primer für die qPCR

Dargestellt sind die verwendeten Primer für die untersuchten Gene Noxa, PUMA und Mdm2, sowie für das Referenzgen β-Aktin.

	right bzw. forward	left bzw. reverse
Noxa	5' - tga gca cac tcg tcc ttc aa - 3'	5' - cag atg cct ggg aag tcg - 3'
PUMA	5' - tac agc gga ggg cat cag - 3'	5' - ttc tcc gga gtg ttc atg c - 3'
Mdm2	5' - cat gga att ctg cct cgt g - 3'	5' - catggaattctgcctcgtg - 3'
β-Aktin	5' - aag gcc aac cgt gaa aag at -3'	5' - gtg gta cga cca gag gca tac -3'

2.5 Analyse von Protein-Expression und -Phosphorylierung per Western Blot

Für die Analyse auf Protein-Ebene wurden aus 12-Wochen-alten Mäusen Thymozyten gewonnen, sowie DN Thymozyten aus dem Thymus und periphere T-Zellen aus der Milz von 8- bis 12-Wochen-alten Mäusen per MACS (s. Abschnitt 2.3) isoliert.

Die Zellen wurden mit NP40-Lysepuffer lysiert und die Proteine mittels Western Blot elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden diese auf eine Membran übertragen und mit Hilfe von Antikörpern angefärbt. Um die Phosphorylierung zu untersuchen, wurde jeweils zuerst mit dem gegen das Phospho-Protein spezifische Antikörper und danach mit dem nicht-Phospho-spezifischen Antikörper das Protein detektiert. Für die Detektion von Mdm2 in Thymozyten wurde zuerst die Mdm2-Expression bestimmt und anschließend die Phospho-Mdm2-Expression untersucht.

2.5.1 Proteingewinnung

Um das Protein der Thymozyten zu gewinnen, wurden Zellen mit 10 µl NP40-Puffer je 10^7 Zellen unter Schutz durch einen Phosphatase- und Proteinase-Inhibitor (Tab. 4) lysiert. Bei Zugabe des Lysepuffers wurden die Zellen im Lysepuffer mehrfach durch 100 µl Pipettenspitzen pipettiert, um mit Scherkräften auf die Zellen einzuwirken. Anschließend wurden sie im Puffer 30 min auf Eis inkubiert, und mehrfach mit dem Vortex durchgeschüttelt. Zuletzt wurde die Lysemischung 10 Minuten bei 4°C mit 15.000 rcf zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Um gleiche Proteinmengen beim Western Blot erreichen zu können, wurde die Proteinkonzentration nach Lowry laut Herstellerprotokoll bestimmt. Eine Standardreihe mit BSA in Lysepuffer wurde angelegt und für die Bestimmung aller Proben genutzt. Alle Proben wurden doppelt bestimmt und der Mittelwert berechnet. Die Proteinkonzentrationen erreichten Werte zwischen 0,4 und 0,7 µg/µl.

2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

Zur Reduktion der Proteine und um eine Proteinmenge von 14 µg der Thymozyten- und T-Zell-Proben je Tasche im Western Blot zu erreichen, wurden die Proben nach dem Ergebnis der Proteinkonzentration mit Lysepuffer verdünnt und mit Laemmli-Puffer für zehn Minuten bei 95°C gekocht. Bei den Proben der DN Thymozyten wurde wegen der geringen Zellzahl auf die Proteinbestimmung verzichtet und jeweils das Lysatäquivalent von $750 \cdot 10^3$ Zellen pro Tasche geladen.

Alle Proben wurden in SDS-Gele (s. Tab. 4) aufgetragen und bei 90 V in ca. 20 Minuten gesammelt und anschließend bei 140 V in ca. 100 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt.

2.5.4 Western Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel 25 Minuten in kaltem Transferpuffer equilibriert. Dann wurde das Gel zusammen mit der zuvor in Transferpuffer getränkten Membran in den Transfertank eingespannt und dieser mit kaltem Transferpuffer gefüllt. Um eine ausreichend kühle Transferumgebung zu schaffen, wurde außerdem ein Eisblock in den Tank gegeben und der Tank als Ganzes in Eis gestellt. Die Transferdauer bei 100 V variierte je nach Größe der zu detektierenden Proteine und lag zwischen 60 und 120 Minuten. Um einen möglichst vollständigen Transfer im gewünschten Größenbereich zu prüfen, wurde das Gel mit einer Coomassie- und die Membran mit einer Ponceau S-Lösung angefärbt.

Um die Membran auf die Inkubation mit den Antikörpern vorzubereiten, wurde sie für 60 Minuten unter leichtem Schütteln mit 5% fettfreier (nf) Milch-Lösung (s. Tab. 4) blockiert.

2.5.5 Antikörperfärbung und Entwicklung

Die Nitrocellulosemembranen wurden über Nacht bei 4°C unter ständigem Rollen mit dem ersten Primärantikörper inkubiert. Zunächst wurde der Phospho-Antikörper genutzt, da sich dieser anschließend besser von der Membran stripfen ließ. Die verwendeten Antikörper wurden von verschiedenen Herstellern bezogen und sind in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9. Western Blot: Primäre Antikörper

Mit diesen primären Antikörpern wurden die Membranen über Nacht inkubiert.

Antigen	Konz.	gelöst in	Ursprung	Hersteller	Bezeichnung
ATM	1:1000	5% nf Milch	Rabbit	Cell Signaling Technology	2873
Phospho-ATM	1:1000	5% BSA	Mouse	ThermoFisher	MA1-2020
ATR	1:1000	5% nf Milch	Rabbit	Cell Signaling Technology	13934
Phospho-ATR	1:1000	5% BSA	Rabbit	Cell Signaling Technology	2853
Chk1	1:1000	5% nf Milch	Mouse	Cell Signaling Technology	2360
Phospho-Chk1	1:1000	5% BSA	Rabbit	Cell Signaling Technology	12302
Chk2	1:1000	5% nf Milch	Rabbit	Cell Signaling Technology	2662S
Phospho-Chk2	1:1000	5% BSA	Rabbit	ThermoFisher	MA5-27988
p53	1:1000	5% nf Milch	Mouse	Cell Signaling Technology	2524
Phospho-p53	1:1000	5% nf Milch	Rabbit	Cell Signaling Technology	12571
Mdm2 (in T-Zellen)	1:8000	5% nf Milch	HRP-linked	Santa Cruz Biotechnology	965
Mdm2 (in Thymozyten)	1:1000	5% nf Milch	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	13161
Phospho-Mdm2	1:1000	5% BSA	Rabbit	Cell Signaling Technology	3521
Jak1	1:1000	5% BSA	Rabbit	Cell Signaling Technology	3344
Phospho-Jak1	1:1000	5% BSA	Rabbit	Cell Signaling Technology	74129
Jak3	1:1000	5% BSA	Rabbit	Cell Signaling Technology	8827
Phospho-Jak3	1:1000	5% BSA	Rabbit	Cell Signaling Technology	5031
β-Aktin	1:10000	5% nf Milch	Rabbit	abcam	ab8227

Anschließend wurden die Membranen drei mal fünf Minuten unter Schütteln in TBS/T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Tab. 10) eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert. Dann wurde ein weiteres Mal drei Mal fünf Minuten in TBS/T gewaschen.

Tabelle 10. Western Blot: Sekundäre Antikörper

Mit diesen sekundären Antikörpern wurden die Membranen für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Antigen	Konz.	gelöst in	Hersteller	Bezeichnung
Rabbit	1:2000	5% nf Milch	Cell Signaling Technology	7074
Mouse	1:2000	5% nf Milch	EasyBlot	GTX221667-01

Zur Entwicklung der Membranen wurden diese 60 Sekunden mit einem ECL-Reagenz inkubiert und mit dem VersaDoc detektiert.

Die Membran wurde nach 15-minütigem starkem Schütteln in Stripping-Lösung, 10 minütigem Waschen in TBS/T und 60 Minuten erneuten Blockens in Milch-Lösung mit dem nicht-Phospho-spezifischen Antikörper inkubiert. Bei verschiedenen Ursprüngen des Phospho- und des Gesamtprotein-Antikörpers wurde zu diesem Zeitpunkt als Strippingkontrolle erneut mit gleichem Vorgehen wie zuvor beschrieben entwickelt. Bei gleichem Ursprung der beiden Antikörper wurde erneut 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer in Sekundärantikörper inkubiert bevor die Strippingkontrolle durchgeführt wurde.

Nach dem nächtlichen Inkubieren des zweiten Primärantikörpers wurden die gleichen Schritte wie zuvor beschrieben unternommen, um das Protein zu detektieren.

Der Membranabschnitt, auf dem sich das als Ladekontrolle befindliche β -Aktin befindet, wurde wenn möglich direkt zu Beginn abgetrennt und mit dem entsprechenden Antikörper (s. Tab. 9) inkubiert. Wenn dies nicht möglich war, da die Zielproteine eine ähnliche Größe hatten, wurde die Membran nach dem Entwickeln des Zielproteins ohne weiteres Strippen mit dem β -Aktin-Antikörper inkubiert und am nächsten Tag wie oben beschrieben entwickelt.

2.6 Quantitative Bestimmung der Zellpopulation in lymphatischen Organen

Um den Einfluss von SLy1 bei depletiertem p53 zu untersuchen, wurde 10-, 25- und 50-Wochen-alten Mäusen post mortem der Thymus, die Milz und die inguinalen Lymphknoten beidseits entnommen. Es wurden sowohl die absoluten Zellzahlen des Gesamtorgans, als auch die Anteile verschiedener Populationen mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie bestimmt.

2.6.1 Zellisolation und -zählung

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.3 beschrieben isoliert und anschließend in einer Neubauer-Kammer gezählt. Milz und Thymusproben wurden in 10 ml PBS gelöst und im Verhältnis 1:10 mit in PBS gelöstem Trypanblau gemischt. Die Lymphknotenproben wurden in 500 µl PBS gemischt und im Verhältnis 1:2 mit in PBS gelöstem Trypanblau versetzt. Anschließend erfolgte die Zählung in der Zählkammer.

2.6.2 Färbung mit Fluorophor-konjugierten Antikörpern

Für die Antikörperfärbung wurden der Zellsuspension jedes Organs je Färbepanel ein beziehungsweise zwei Millionen Zellen entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und Milz- und Lymphknoten-Zellen wurden in Fc-Block (CD16/32-Antikörper 1:25, Bio-Legend 101321) resuspendiert und 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden die T1-Proben mit der Biotin-Färbung (Tab. 11) inkubiert und nach 15 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden alle Proben mit ihren jeweiligen Farbmischungen (s. Tab. 11, 12 und 13,) auf Eis 30 min lang inkubiert, bevor sie zuletzt mit PBS gewaschen, zentrifugiert, abgesaugt und in 200 µl PBS resuspendiert wurden.

2.6.3 Datenaufnahme mit dem Durchflusszytometer

Die Proben wurden direkt vor dem Einlesen am Durchflusszytometer mit dem Vortex geschüttelt, um eine homogene Verteilung zu erreichen. Je nach Größe der gesuchten Population wurden unterschiedlich viele Events am Durchflusszytometer eingelesen. Für die beiden Thymozytenproben waren dies jeweils 100.000 Events, bei den LK- und Milzproben 20.000 Events.

Tabelle 11. Antikörper-Panel Thymus 1 (DN1-4)

Die Zellen wurden mit 50 µl der angegebenen Biotinfärbung inkubiert und dann nach dem Waschen 30 Minuten mit der Färbung für CD44, CD25 und CD90.2, sowie dem Biotin-bindenden Streptavidin-Antikörper inkubiert. Das Ziel ist, mit dieser Färbung die DN-Vorstufen darzustellen.

Antigen	Konjugat	Konzentration	Hersteller	Bezeichnung
CD44	V450	1:200	BD Pharmingen	560452
CD25	PE	1:200	BD Pharmingen	558642
CD90.2	APC	1:1000	BD Pharmingen	553007
Streptavidin	PerCP-Cy5.5	1:200	BD Pharmingen	551419
CD4	Biotin	1:1000	BD Pharmingen	553044
CD8a	Biotin	1:800	BD Pharmingen	553028
TZRγδ	Biotin	1:400	BD Pharmingen	553176

Tabelle 12. Antikörper-Panel Thymus 2 (DN, DP, SP)

Die Zellen wurden 30 Minuten lang mit 50 µl der Färbung im Dunkeln inkubiert. Das Ziel dieser Färbung ist es zwischen DN, DP, CD4⁺ und CD8⁺ SP Zellen zu unterscheiden.

Antigen	Konjugat	Konzentration	Hersteller	Bezeichnung
CD4	Pacific Blue	1:500	BD Pharmingen	558107
CD8a	PerCP-Cy5.5	1:100	BD Pharmingen	551162
TZRγδ	PE	1:100	BD Pharmingen	553178
CD90.2	APC	1:800	BD Pharmingen	553007

Tabelle 13. Antikörper-Panel Lymphknoten und Milz

Die Zellen wurden nach einem 15-minütigen Fc-Block 30 Minuten lang mit 50 µl der Färbung im Dunkeln inkubiert. Das Ziel der Färbung ist es, CD19⁺-B-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zu unterscheiden.

Antigen	Konjugat	Konzentration	Hersteller	Bezeichnung
CD19	V450	1:300	BD Horizon	560376
CD4	PE	1:200	BD Pharmingen	553049
CD8a	PerCP-Cy5.5	1:100	BD Pharmingen	551162
CD90.2	APC	1:100	BD Pharmingen	553007

2.6.4 Gatingstrategie

Thymus-Färbung 1 (DN1-4)

Mit der ersten Thymus-Färbung (s. Tab. 11) wurden die Stufen der DN Thymozyten DN1-DN4 identifiziert. Zunächst wurde aus einem Lymphozytengate ein Gating auf Einzelzellen durchgeführt. Anschließend wurden CD90⁺-Zellen und im vierten Schritt Streptavidin-negative Zellen ausgewählt. Über eine Biotin-Färbung wurden zuvor CD4⁺-, CD8⁺- und TZR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen gebunden. Die verbleibenden DN Thymozyten wurden nun entsprechend ihrer CD25- und CD44-Expression aufgetrennt (s. Abb. 5).

Für alle verwendeten Antikörper wurde eine Fluorescence minus one (FMO)-Färbung durchgeführt um Gategrenzen setzen zu können.

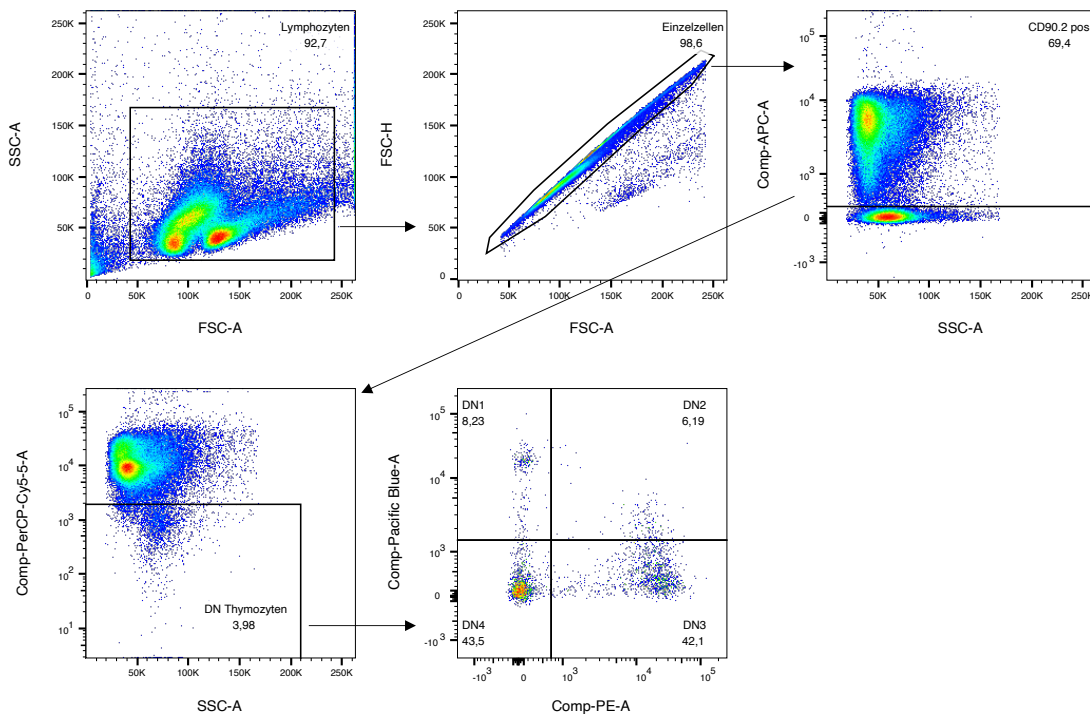


Abbildung 5. Gatingstrategie DN Thymozyten

Die Lymphozyten wurden zunächst nach ihrem Vorliegen als Einzelzelle, dann nach CD90-Expression und fehlender Expression von CD4, CD8 und TZR $\gamma\delta$ ausgewählt und anschließend nach Expression von CD25 und CD44 aufgetrennt.

Thymus-Färbung 2 (DN, DP, SP)

Zur Bestimmung der Anteile von DN, DP und SP Thymozyten in den untersuchten Thymi wurden zunächst Einzelzellen aus einem Lymphozytengate bestimmt und nachfolgend die CD90⁺TCR $\gamma\delta$ ⁻-Zellen (entsprechend Abb. 6 Q1) ausgewählt. Diese wurden anschließend nach Expression von CD4- und CD8-Rezeptoren aufgegliedert (s. Abb. 6). In dieser Färbung wurden für die CD90- und TCR $\gamma\delta$ -Antikörper FMO-Färbungen durchgeführt.

Aus den aufgenommenen Daten wurden ebenfalls die durchschnittlichen SSC- und FSC-Werte der Lymphozyten ausgewertet.

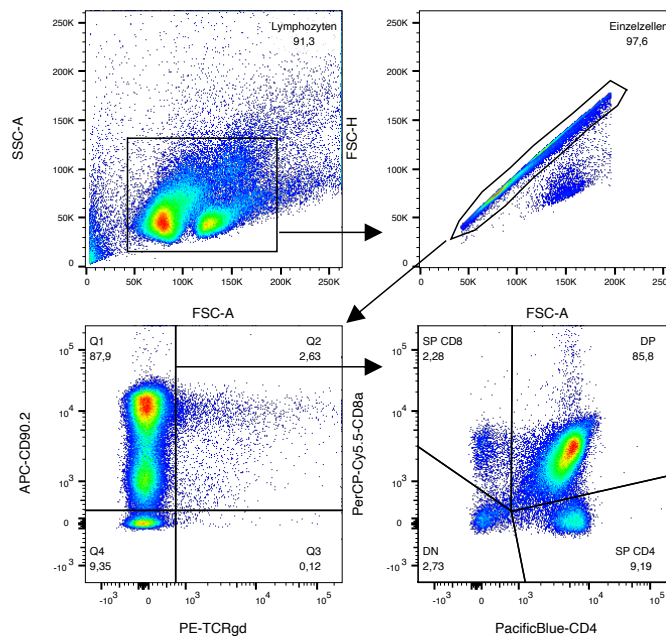


Abbildung 6. Gatingstrategie Thymozyten

Um die Aufteilung in DN, DP, CD4⁺ und CD8⁺ Thymozyten durchzuführen, wurden Lymphozyten des Thymus zunächst auf ihr Vorliegen als Einzelzelle geprüft und nach Expression von CD90 und fehlender Expression von TCR $\gamma\delta$ (Population Q1) ausgewählt. Die verbliebenen Thymozyten wurden je nach Expression von CD4 und CD8 in die vier Populationen aufgetrennt.

LN- und Milz-Färbung

Bei den durchflusszytometrisch bestimmten Daten zu Zellen aus der Milz und den inguinalen Lymphknoten wurden zunächst aus einem Lymphozytengate die Einzelzellen bestimmt (s. Abb. 7). Anschließend wurden diese je nach Expression von CD19- und CD90-Rezeptoren in B- und T-Zellen aufgegliedert. Bei den T-Zellen wurde anschließend zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterschieden.

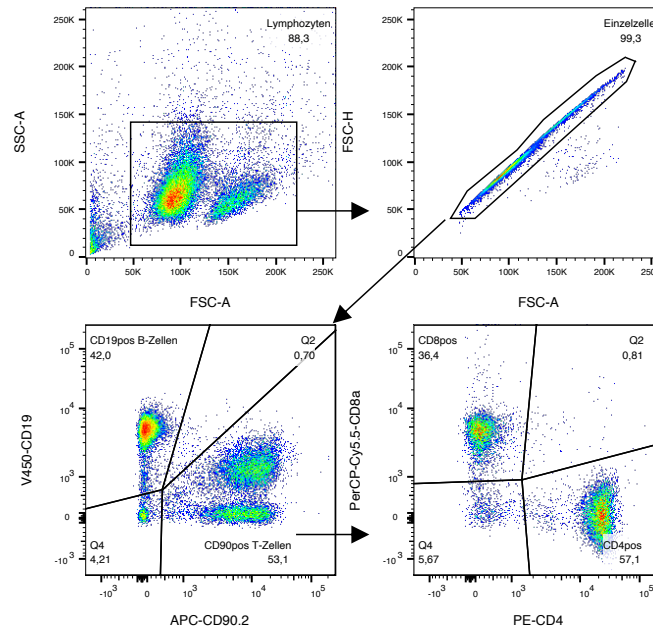


Abbildung 7. Gatingstrategie Lymphozyten in Lymphknoten und Milz

Die Einzelzellen der Lymphozyten in Lymphknoten und Milz wurden je nach Expression von CD19 und CD90 ihrer Zugehörigkeit zu B- oder T-Zellen zugeordnet. Die CD90⁺-T-Zellen wurden anschließend je nach Expression von CD4 und CD8 sortiert.

2.7 Statistische Auswertung und Darstellung

Die statistische Auswertung und Darstellung erfolgte mit der GraphPad Prism 9 Software. Für die Gruppenvergleiche wurden normalverteilte Ergebnisse angenommen und mittels ungepaartem t-Test verglichen. Bei der Analyse der Überlebenskurven wurden je zwei Kurven mit Hilfe des Log-Rank (Mantel-Cox)-Tests verglichen. Nähere Angaben hierzu finden sich bei den einzelnen Abbildungen.

Weitere Abbildungen wurden mit ImageLab, FlowJo und Powerpoint erstellt.

3

Ergebnisse

3.1 Analyse von Expression und Phosphorylierung der Kinasen Jak1 und Jak3 des IL-7R-Signalwegs

Aus Vorarbeiten ist eine Überexpression des IL-7-Rezeptors und von phosphoryliertem Stat5 in SLy1^{KO}-Thymozyten bekannt (Kloos 2021). Der IL-7R-Signalweg ist verantwortlich für die Regulation von Proliferation, Überleben und Differenzierung in Thymozyten. Die beiden Tyrosinkinasen Jak1 und Jak3 werden als Reaktion auf eine Aktivierung des IL-7-Rezeptors in räumliche Nähe gebracht, phosphorylieren sich gegenseitig und führen so über eine Phosphorylierung des Rezeptors zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat5.

Um zu untersuchen, ob das Vorliegen oder Aktivieren der durch den IL-7-Rezeptor rekrutierten Tyrosinkinasen Jak1 und Jak3 durch das Fehlen von SLy1 verändert werden, wurden sowohl mit Thymozyten als auch mit DN Thymozyten Immunoblots durchgeführt, um die Expression und Phosphorylierung der Tyrosinkinasen zu prüfen. Hierzu wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, zuerst mit dem Antikörper gegen das phosphorylierte Protein und anschließend mit dem Antikörper gegen das Gesamtprotein inkubiert. Für Jak1 wurden die Phosphorylierungsstellen Tyr1034/1035 und für Jak3 die Phosphorylierung an Tyr980/981 untersucht. Als Ladekontrolle diente stets β -Aktin. Um die Vergleichbarkeit einzelner Blots herzustellen, wurden alle Werte auf einen durchschnittlichen blotinternen Wildtyp normalisiert.

3.1.1 Jak1 und Jak3 in Thymozyten

Jak1

Bei der Analyse von Proteinexpression und -Phosphorylierung der Kinase Jak1 des IL-7-Rezeptor-Signalwegs in Thymozyten fällt eine um den Faktor 1,6 erhöhte Expression bei nicht signifikant veränderter Phosphorylierung auf (s. Abb. 8). Beim Vergleich der

Phospho-Jak1-Expression von SLy1^{KO}- und WT-Thymozyten bezogen auf β -Aktin zeigt sich eine Tendenz zu einer erhöhten Expression mit dem Faktor 1,4 (s. Tab. 14).

Die SLy1-Defizienz führt also zu einer erhöhten Proteinexpression der Kinase Jak1 bei gleichbleibender Phosphorylierung.

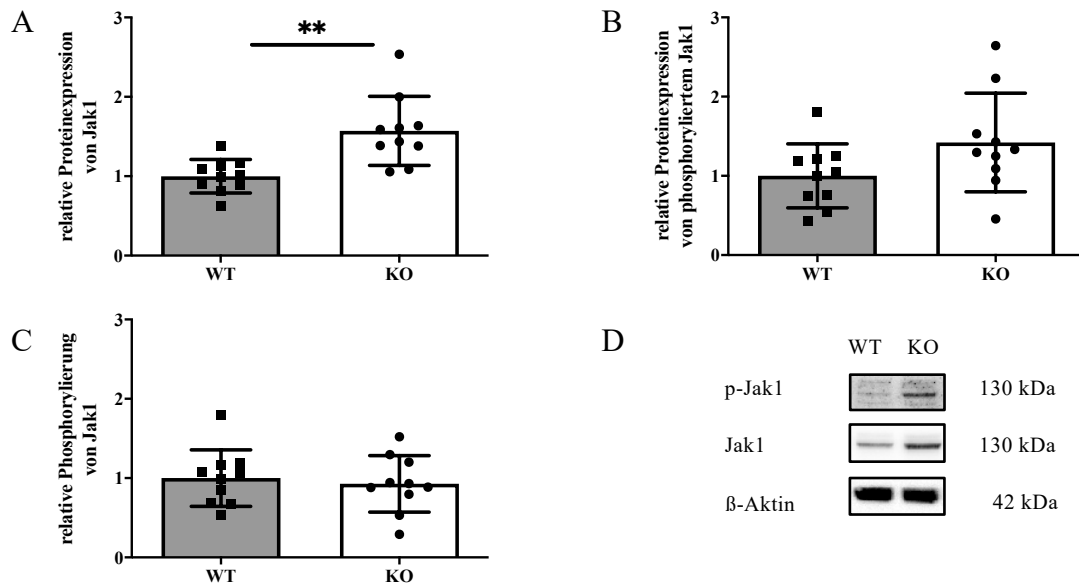


Abbildung 8. Expression und Phosphorylierung von Jak1 in Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von Jak1 bezogen auf β -Aktin.

(B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Jak1 bezogen auf β -Aktin.

(C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Jak1 bezogen auf Jak1.

(D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Jak1. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-Jak1 300 sek, Jak1 10 sek, β -Aktin 1 sek.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=10 Mäusen, ungepaarter t-Test, **p<0,001.

Jak3

Bei der Analyse der Jak3-Expression und -Phosphorylierung zeichnet sich ab, dass das Protein in SLy1^{KO}- und WT-Thymozyten in ähnlicher Menge vorliegt, allerdings in geringerem Ausmaß phosphoryliert ist. Wie Abbildung 9 zeigt und in Tabelle 14 dargestellt ist, ist die Expression von phosphoryliertem Jak3 bezogen auf β -Aktin um den Faktor 1,3 reduziert und bezogen auf unphosphoryliertes Jak3 um den Faktor 1,5 reduziert.

3. Ergebnisse

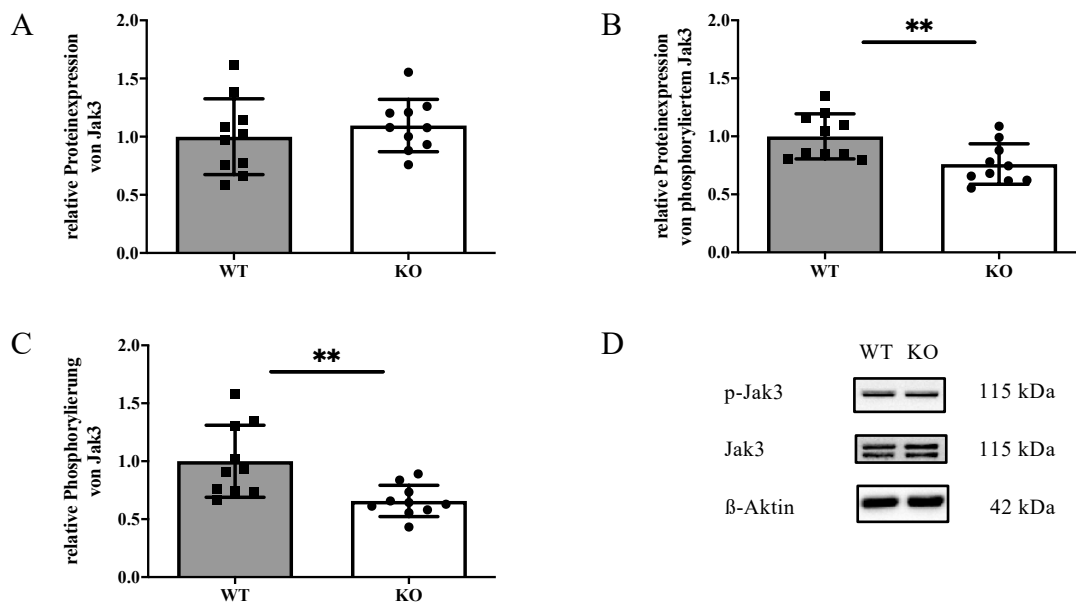


Abbildung 9. Expression und Phosphorylierung von Jak3 in Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von Jak3 bezogen auf β -Aktin.

(B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Jak3 bezogen auf β -Aktin.

(C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Jak3 bezogen auf Jak3.

(D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Jak3. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-Jak3 20 sek, Jak3 60 sek, β -Aktin 1 sek.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=10 Mäusen, ungepaarter t-Test, **p<0,001.

Tabelle 14. Expression und Phosphorylierung von Jak1 und Jak3 in Thymozyten

Ergebnisse der Analyse von Expression und Phosphorylierung der Kinasen Jak1 und Jak3 des IL-7-Rezeptor-Signalwegs per Immunoblot. Signifikanz wird angenommen bei *p<0,05 bzw. **p<0,01.

Protein / Bezugsprotein	Stichprobengröße	WT: Mittelwert \pm SD	KO: Mittelwert \pm SD	p-Wert
Jak1 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,21	1,572 \pm 0,44	0,0015
Phospho-Jak1 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,40	1,420 \pm 0,62	0,0897
Phospho-Jak1 / Jak1	10	1,000 \pm 0,36	0,928 \pm 0,36	0,6568
Jak3 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,33	1,096 \pm 0,23	0,4556
Phospho-Jak3 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,19	0,762 \pm 0,17	0,0098
Phospho-Jak3 / Jak3	10	1,000 \pm 0,31	0,658 \pm 0,13	0,0050

3.1.2 Jak1 und Jak3 in DN Thymozyten

Beim Vergleich der unreifen DN Thymozyten mit und ohne SLy1-Knockout zeigten sich die Unterschiede, die beim Vergleich der Thymozyten aufgefallen sind, nicht mehr. Wie in den Abbildungen 10 und 11 und der Tabelle 15 erkenntlich ist, gibt es im Bezug auf die Expression und Phosphorylierung der beiden IL-7-Rezeptor-Kinasen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

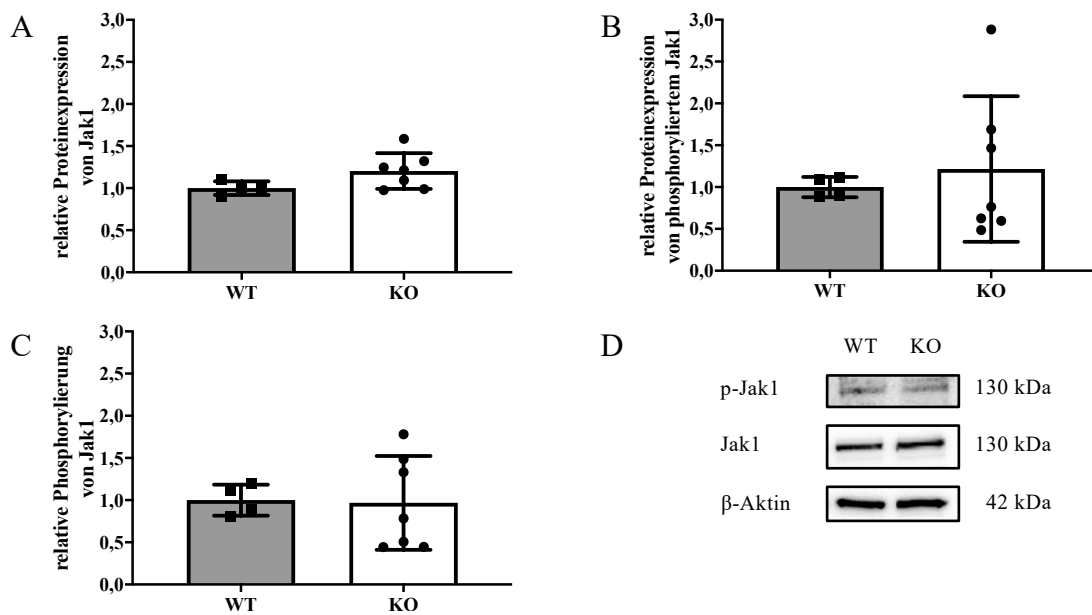


Abbildung 10. Expression und Phosphorylierung von Jak1 in DN Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von Jak1 bezogen auf β -Aktin.
 (B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Jak1 bezogen auf β -Aktin.
 (C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Jak1 bezogen auf Jak1.
 (D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Jak1. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-Jak1 300 sek, Jak1 30 sek, β -Aktin 1 sek.
 Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=4 WT-Proben und n=7 KO-Proben gepoolt von je n=8 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,01.

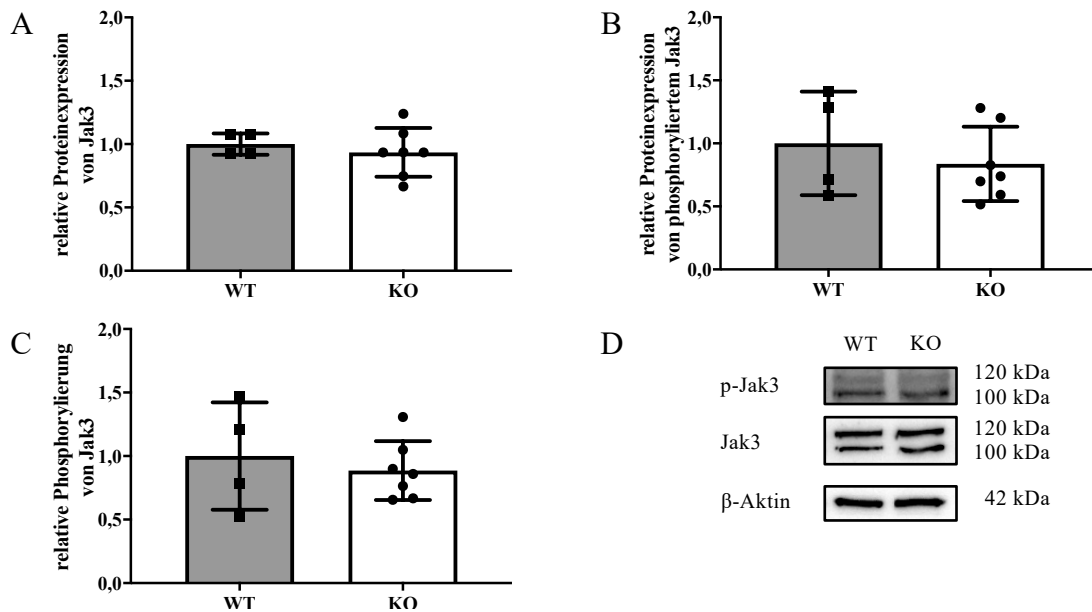


Abbildung 11. Expression und Phosphorylierung von Jak3 in DN Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von Jak3 bezogen auf β -Aktin.
 (B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Jak3 bezogen auf β -Aktin.
 (C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Jak3 bezogen auf Jak3.
 (D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Jak3. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-Jak3 180 sek, Jak3 60 sek, β -Aktin 1 sek.
 Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=4 WT-Proben und n=7 KO-Proben gepoolt von je n=8 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,01.

Tabelle 15. Expression und Phosphorylierung der Kinasen Jak1 und Jak3 des IL-7-Rezeptor-Signalwegs in DN Thymozyten

Ergebnisse der Analyse von Expression und Phosphorylierung der Kinasen Jak1 und Jak3 des IL-7-Signalwegs in DN Thymozyten per Immunoblot.

Protein / Bezugsprotein	Stichprobengröße		WT: Mittelwert \pm SD	KO: Mittelwert \pm SD	p-Wert
Jak1 / β -Aktin	WT: 4	KO: 7	1,000 \pm 0,08	1,203 \pm 0,21	0,1055
Phospho-Jak1/ β -Aktin	WT: 4	KO: 7	1,000 \pm 0,12	1,217 \pm 0,87	0,6396
Phospho-Jak1/ Jak1	WT: 4	KO: 7	1,000 \pm 0,18	0,968 \pm 0,56	0,9154
Jak3 / β -Aktin	WT: 4	KO: 7	1,000 \pm 0,08	0,934 \pm 0,19	0,5409
Phospho-Jak3/ β -Aktin	WT: 4	KO: 7	1,000 \pm 0,41	0,837 \pm 0,29	0,4609
Phospho-Jak3 / Jak3	WT: 4	KO: 7	1,000 \pm 0,42	0,886 \pm 0,23	0,5710

3.2 Phosphorylierungsanalyse des p53-Signalwegs auf Protein-Ebene

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass der Zellzyklusregulator p53, sowie seine Regulationskaskade auf mRNA- und Protein-Ebene teilweise erhöht sind (Gruber 2021). Um diese Ergebnisse zu bestätigen und gleichzeitig die Phosphorylierung der Proteine zu untersuchen, wurden Immunoblots durchgeführt. Zunächst wurde mit dem Antikörper gegen das phosphorylierte Protein inkubiert und anschließend mit dem Antikörper gegen das unphosphorylierte Protein. Als Ladekontrolle wurde stets β -Aktin genutzt. Alle Ergebnisse wurden auf den jeweiligen blotinternen Wildtypen normalisiert.

3.2.1 Der p53-Signalweg in Thymozyten

p53

p53 ist ein zentrales Tumorsuppressorprotein und wird über verschiedene Mechanismen reguliert (s. Abschnitt 1.2.3). Die hier untersuchte Phosphorylierungsstelle Ser15 wird unter anderem durch die Kinasen Chk1, Chk2 und ATM auf DNA-Schaden hin phosphoryliert (Shieh et al. 2000; Khanna et al. 1998).

Bei der Analyse der Phosphorylierung des Zellzyklusregulators p53 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den SLy1^{KO}- und WT-Proben festgestellt werden. Der Mittelwert der KO-Werte ist um den Faktor 1,2 tendenziell etwas erhöht. Wenn das phosphorylierte Protein auf β -Aktin bezogen wird, wird eine signifikante, um den Faktor 1,4 erhöhte Expression des phosphorylierten Proteins sichtbar. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsanalyse sowie ein repräsentatives Western Blot-Ergebnis sind in Abbildung 12 zu finden.

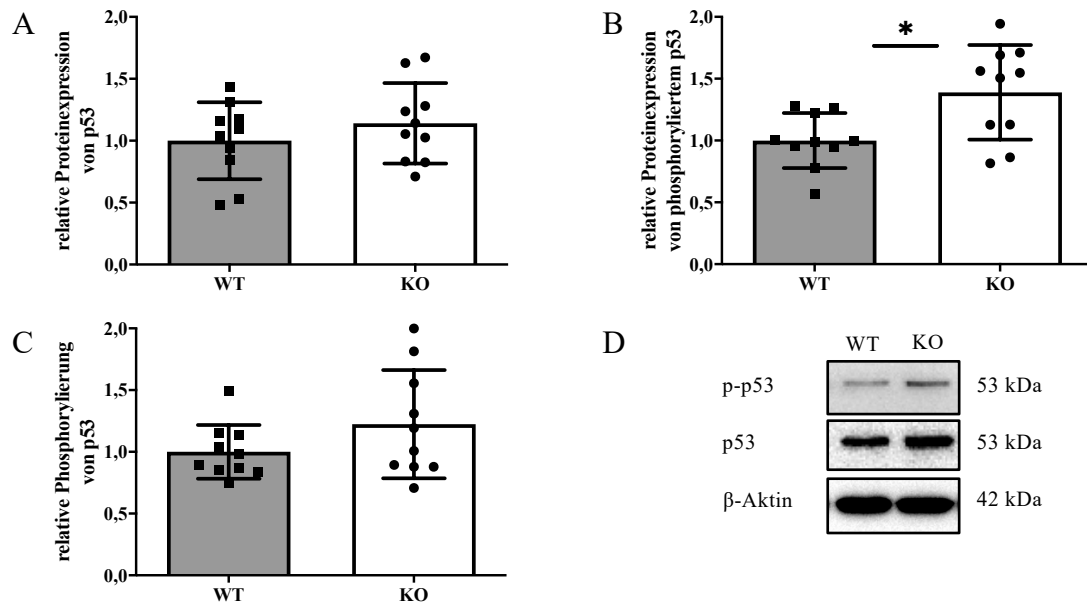


Abbildung 12. Expression und Phosphorylierung von p53 in Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von p53 bezogen auf β -Aktin.

(B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem p53 bezogen auf β -Aktin.

(C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem p53 bezogen auf p53.

(D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem p53. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-p53 120 sek, p53 60 sek, β -Aktin 1 sek.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=10 Mäusen, ungepaarter t-Test, * $p < 0,05$.

DDR-Kinasen: ATR und Chk1, ATM und Chk2

Die Analyse der mRNA- und Proteinexpression von ATR, ATM, Chk1 und Chk2 hat zuvor gezeigt, dass die DDR-Kinasen in SLy1^{KO}-Thymozyten im Vergleich zu SLy1^{WT}-Thymozyten vermehrt vorliegen (Gruber 2021). Nun sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung der Proteine bei einer SLy1-Defizienz verändert ist.

ATR

Die Kinase ATR wird durch verschiedene DNA-Schäden aktiviert und ist unverzichtbar für das Überleben der Zelle. Die untersuchte Phosphorylierung an Ser428 geschieht als Folge von Strangbrüchen (Vauzour et al. 2007).

Die Proteinexpression von ATR ist in den SLy1^{KO}-Thymozyten deutlich und signifikant erhöht. Das Expressionsniveau von ATR verdoppelt sich wie in Abbildung 13 zu sehen und in Tabelle 16 abzulesen ist, während das Vorliegen von phosphoryliertem ATR unverändert ist. Wenn das phosphorylierte ATR auf das nicht-phosphorylierte ATR bezogen wird, zeigt sich eine leichte, jedoch nicht statistisch signifikante Reduktion der Phosphorylierung in den SLy1^{KO}-Thymozyten.

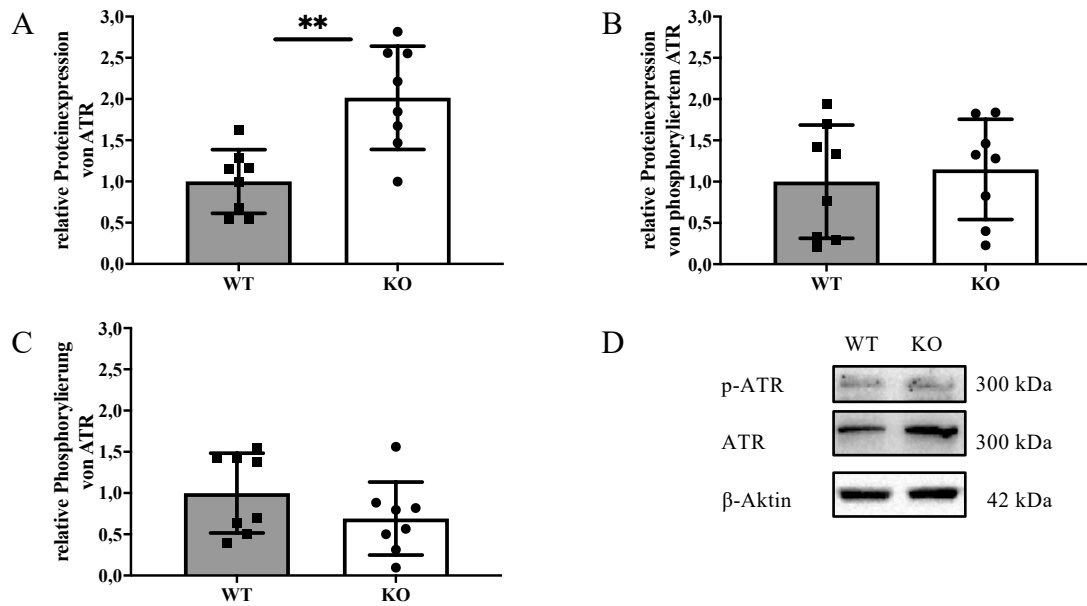


Abbildung 13. Expression und Phosphorylierung von ATR in Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von ATR bezogen auf β -Aktin.
 (B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem ATR bezogen auf β -Aktin.
 (C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem ATR bezogen auf ATR.
 (D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem ATR. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-ATR 300 sek, ATR 30 sek, β -Aktin 1 sek.
 Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=8 Mäusen, ungepaarter t-Test, **p<0,01.

Chk1

Eine vermehrte Expression der DDR-Kinase Chk1 in SLy1^{KO}-Thymozyten hat sich in diesen Versuchen nicht bestätigt, wie in Abbildung 14 zu erkennen ist. Auch die Proteinexpression von phosphoryliertem Chk1 und der Anteil von phosphoryliertem Chk1 an der vorliegenden Chk1-Menge sind bei SLy-1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten auf dem gleichen Niveau.

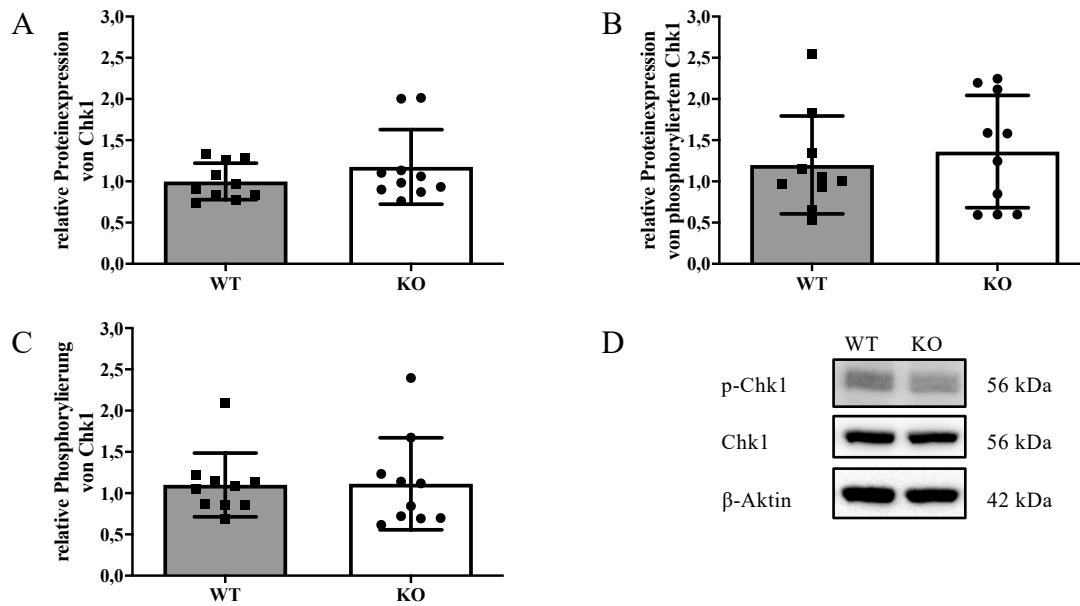


Abbildung 14. Expression und Phosphorylierung von Chk1 in Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von Chk1 bezogen auf β -Aktin.

(B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Chk1 bezogen auf β -Aktin.

(C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Chk1 bezogen auf Chk1.

(D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Chk1. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-Chk1 180 sek, Chk1 30 sek, β -Aktin 1 sek.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=10 Mäusen, ungepaarter t-Test.

ATM

Die bei DNA-Schäden durch Phosphorylierung aktivierte Kinase ATM liegt in SLy1^{KO}-Thymozyten, sowohl im phosphorylierten als auch im unphosphorylierten Zustand um den Faktor 1,9 bzw. 1,8 erhöht vor im Vergleich zum Wildtypen (vgl. Tab. 16). Bei der untersuchten Phosphorylierung handelt sich um die durch Doppelstrangbrüche ausgelöste aktivierende Transphosphorylierung an Ser1981 (s. Abschnitt 1.2.3). Bei gleichem Ausmaß an Veränderung der Proteinmengen des phosphorylierten sowie des unphosphorylierten Proteins ergeben sich zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede in der Proteinphosphorylierung (s. Abb. 15).

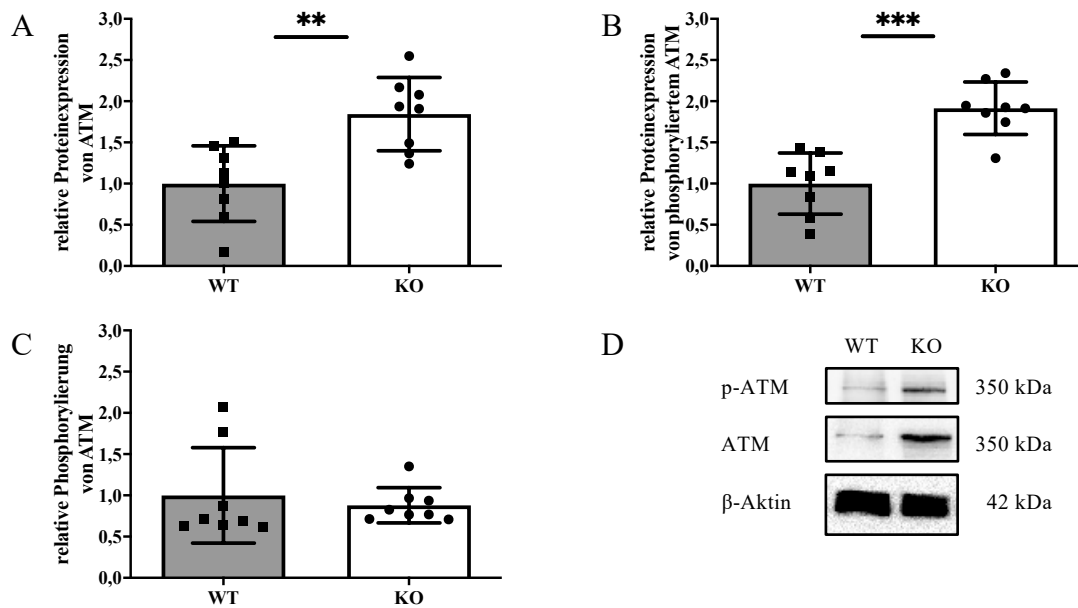


Abbildung 15. Expression und Phosphorylierung von ATM in Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von ATM bezogen auf β -Aktin.
 (B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem ATM bezogen auf β -Aktin.
 (C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem ATM bezogen auf ATM.
 (D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem ATM. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-ATM 120 sek, ATM 30 sek, β -Aktin 1 sek.
 Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=8 Mäusen, ungepaarter t-Test, **p<0,01, ***p<0,001.

Chk2

Chk2 wird durch ATM infolge eines Doppelstrangbruchs an Thr68 phosphoryliert. Nach Aktivierung phosphoryliert es selbst p53.

Die Auswirkung des SLy1-Knockouts auf das Vorliegen von phosphoryliertem Chk2 ist in Abbildung 16 dargestellt. In diesem Datensatz hat sich wie bei Chk1 eine signifikant erhöhte Proteinexpression von Chk2 nicht bestätigt. Auch die Phosphorylierung ist unverändert, wobei hier eine starke Streuung, sowohl bei den Wildtyp- wie auch bei den Knockout-Proben, auffällt.

3. Ergebnisse

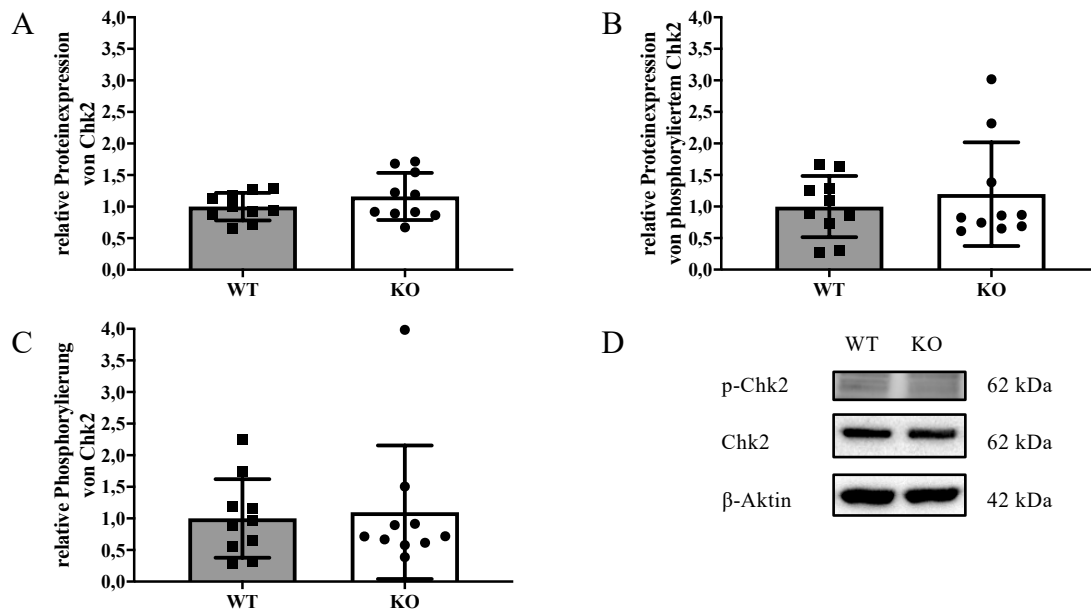


Abbildung 16. Expression und Phosphorylierung von Chk2 in Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von Chk2 bezogen auf β -Aktin.

(B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Chk2 bezogen auf β -Aktin.

(C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Chk2 bezogen auf Chk2.

(D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Chk2. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-Chk2 180 sek, Chk2 60 sek, β -Aktin 1 sek.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=10 Mäusen, ungepaarter t-Test.

Tabelle 16. Expression und Phosphorylierung von p53 und den DDR-Kinasen in Thymozyten

Ergebnisse der Analyse von Expression und Phosphorylierung von p53 und den DDR-Kinasen ATM, ATR, Chk1 und Chk2 des p53-Signalwegs per Immunoblot. Signifikanz wird angenommen bei * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$.

Protein / Bezugsprotein	Stichprobengröße	WT: Mittelwert \pm SD	KO: Mittelwert \pm SD	p-Wert
p53 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,31	1,141 \pm 0,32	0,3351
Phospho-p53 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,22	1,390 \pm 0,38	0,0120
Phospho-p53 / p53	10	1,000 \pm 0,22	1,224 \pm 0,44	0,1644
ATM / β -Aktin	8	1,000 \pm 0,46	1,843 \pm 0,44	0,0022
Phospho-ATM / β -Aktin	8	1,000 \pm 0,37	1,914 \pm 0,32	0,0001
Phospho-ATM / ATM	8	1,000 \pm 0,58	0,880 \pm 0,21	0,5898
ATR / β -ATR	8	1,000 \pm 0,39	2,016 \pm 0,63	0,0016
Phospho-ATR / β -Aktin	8	1,000 \pm 0,69	1,149 \pm 0,61	0,6537
Phospho-ATR / ATR	8	1,000 \pm 0,48	0,692 \pm 0,44	0,2050
Chk1 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,22	1,177 \pm 0,45	0,2823
Phospho-Chk1 / β -Aktin	10	1,200 \pm 0,59	1,362 \pm 0,68	0,5787
Phospho-Chk1 / Chk1	10	1,100 \pm 0,39	1,114 \pm 0,56	0,9494
Chk2 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,22	1,162 \pm 0,37	0,2494
Phospho-Chk2 / β -Aktin	10	1,000 \pm 0,49	1,197 \pm 0,82	0,5222
Phospho-Chk2 / Chk2	10	1,000 \pm 0,62	1,098 \pm 1,06	0,8033

3.2.2 Der p53-Signalweg in DN Thymozyten

Die DN Thymozyten sind die erste Entwicklungsstufe der Thymozyten und stellen nur einen geringen Anteil dieser dar. Um die Proteine dieser Zellen im Immunoblot zu untersuchen, wurden sie per MACS aus den Thymi von SLy1^{KO}- und WT-Mäusen isoliert, lysiert und auf ihre Proteinexpression der im DDR-Signalweg relevanten Proteine p53 und ATM, bei denen sich in der Analyse von Thymozyten Unterschiede beim SLy1-Knockout ergeben haben, untersucht.

Da je nach Genotyp unterschiedlich viele Zellen gewonnen werden konnten, wurden unterschiedlich viele Proteinproben untersucht. Die DN Thymozyten von acht Wildtyp-Mäusen wurden zu vier Proben gepoolt, die DN Thymozyten der acht SLy1^{KO}-Mäuse wurden zu sieben Proben gepoolt.

p53

Die p53-Expression ist in den DN Thymozyten nicht signifikant verändert. Sowohl das nicht-phosphorylierte, wie auch das phosphorylierte Protein scheinen eher reduziert vorzuliegen, wobei beim Bezug auf das nicht-phosphorylierte Protein, das phosphorylierte p53 eine statistische signifikante Erhöhung zeigt (s. Abb. 17). Dies ist eine geringe Erhöhung um den Faktor 1,2 (s. Tab. 17).

ATM

In den DN Thymozyten ist kein Unterschied in der ATM Expression und Phosphorylierung je nach Vorliegen von SLy1 ersichtlich (s. Abb. 18).

Tabelle 17. Expression und Phosphorylierung von p53 und der DDR-Kinase ATM in DN Thymozyten

Ergebnisse der Analyse von Expression und Phosphorylierung von p53 und der DDR-Kinase ATM des p53-Signalwegs per Immunoblot. Signifikanz wird angenommen bei *p<0,05.

Protein / Bezugsprotein	Stichprobengröße		WT: Mittelwert ± SD	KO: Mittelwert ± SD	p-Wert
p53 / β-Aktin	WT: 4	KO: 7	1,000 ± 0,27	0,7132 ± 0,25	0,3351
Phospho-p53 / β-Aktin	WT: 4	KO: 7	1,000 ± 0,36	0,833 ± 0,21	0,3479
Phospho-p53 / p53	WT: 4	KO: 7	1,000 ± 0,10	1,236 ± 0,16	0,0253
ATM / β-Aktin	WT: 4	KO: 7	1,000 ± 0,25	0,976 ± 0,28	0,0770
Phospho-ATM / β-Aktin	WT: 4	KO: 7	1,000 ± 0,59	1,186 ± 0,54	0,6076
Phospho-ATM / ATM	WT: 4	KO: 7	1,000 ± 0,43	1,347 ± 0,55	0,3116

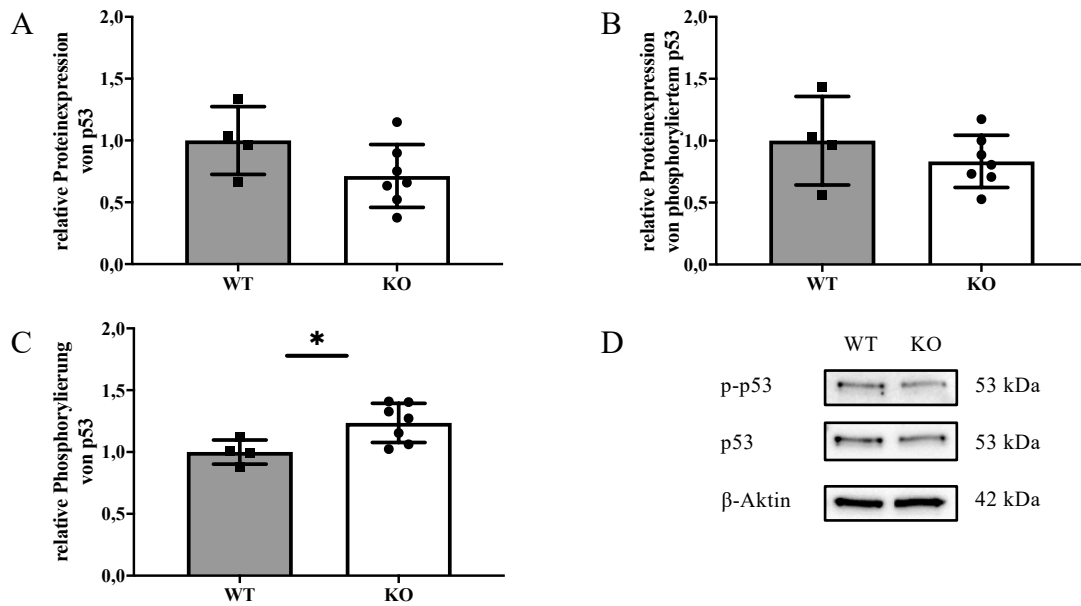


Abbildung 17. Expression und Phosphorylierung von p53 in DN Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von p53 bezogen auf β -Aktin.
 (B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem p53 bezogen auf β -Aktin.
 (C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem p53 bezogen auf p53.
 (D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem p53. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-p53 180 sek, p53 60 sek, β -Aktin 1 sek.
 Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=4 WT-Proben und n=7 KO-Proben gepoolt von je n=8 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,01.

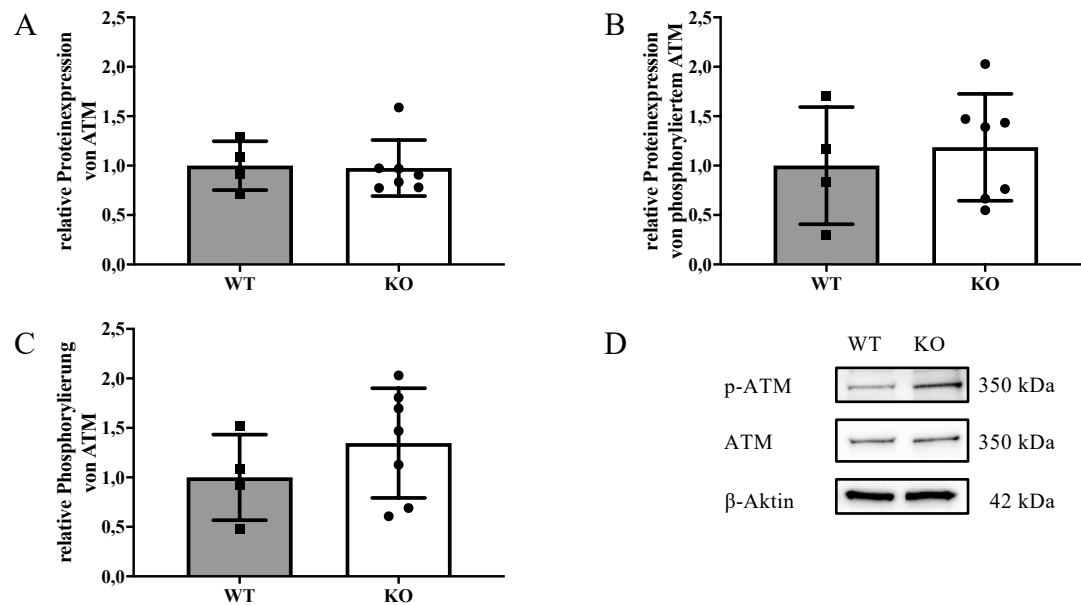


Abbildung 18. Expression und Phosphorylierung von ATM in DN Thymozyten

(A) Relative Proteinexpression von ATM bezogen auf β -Aktin.
 (B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem ATM bezogen auf β -Aktin.
 (C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem ATM bezogen auf ATM.
 (D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem ATM. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-ATM 180 sek, ATM 10 sek, β -Aktin 1 sek.
 Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=4 WT-Proben und n=7 KO-Proben gepoolt von je n=8 Mäusen, ungepaarter t-Test.

3.2.3 Der p53-Signalweg in T-Zellen

Nachfolgend wurden die Expression und Phosphorylierung der beiden zentralen Proteine des DDR-Signalwegs p53 und ATM in den murenen T-Zellen von SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Mäusen untersucht. Diese wurden per MACS über die CD90.2-Expression aus den Milzen isoliert.

p53

Wie in Abbildung 19 dargestellt ist, gibt es keinen signifikanten Unterschied in der p53-Expression zwischen reifen T-Zellen mit oder ohne SLy1-Knockout. Die Phosphorylierung von p53 liegt bei beiden Gruppen nur in sehr geringem Ausmaß vor, sodass von einer Auswertung der Western Blots abgesehen wurde.

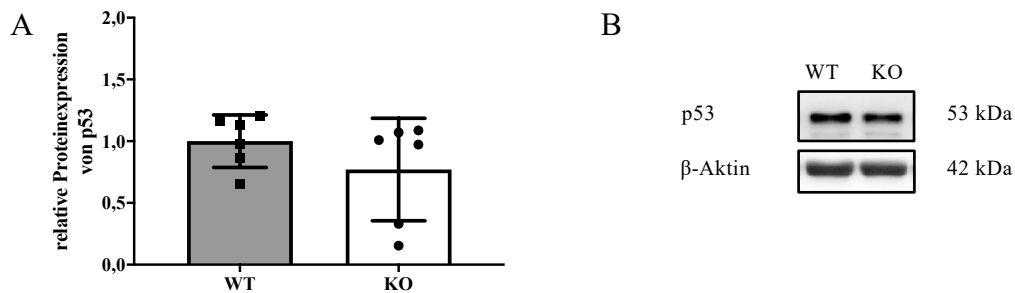


Abbildung 19. Expression von p53 in SLy1^{KO}-T-Zellen

(A) Relative Proteinexpression von p53 bezogen auf β -Aktin in T-Zellen.

(B) Repräsentativer Western Blot von p53. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit p53 120 sek, β -Aktin 1 sek.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=6 Mäusen, ungepaarter t-Test.

ATM

Die DDR-Kinase ATM liegt sowohl in ihrer phosphorylierten wie auch in ihrer unphosphorylierten Form in gleichem Ausmaß in SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-T-Zellen vor. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 18 aufgeführt und in Abbildung 20 dargestellt.

Tabelle 18. Expression und Phosphorylierung von p53 und der DDR-Kinase ATM in T-Zellen

Ergebnisse der Analyse von Expression und Phosphorylierung von p53 und der DDR-Kinase ATM des p53-Signalwegs per Immunoblot.

Protein / Bezugsprotein	Stichprobengröße	WT: Mittelwert \pm SD	KO: Mittelwert \pm SD	p-Wert
p53 / β -Aktin	6	1,000 \pm 0,21	0,771 \pm 0,42	0,2563
ATM / β -Aktin	6	1,000 \pm 0,24	0,977 \pm 0,30	0,8835
Phospho-ATM/ β -Aktin	6	1,000 \pm 0,35	0,877 \pm 0,37	0,5648
Phospho-ATM / ATM	6	1,000 \pm 0,20	0,908 \pm 0,21	0,4564

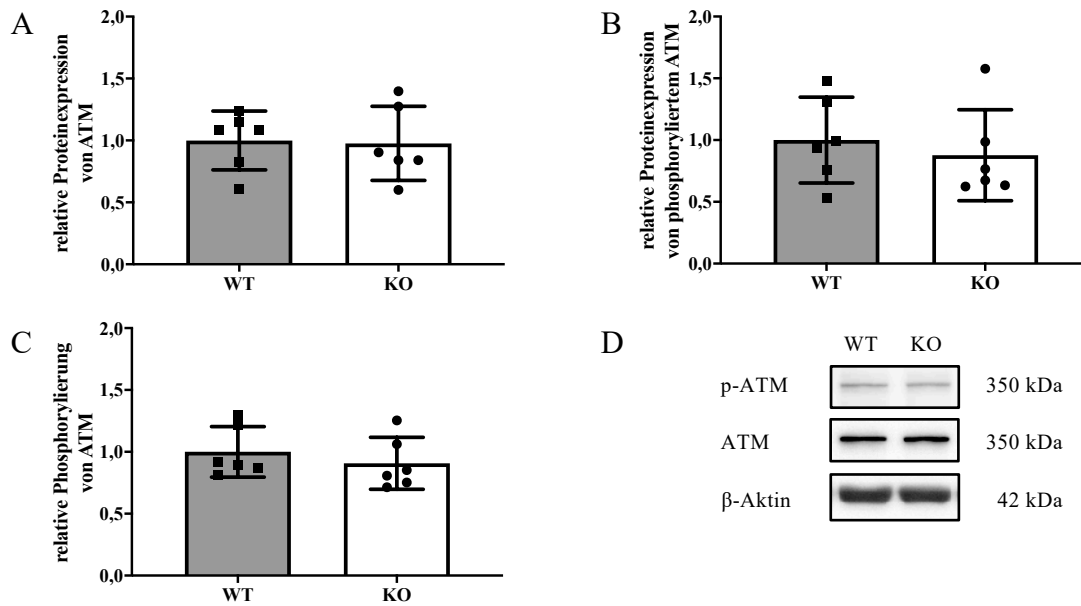


Abbildung 20. Expression und Phosphorylierung von ATM in T-Zellen

(A) Relative Proteinexpression von ATM bezogen auf β -Aktin.

(B) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem ATM bezogen auf β -Aktin.

(C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem ATM bezogen auf ATM.

(D) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem ATM. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-ATM 180 sek, ATM 10 sek, β -Aktin 1 sek.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=6 Mäusen, ungepaarter t-Test.

3.3 Analyse der Mdm2-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene

Mdm2 ist eine p53-spezifische E3 Ubiquitin-Ligase und wird durch Phosphorylierung reguliert (s. Abschnitt 1.2.3). Akt-abhängig wird Mdm2 an Ser166 und Ser186 phosphoryliert und kann dadurch in den Nukleus eintreten und mit p53 interagieren (Mayo und Donner 2001).

Sowohl über ATM, als auch über Phospho-Stat5 wird die Interaktion von p53 und Mdm2 gehemmt. Da diese beiden für die Mdm2-Regulation verantwortlichen Signalwege in SLy1^{KO}-Thymozyten aktiviert sind, hat uns besonders interessiert, inwiefern die Expression von Mdm2 beeinträchtigt ist. Hierzu wurden qPCR-Versuche mit Gesamthymozyten, DN und DP Thymozyten, sowie aus der Milz gewonnenen T-Zellen durchgeführt. Außerdem wurden mit Gesamthymozyten und T-Zellen Western Blots durchgeführt, bei denen die Expression von Mdm2 und dessen Phosphorylierung analysiert wurden. Die untersuchte Phosphorylierungsstelle ist Ser166, entsprechend der aktivierenden Phosphorylierung durch Akt.

3.3.1 Mdm2-Expression und -Phosphorylierung in Thymozyten

Wie in Abb. 21 zu sehen ist, konnten bei den Thymozyten keine Unterschiede je nach Vorliegen eines SLy1-Knockouts festgestellt werden. Sowohl auf mRNA-Ebene, wie auch hinsichtlich Protein-Expression und -Phosphorylierung, waren die beiden Gruppen vergleichbar.

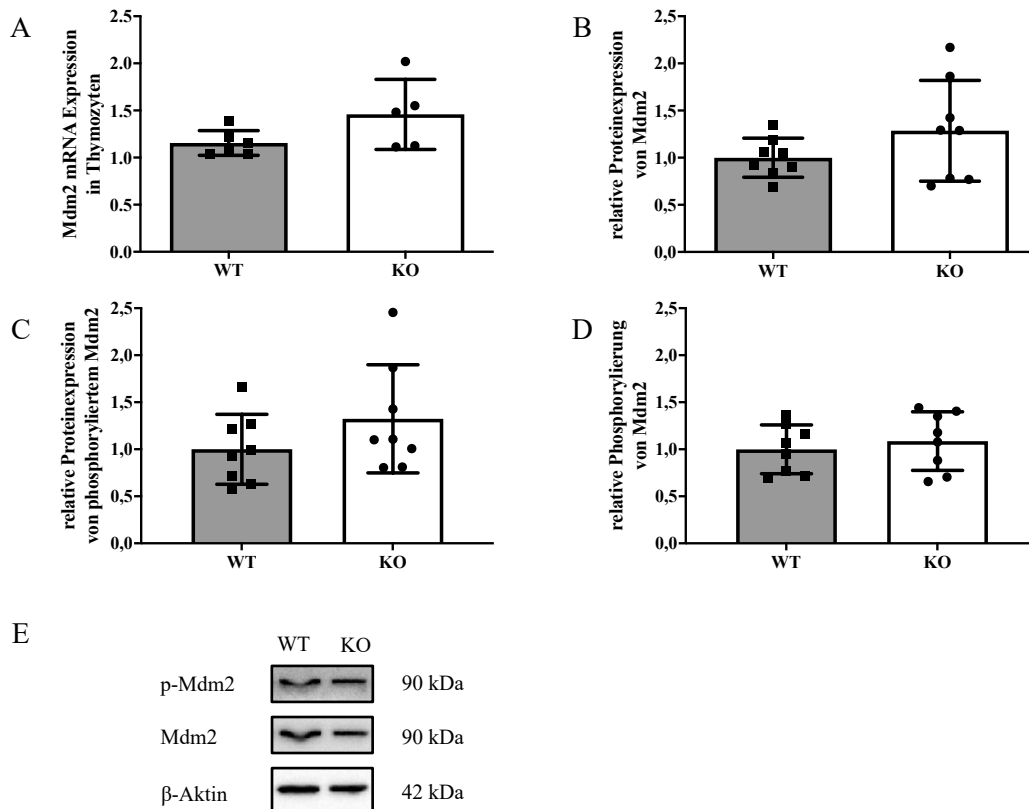


Abbildung 21. Mdm2 mRNA- und Protein-Expression und -Phosphorylierung in Thymozyten

(A) Relative mRNA-Expression von Mdm2 bezogen auf β -Aktin.

(B) Relative Proteinexpression von Mdm2 bezogen auf β -Aktin.

(C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Mdm2 bezogen auf β -Aktin.

(D) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Mdm2 bezogen auf Mdm2.

(E) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Mdm2. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-Mdm2 60 sek, Mdm2 30 sek, β -Aktin 1 sek.

Die Graphen zeigen Mittelwerte relativ zu β -Aktin \pm SD von n=5-8 Mäusen, ungepaarter t-Test.

3.3.2 Mdm2 in DN und DP Thymozyten

In DN und DP Thymozyten wurde das Vorliegen einer Veränderung der Mdm2-Expression auf mRNA-Ebene geprüft. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, konnten weder bei DN noch bei DP Thymozyten abhängig vom Vorliegen eines SLy1-Knockouts Unterschiede festgestellt werden.

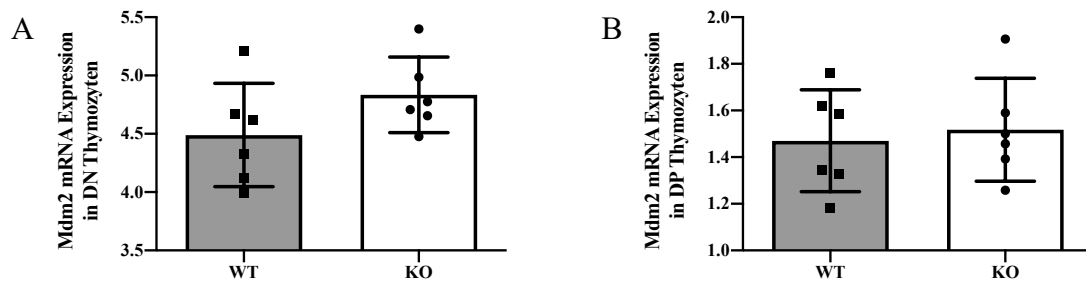


Abbildung 22. Mdm2 mRNA-Expression in DN und DP Thymozyten

(A) Relative mRNA-Expression von Mdm2 in DN Thymozyten bezogen auf β -Aktin

(B) Relative mRNA-Expression von Mdm2 in DP Thymozyten bezogen auf β -Aktin

Die Graphen zeigen Mittelwerte relativ zu β -Aktin \pm SD von je n=6 Mäusen.

3.3.3 Mdm2-Expression und -Phosphorylierung in T-Zellen

In den muren T-Zellen der Milz wurde die mRNA-Expression (s. Tab. 19) sowie Protein-Expression und -Phosphorylierung (s. Tab. 20) von Mdm2 in SLy1^{KO}-Zellen gegenüber WT-Zellen verglichen. Wie auch bei der Untersuchung des p53-Signalwegs (s. Abschnitt 3.2.3) konnten bei dieser Population keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden (s. Abb. 23).

Tabelle 19. mRNA-Expression von Mdm2

Ergebnisse der qPCR-Analyse der Mdm2-mRNA-Expression in Thymozyten, DN Thymozyten, DP Thymozyten und peripheren T-Zellen. Die dargestellten Mittelwerte sind die Mittelwerte der CPI-Werte relativ zu β -Aktin. Signifikanz wird angenommen bei $p^* < 0,05$ bzw. $p^{**} < 0,01$.

Population	Stichprobengröße		WT: Mittelwert \pm SD	KO: Mittelwert \pm SD	Verhältnis KO / WT	p-Wert
Thymozyten	WT: 6	KO: 5	1,155 \pm 0,13	1,458 \pm 0,37	1,26	0,0931
DN Thymozyten	6		4,490 \pm 0,44	4,834 \pm 0,32	1,08	0,1549
DP Thymozyten	6		1,470 \pm 0,22	1,518 \pm 0,22	1,03	0,7165
periphere T-Zellen	6		0,429 \pm 0,11	0,345 \pm 0,15	0,80	0,2801

3. Ergebnisse

Tabelle 20. Expression und Phosphorylierung von Mdm2 in Thymozyten und T-Zellen
Ergebnisse der Analyse von Expression und Phosphorylierung der Ubiquitin-Ligase Mdm2 in Thymozyten und T-Zellen per Immunoblot.

Population	Protein / Bezugsprotein	Stichprobengröße	WT: Mittelwert \pm SD	KO: Mittelwert \pm SD	p-Wert
Thymozyten	Mdm2 / β -Aktin	8	1,000 \pm 0,21	1,286 \pm 0,53	0,1796
Thymozyten	Phospho-Mdm2/ β -Aktin	8	1,000 \pm 0,37	1,323 \pm 0,58	0,2031
Thymozyten	Phospho-Mdm2 / Mdm2	8	1,000 \pm 0,26	1,087 \pm 0,31	0,5516
T-Zellen	Mdm2 / β -Aktin	6	1,000 \pm 0,48	0,810 \pm 0,37	0,4595
T-Zellen	Phospho-Mdm2/ β -Aktin	6	1,000 \pm 0,31	0,841 \pm 0,39	0,4522
T-Zellen	Phospho-Mdm2 / Mdm2	6	1,000 \pm 0,43	0,869 \pm 0,23	0,5238

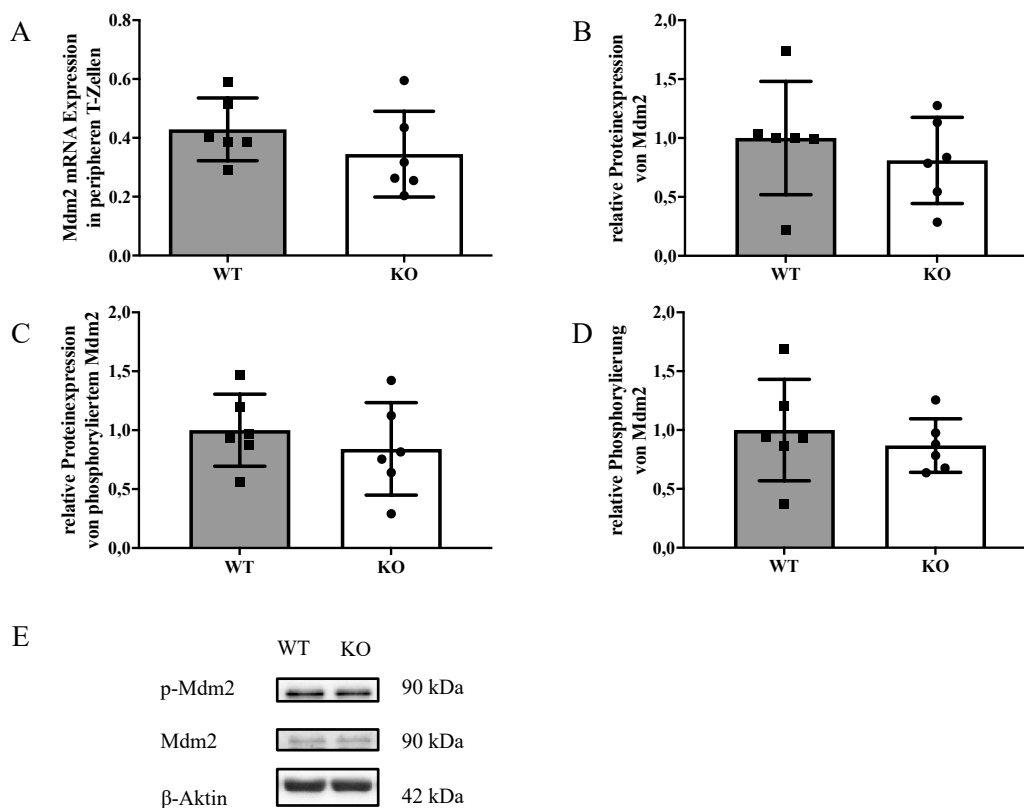


Abbildung 23. Mdm2 mRNA- und Protein-Expression und -Phosphorylierung in T-Zellen

(A) Relative mRNA-Expression von Mdm2 bezogen auf β -Aktin.
 (B) Relative Proteinexpression von Mdm2 bezogen auf β -Aktin.
 (C) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Mdm2 bezogen auf β -Aktin.
 (D) Relative Proteinexpression von phosphoryliertem Mdm2 bezogen auf Mdm2.
 (E) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Mdm2. β -Aktin als Ladekontrolle. Belichtungszeit Phospho-Mdm2 20 sek, Mdm2 300 sek, β -Aktin 1 sek.
 Die Graphen zeigen Mittelwerte relativ zu β -Aktin \pm SD von n=6 Mäusen, ungepaarter t-Test.

3.4 Analyse von p53-Downstream-Apoptosemarkern auf mRNA-Ebene

Noxa und PUMA sind zelluläre Moleküle, die durch p53 hoch reguliert werden und die Funktion haben eine Apoptose auszulösen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass p21, ein von p53-ausgelöster Seneszenzbote, in SLy1^{KO}-Thymozyten auf mRNA-Niveau erhöht exprimiert wird (Gruber 2021). Um herauszufinden, ob Seneszenz oder Apoptose der zugrundeliegende Mechanismus für die reduzierten Zellzahlen in SLy1^{KO}-Tieren ist, wurde die mRNA verschiedener Zellpopulationen dieser Tiere auf Unterschiede in der Expression von Apoptose-relevanten Genen untersucht.

3.4.1 Noxa und PUMA in Thymozyten

Wie in Abbildung 24 dargestellt ist, ist das mRNA-Niveau von Noxa bei der Analyse der Thymozyten in den Knockout-Proben signifikant um den Faktor 1,9 erhöht.

Die Expression von PUMA-mRNA zeigt diese Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht. Die Messwerte liegen hier insgesamt deutlich höher (s. Tab. 21) als die der Noxa-mRNA.

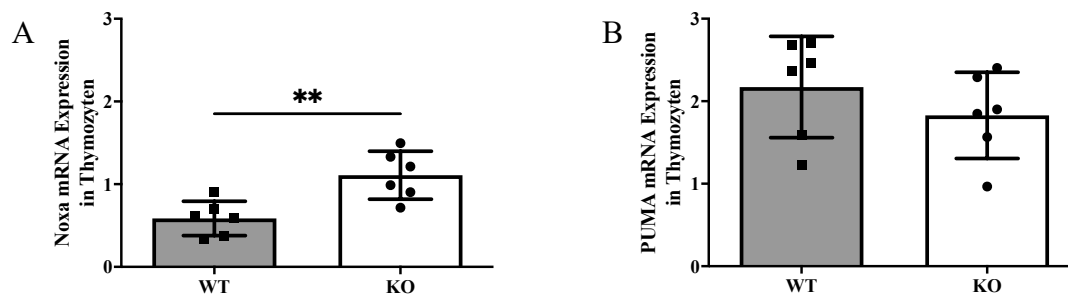


Abbildung 24. Noxa und PUMA mRNA-Expression in Thymozyten

(A) Relative mRNA-Expression von Noxa bezogen auf β -Aktin

(B) Relative mRNA-Expression von PUMA bezogen auf β -Aktin

Die Graphen zeigen Mittelwerte relativ zu β -Aktin \pm SD von n=6 Mäusen, **p<0,01, ungepaarter t-Test.

3.4.2 Noxa und PUMA in DN und DP Thymozyten

Um genauer aufzuschlüsseln, wie die Apoptosemarker in den einzelnen Entwicklungsstufen der Thymozyten exprimiert werden, wurde das mRNA-Niveau von Noxa und PUMA in DN und DP Thymozyten untersucht. Die einzelnen Zellpopulationen wurden per MACS und FACS isoliert.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, gibt es keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression dieser beiden Proteine zwischen SLy1^{KO}- und WT-Zellen in diesen Entwicklungsstufen. Auch das Vorliegen von p21-mRNA war in diesen beiden Zellgruppen in der SLy1^{KO}-Gruppe nicht verändert (Gruber 2021).

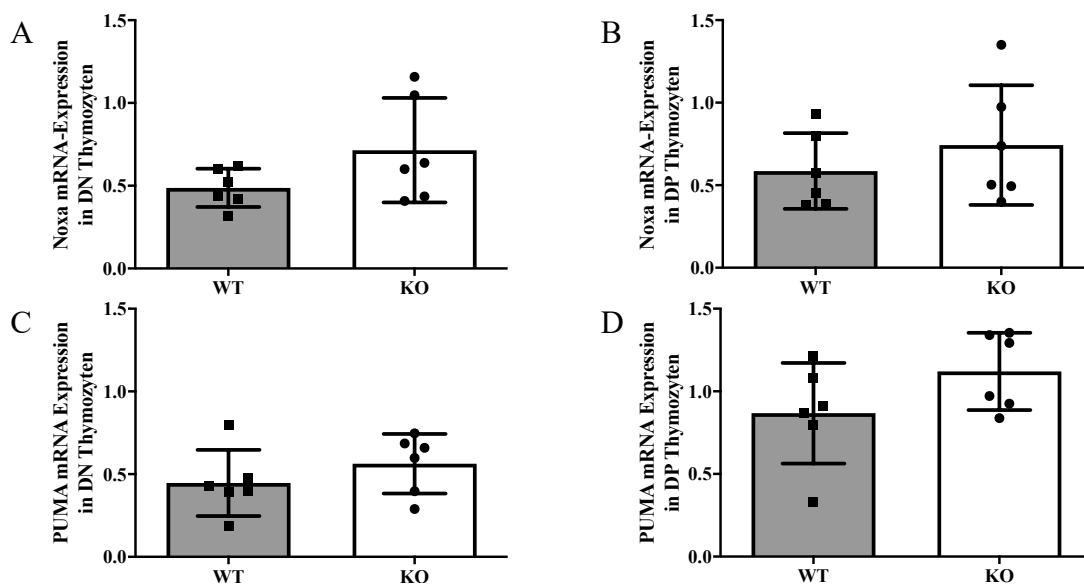


Abbildung 25. Noxa und PUMA mRNA-Expression in DN und DP Thymozyten

(A) Relative mRNA-Expression von Noxa in DN Thymozyten bezogen auf β -Aktin
 (B) Relative mRNA-Expression von Noxa in DP Thymozyten bezogen auf β -Aktin
 (C) Relative mRNA-Expression von PUMA in DN Thymozyten bezogen auf β -Aktin
 (D) Relative mRNA-Expression von PUMA in DP Thymozyten bezogen auf β -Aktin
 Alle Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von je n=6 Mäusen relativ zu β -Aktin.

3.4.3 Noxa und PUMA in T-Zellen

In der Abbildung 26 ist die mRNA-Expression von Noxa und PUMA in den maturaen, peripheren T-Zellen dargestellt. Hier sind für beide Gene zwischen den SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Proben keine Unterschiede zu erkennen.

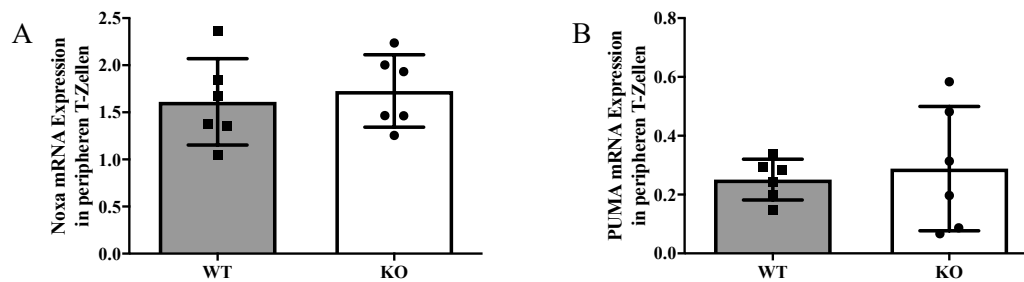


Abbildung 26. Noxa und PUMA mRNA-Expression in T-Zellen

(A) Relative mRNA-Expression von Noxa in peripheren T-Zellen bezogen auf β -Aktin
 (B) Relative mRNA-Expression von PUMA in peripheren T-Zellen bezogen auf β -Aktin
 Die Graphen zeigen Mittelwerte relativ zu β -Aktin \pm SD von je n=6 Mäusen.

Tabelle 21. mRNA-Expression von Noxa und PUMA

Ergebnisse der qPCR-Analyse der Noxa- und PUMA-mRNA-Expression in Thymozyten, DN Thymozyten, DP Thymozyten und peripheren T-Zellen. Die dargestellten Mittelwerte sind die Mittelwerte der CPI-Werte relativ zu β -Aktin. Signifikanz wird angenommen bei $p^* < 0,05$ bzw. $p^{**} < 0,01$.

Gen	Population	Stichprobengröße	WT: Mittelwert \pm SD	KO: Mittelwert \pm SD	Verhältnis KO / WT	p-Wert
Noxa	Thymozyten	6	0,587 \pm 0,21	1,108 \pm 0,30	1,89	0,0050
Noxa	DN Thymozyten	6	0,487 \pm 0,12	0,715 \pm 0,32	1,47	0,1288
Noxa	DP Thymozyten	6	0,586 \pm 0,23	0,743 \pm 0,36	1,27	0,3918
Noxa	periphere T-Zellen	6	1,612 \pm 0,46	1,726 \pm 0,38	1,07	0,6486
PUMA	Thymozyten	6	2,172 \pm 0,61	1,830 \pm 0,52	0,84	0,3225
PUMA	DN Thymozyten	6	0,447 \pm 0,20	0,563 \pm 0,18	1,26	0,3144
PUMA	DP Thymozyten	6	0,868 \pm 0,30	1,121 \pm 0,23	1,29	0,1372
PUMA	periphere T-Zellen	6	0,251 \pm 0,07	0,289 \pm 0,21	1,15	0,6884

3.5 Die T-Zell-Entwicklung in Tieren mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Um die Auswirkung einer p53-Defizienz auf die T-Zell-Entwicklung abhängig vom Vorliegen von SLy1 zu untersuchen, wurden Mäuse mit T-Zell-spezifischer p53-Deletion und SLy1-Knockout gezüchtet. Diese wurden gemeinsam mit ihren Kontrollgruppen im Alter von 10, 25 und 50 Wochen präpariert, die Zellzahlen der lymphatischen Organe bestimmt und die entsprechenden Zellen per Durchflusszytometrie analysiert.

3.5.1 Überprüfung der T-Zell-spezifischen p53-Defizienz

Durch die Kombination eines von loxP-Stellen flankierten p53-Gens und einer Lck-gekoppelten Rekombinase, konnte T-Zell-spezifisch eine p53-Defizienz erzeugt werden. Um dies zu überprüfen, wurden Thymozyten einer 10-Wochen-alten $p53^{fl/fl}$ $Lck^{-+/tg}$ $SLy1^{het}$ -Maus lysiert und per Western Blot auf ihre p53-Expression analysiert. Diese wurde mit der p53-Expression in Thymozyten einer $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/+}$ $SLy1^{het}$ -Maus und einer $p53^{+/+}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{het}$ -Maus verglichen.

Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, konnte durch die Kombination aus loxP-Stellen am p53-Gen und T-Zell-spezifischer Rekombinaseaktivität eine p53-Defizienz in den Thymozyten erreicht werden.

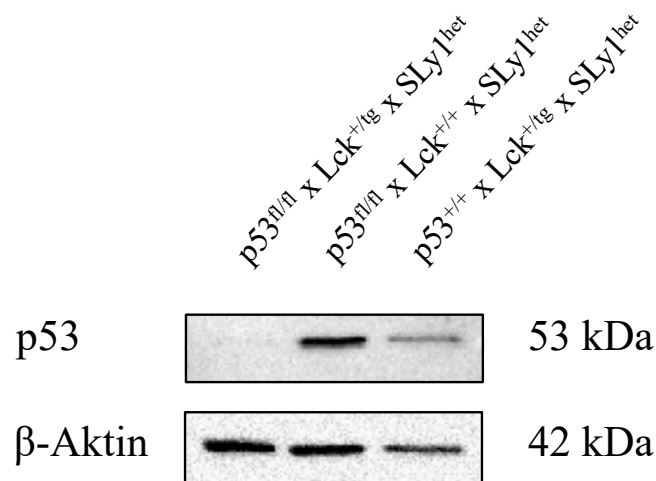


Abbildung 27. Überprüfung der p53-Defizienz in $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{het}$ -Thymozyten
 Western Blot von p53 aus Thymozyten einer $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{het-}$, einer $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/+}$ $SLy1^{het-}$ und einer $p53^{+/+}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{het-}$ -Maus. β -Aktin als Ladekontrolle.
 Belichtungszeit p53 120 sek, β -Aktin 1 sek.

3.5.2 Wahl einer geeigneten Kontrollgruppe

Um den Effekt der T-Zell-spezifischen p53-Defizienz und des SLy1-Knockouts beobachten zu können, wurden als Kontrollgruppen für die $p53^{fl/fl}$ Lck^{+tg}-Tiere $p53^{fl/fl}$ Lck^{+/+}- und $p53^{+/+}$ Lck^{+tg}-Geschwister jeweils mit und ohne SLy1-Knockout untersucht. Um zu verstehen, welche Unterschiede durch das Einführen der loxP-Stellen und der Cre-Rekombinase in den untersuchten Parametern entstehen, wurden die Ergebnisse der beiden Kontrollgruppen mit parallel durchgeführten Untersuchungen von SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten verglichen.

In allen Kontrollgruppen waren die aus Voruntersuchungen erwarteten Auswirkungen des SLy1-Knockouts sichtbar. Hierzu gehören die reduzierte Thymozytenzahl (s. Abb. 28), der erhöhte Anteil der DN-Thymozyten, sowie der CD8⁺-Thymozyten und der verringerte Anteil der DP-Thymozyten an den CD90⁺ TCRγδ⁻-Thymozyten (s. Abb. 29).

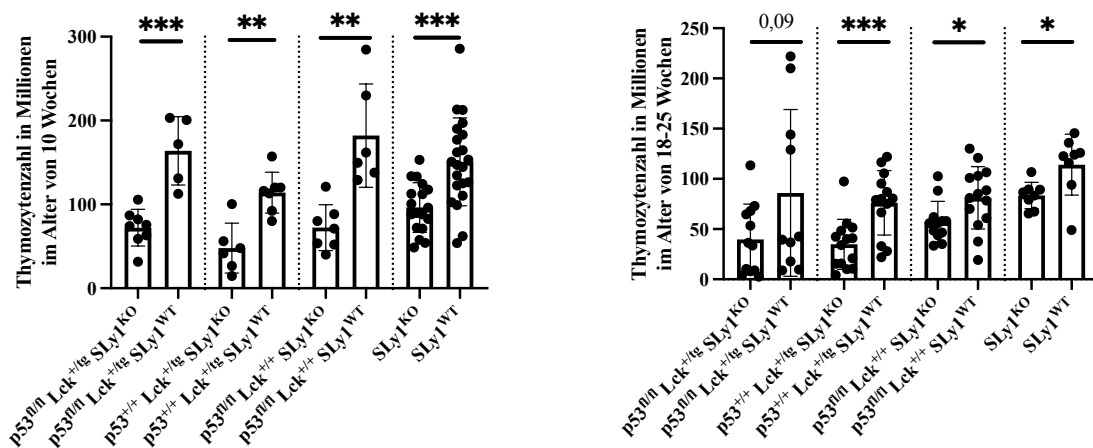


Abbildung 28. Thymozytenzahl im Alter von 10 und 25 Wochen in allen Kontrollgruppen

Dargestellt sind die Thymozytenzahlen der Versuchs- und aller Kontrollgruppen.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von $n=5-14$ Mäusen, ungepaarter t-Test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Signifikanzen sind nur angegeben bei Tieren mit gleichem p53- und Lck-Cre-Status.

Im Vergleich zu den SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Tieren konnten bei den $p53^{+/+}$ Lck^{+tg}-Tieren eine reduzierte Thymozytenzahl um 33% (SLy1^{WT}) und 58% (SLy1^{KO}) in 25-Wo-alten und um 24% (SLy1^{WT}) und 51% (SLy1^{KO}) in 10-Wo-alten Tieren beobachtet werden. In den jeweiligen SLy1^{KO}-Gruppen waren die Anteile der DN Thymozyten signifikant erhöht, diejenigen der DP Thymozyten signifikant erniedrigt, sowie der CD8⁺ SP Thymozyten erhöht (s. Anhang Abb. 43). Außerdem fiel bei den $p53^{+/+}$ Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Thymozyten eine große Streuung beim prozentualen Anteil der DN und DP Thymozyten im Gegensatz zu der SLy1^{KO}- und der $p53^{fl/fl}$ Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Gruppe auf (s. Abb. 29).

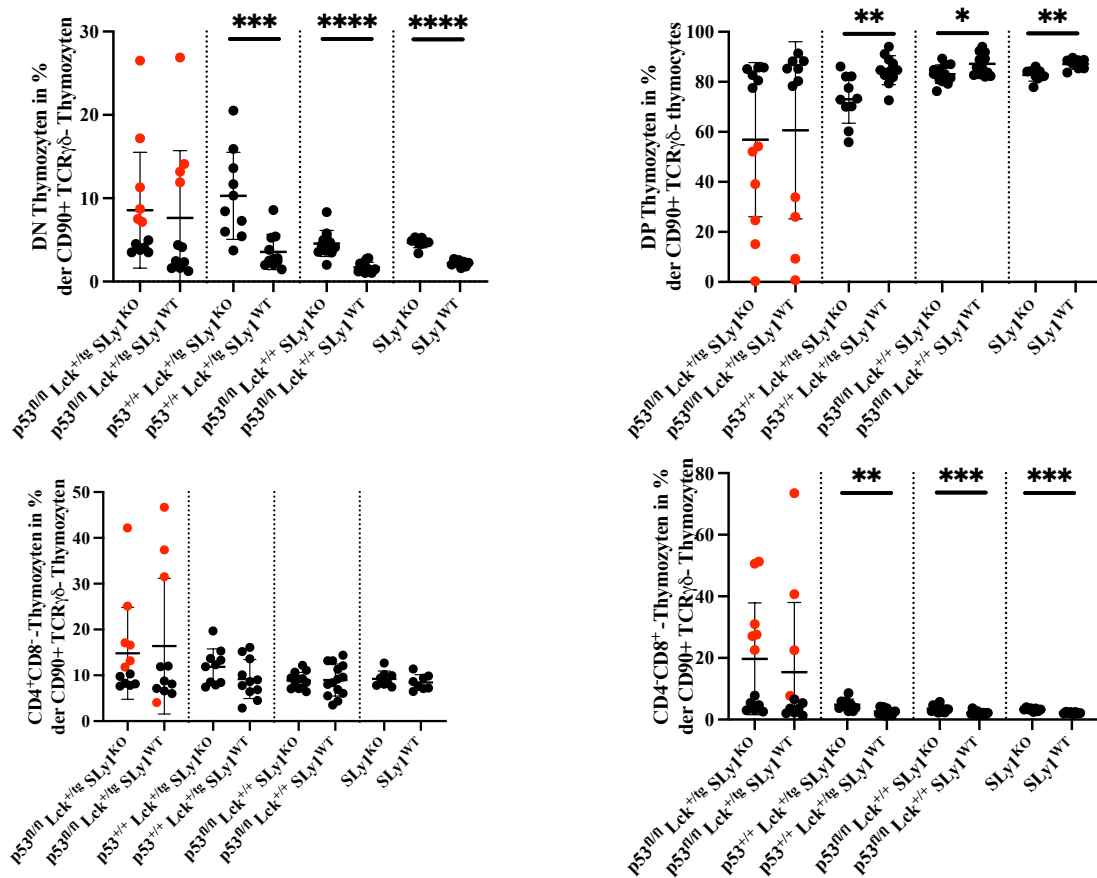


Abbildung 29. Thymozytenpopulationen in allen Kontrollgruppen

Dargestellt sind die Anteile der DN, DP, CD4⁺- und CD8⁺-Thymozyten als % aller CD90⁺ TCR $\gamma\delta$ -Thymozyten.

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=8-14 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Signifikanzen sind nur angegeben bei Tieren mit gleichem p53- und Lck-Cre-Status. Rot markiert sind Proben mit großen Anteilen DN Thymozyten und geringen Anteilen DP Thymozyten (entspricht der Rotmarkierung in Abb. 32, 33, 41 und 42 und 43).

Beim Vergleich der SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Mäuse mit den p53^{fl/fl} Lck^{+/+} SLy1^{WT/KO}-Mäusen fallen zwar ebenfalls signifikant reduzierte Zellzahlen bei den 25-Wochen-alten Tieren auf, die Zellzahlen bei den 10-Wochen-alten Tieren sind jedoch in der Wildtypgruppe nicht reduziert und die Zusammensetzung der Zellpopulationen ist nicht relevant verändert. Im Alter von 25 Wochen ist die Thymozytenzahl bei p53^{fl/fl} Lck^{+/+} SLy1^{WT}-Tieren um 29% erniedrigt, bei p53^{fl/fl} Lck^{+/+} SLy1^{KO}-Tieren um 31%. Im Alter von 10 Wochen ist die Thymozytenzahl in den p53^{fl/fl} Lck^{+/+} SLy1^{WT}-Tieren um 21% erhöht, in den p53^{fl/fl} Lck^{+/+} SLy1^{KO}-Tieren um 25% erniedrigt. Der Anteil DN Thymozyten in den p53^{fl/fl} Lck^{+/+} SLy1^{WT}-Tieren ist um 23% signifikant reduziert.

In Anbetracht der beobachteten Veränderungen durch die Einführung der Lck-abhängigen Rekombinase, die wie auch in der Literatur beschrieben (Carow et al. 2016) in den relevanten Parametern zu Unterschieden im Gegensatz zur Wildtyp-Gruppe führt, werden im

Folgenden die p53^{+/+} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Tiere als Vergleichsgruppe zu den eigentlichen p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Versuchsgruppen herangezogen.

3.5.3 Entwicklung der Zellzahlen in lymphatischen Organen

Die Zellzahlen von Thymus, Milz und Lymphknoten der 10- und 25-Wochen-alten Tiere wurden in einer Neubauer-Kammer bestimmt.

Sowohl im Alter von 10 als auch von 25 Wochen zeigten sich SLy1-abhängige Unterschiede in der Thymozytenzahl und Splenozytenzahl (s. Abb. 30). Bei den SLy1^{KO}-Proben war die Zahl der Thymozyten und Splenozyten jeweils reduziert im Vergleich zur SLy1^{WT}-Gruppe. Beim Vergleich der p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}- und p53^{+/+} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Gruppen fielen eine signifikante Erhöhung der Thymozytenzahl bei SLy1^{WT}-Mäusen und eine signifikante Erhöhung der Splenozytenzahl bei SLy1^{KO}-Mäusen je nach Vorliegen der p53-Defizienz auf. Die Zahl der Lymphknotenzellen unterschied sich nicht zwischen den Gruppen außer einer Erhöhung bei den 10-Wochen-alten p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Mäusen.

Die Thymozytenzahl reduzierte sich in allen Gruppen vom 10-Wochen- zum 25-Wochen-Alter. Die Zellzahlen von Milz und inguinalen Lymphknoten zeigten in den vier Gruppen keine einheitliche Reduktion oder Zunahme. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tab. 22).

Tabelle 22. Entwicklung der Zellzahlen in lymphatischen Organen in Abhängigkeit vom Alter

Dargestellt ist der Quotient der Zellzahlen von Thymus, Milz und Lymphknoten der 25-Wo-alten Tiere bezogen auf die durchschnittliche Zellzahl der entsprechenden Organe der 10-Wo-alten Tiere.

Organ	Genotyp	Zellzahl 25 Wo / 10 Wo ± SD
Thymus	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	0,5499 ± 0,49
	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	0,5249 ± 0,51
	p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	0,7283 ± 0,52
	p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	0,6682 ± 0,28
Milz	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	1,383 ± 0,56
	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	1,137 ± 0,44
	p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	0,9424 ± 0,42
	p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	1,493 ± 0,83
LK	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	0,8461 ± 0,62
	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	1,303 ± 2,27
	p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	0,7998 ± 1,17
	p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	0,7768 ± 0,47

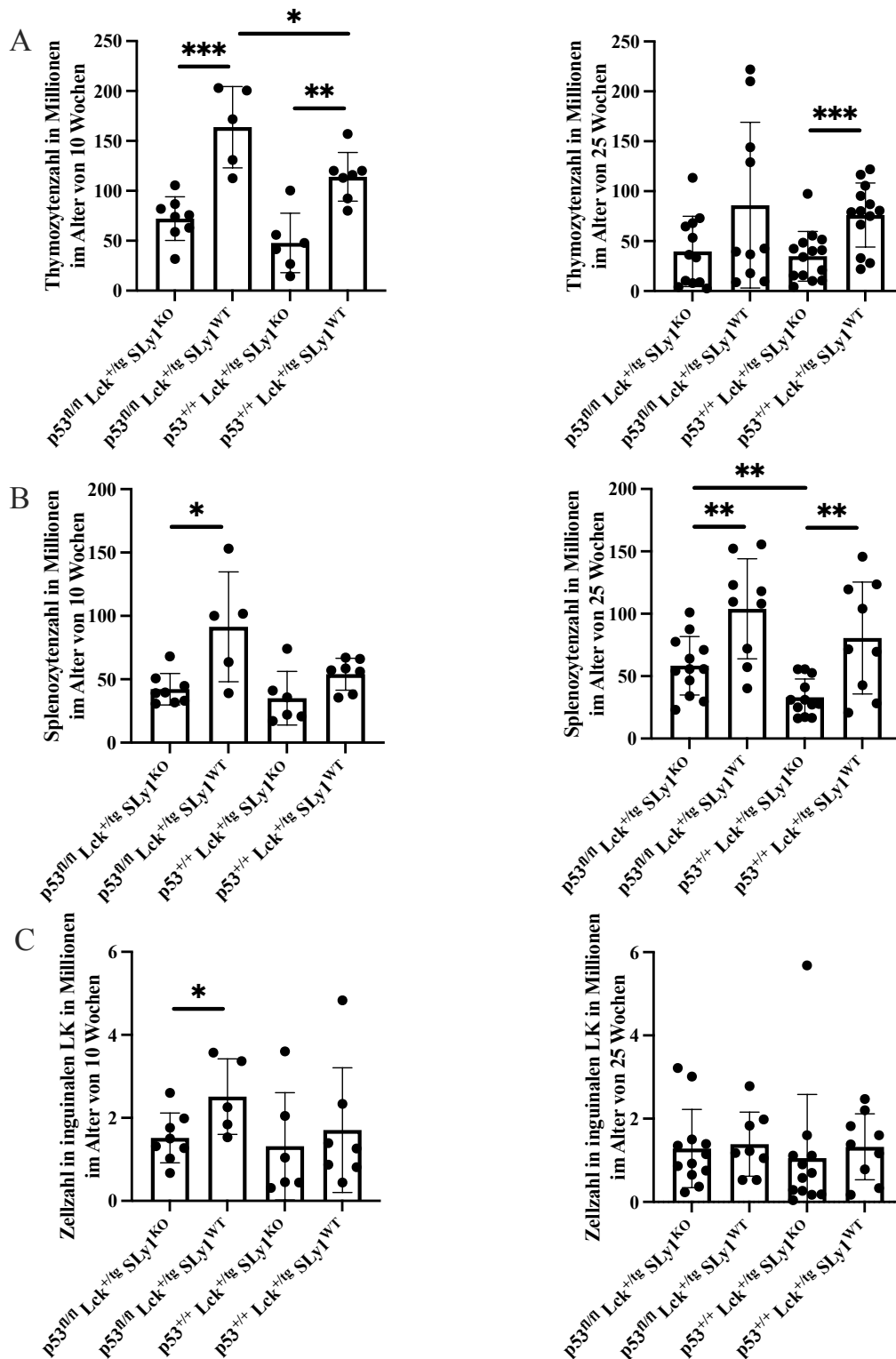


Abbildung 30. Zellzahlen in Thymus, Milz und Lymphknoten in p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Tieren im Alter von 10 und 25 Wochen

(A) Thymozytenzahl in Millionen im Alter von 10 und 25 Wochen

(B) Splenozytenzahl in Millionen im Alter von 10 und 25 Wochen

(C) Zellzahl in den inguinalen LK in Millionen im Alter von 10 und 25 Wochen

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=5-14 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.5.4 Veränderungen in den Thymozyten-Populationen

In den Thymus wandern T-Zell-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ein und reifen heran zu inaktiven, aber murenen T-Zellen mit Expression des T-Zell-Rezeptors sowie entweder CD4- oder CD8-Expression. Auf dem Weg hierhin, werden verschiedene Entwicklungsstufen durchlaufen. Zunächst werden weder CD4 noch CD8 exprimiert, die Thymozyten sind doppelt negativ (DN) und werden über ihre CD25- und CD44-Expression in 4 Untergruppen aufgeteilt (DN1-4). Nachfolgend sind die Thymozyten zunächst doppelt positiv (DP) und exprimieren sowohl CD4 als auch CD8. Die letzte Entwicklungsstufe sind die einfach positiven (SP) Thymozyten, welche entweder CD4 oder CD8 exprimieren.

Im Alter von 10 Wochen konnten SLy1-abhängige Veränderungen in den Thymi mit p53-Defizienz wie in den p53^{+/+} Lck^{+tg}-Thymi beobachtet werden (s. Abb. 31). Hierzu gehören ein erhöhter Anteil DP Thymozyten, sowie ein reduzierter Anteil DN Thymozyten und ein erhöhter Anteil CD8⁺ SP Thymozyten. Als Auswirkung der p53-Defizienz konnten ein reduzierter Anteil CD4⁺ SP Thymozyten und DN Thymozyten sowie ein erhöhter Anteil DP Thymozyten beobachtet werden.

Bei der Analyse der Anteile der einzelnen Thymozytenpopulationen an den CD90⁺ TCR $\gamma\delta$ -Thymozyten in den 25-Wochen-alten Mäusen fiel auf, dass sich bei den p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Gruppen die jeweiligen Anteile an DN und DP Thymozyten in zwei Untergruppen teilten (s. Abb. 32). Eine Gruppe entspricht in ihrem Anteil an DN und DP Thymozyten der p53^{+/+} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Gruppe, während die andere (in Abb. 32 rot markiert) einen erhöhten DN und verringerten DP Anteil hat. Unter Ausschluss der rot markierten Gruppe sind auch bei p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Thymi im Gegensatz zu p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Thymi der Anteil an DN Thymozyten signifikant erhöht, sowie der Anteil DP Thymozyten tendenziell reduziert. Bei den 10-Wochen-alten Tieren fiel diese Streuung hingegen noch nicht auf.

Bei den Unterstufen der DN Thymozyten (DN1-4, s. Abb. 31A und 32A) konnten keine SLy1-abhängigen Unterschiede beobachtet werden, aber je nach Alter der Mäuse Auswirkungen durch die p53-Defizienz. Im Alter von 10 Wochen hatten die p53^{fl/fl} Lck^{+tg}-Thymi einen erhöhten Anteil DN2 Thymozyten unabhängig von ihrer SLy1-Expression. Im Alter von 25 Wochen ist der Anteil an DN1 Thymozyten erhöht, sowie der Anteil der DN3 Thymozyten SLy1-unabhängig beim Fehlen von p53 reduziert.

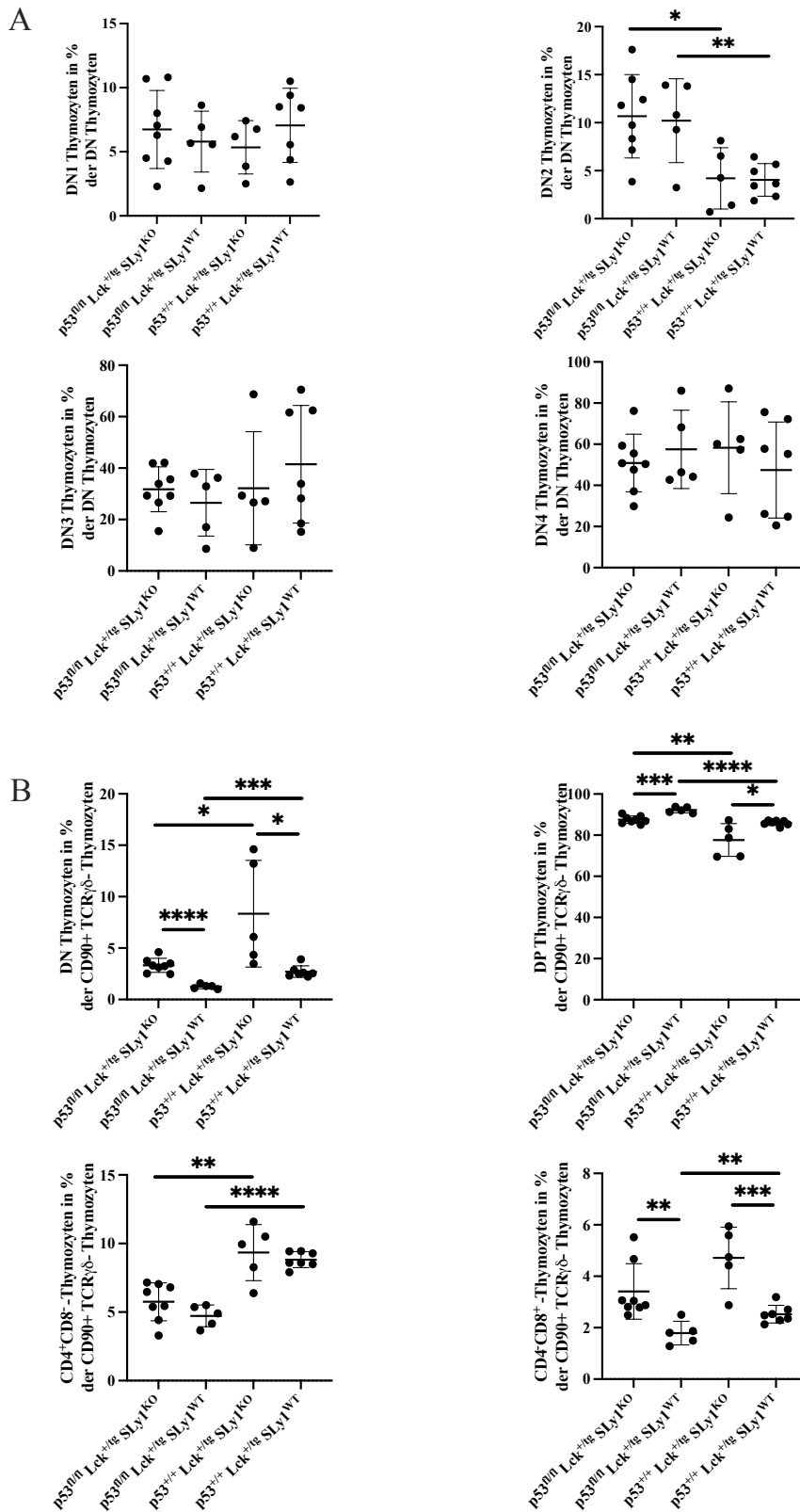


Abbildung 31. Thymozytenpopulationen in $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO}$ - und $p53^{+/+}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Tieren im Alter von 10 Wochen

(A) Anteil der DN1-4 Thymozyten an den DN Thymozyten in %

(B) Anteil der DN, DP, CD4⁺ SP und CD8⁺ SP Thymozyten an allen CD90⁺ TCR $\gamma\delta$ -Thymozyten

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=5-8 Mäusen, ungepaarter t-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

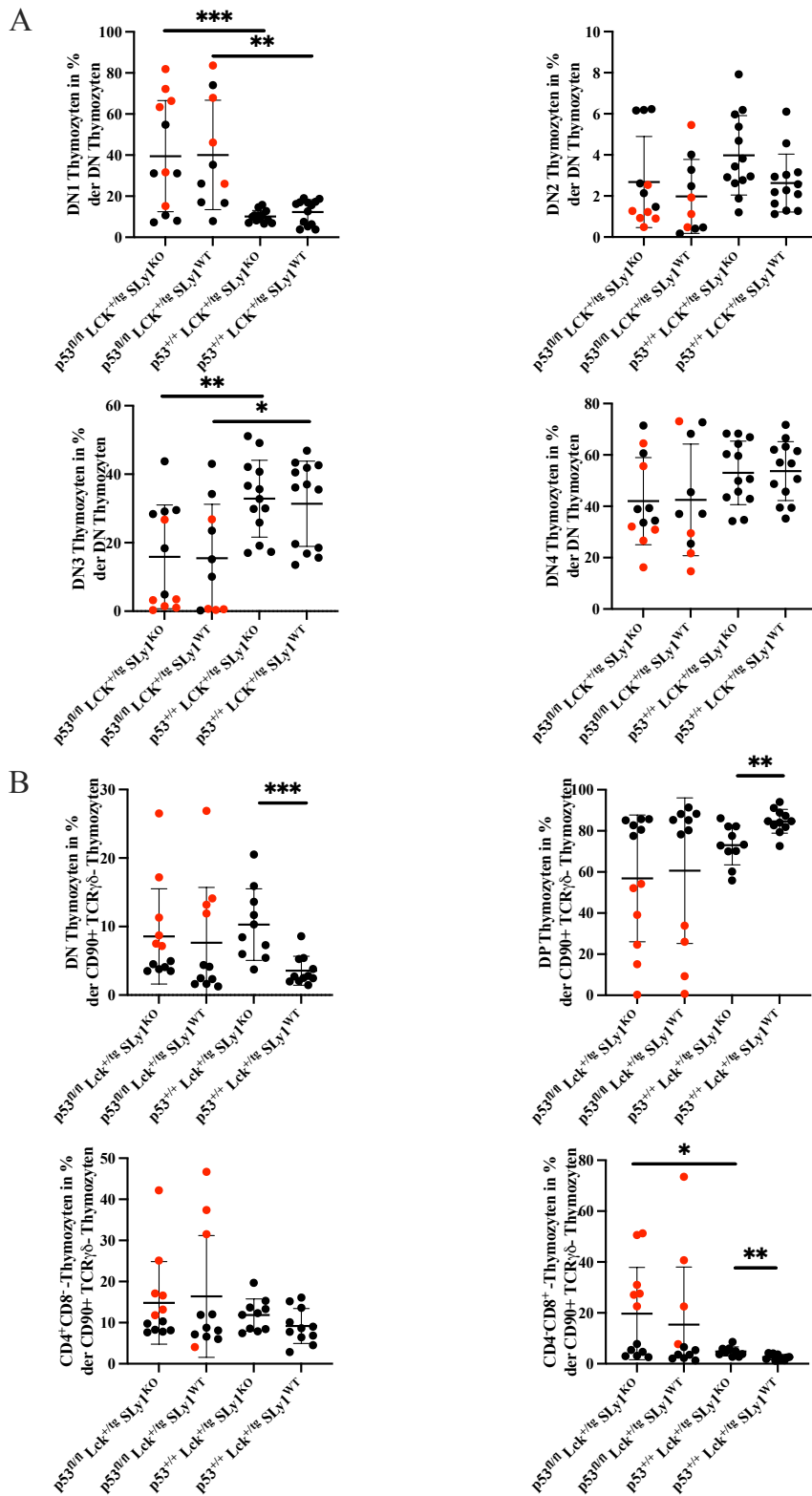


Abbildung 32. Thymozytenpopulationen in p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}- und p53^{+/+} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Tieren im Alter von 25 Wochen

(A) Anteil der DN1-4 Thymozyten an den DN Thymozyten in %

(B) Anteil der DN, DP, CD4⁺ SP und CD8⁺ SP Thymozyten an allen CD90⁺ TCRγδ⁻ Thymozyten

Die Graphen zeigen Mittelwerte ± SD von n=10-12 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Rot markiert sind Proben mit großen Anteilen DN Thymozyten und geringen Anteilen DP Thymozyten (entspricht der Rotmarkierung in Abb. 29, 33, 41, 42 und 43).

3. Ergebnisse

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung eines der Tiere mit verändertem Anteil von DN und DP Thymozyten ist in Abschnitt 3.6.1 in Abbildung 37C dargestellt. Die Thymozyten dieser Maus haben einen deutlich erhöhten Anteil SP Thymozyten und DN Thymozyten, sowie einen deutlich verringerten Anteil DP Thymozyten. Des Weiteren fällt auf, dass sich nur ein geringer Teil der Thymozyten im an gesunden Tieren gewählten „Lymphozyten“-Gate befindet (vgl. Abb. 6), sodass wir vermuten, dass sich bei diesen Tieren eine Entartung entwickelte. Vor allem im Bezug auf ihre SSC-Werte unterscheiden sich die Proben der Tiere mit hohen DN und geringen DP Thymozytenanteilen von den restlichen Proben (s. Abb. 33).

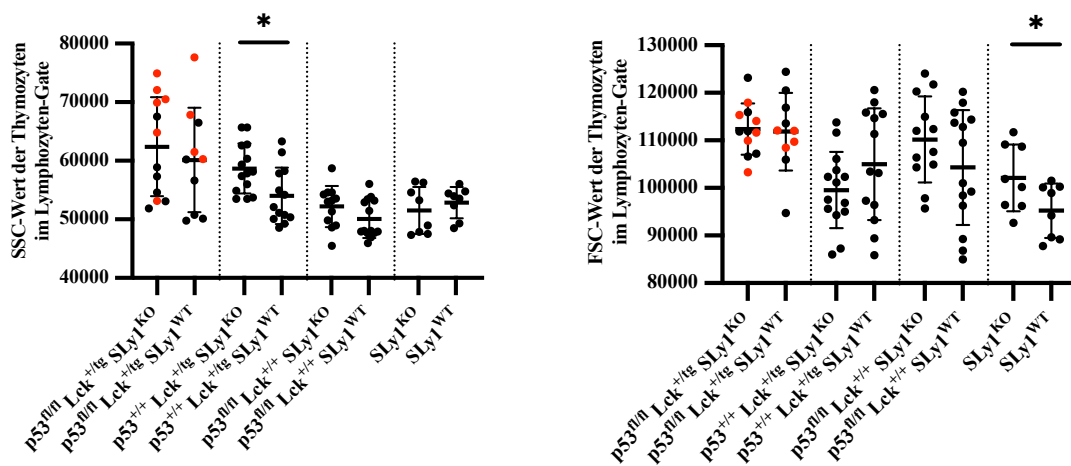


Abbildung 33. SSC- und FSC-Werte der Thymozyten in allen Kontrollgruppen

Durchschnittliche SSC- (links) und FSC-Werte (rechts) entsprechend Zellgranularität und -größe der Lymphozyten der Thymusproben

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=8-14 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,05. Signifikanzen sind nur angegeben bei Tieren mit gleichem p53- und Lck-Cre-Status. Rot markiert sind Proben mit großen Anteilen DN Thymozyten und geringen Anteilen DP Thymozyten (entspricht der Rotmarkierung in Abb. 29, 32, 41, 42 und 43).

Insgesamt kann bei der Verteilung der Thymozytenpopulationen ein SLy1-abhängiger Effekt in beiden Altersgruppen beobachtet werden, wohingegen die Folgen der p53-Defizienz erst in der älteren Gruppe erscheinen. Hier fällt vor allem eine Streuung der Messwerte und eine unterschiedliche Verteilung der Anteile von DN und DP Thymozyten auf.

3.5.5 Veränderungen in den Splenozyten- und Lymphknoten-Populationen

Lymphknoten und Milz sind sekundäre lymphatische Organe und dienen der Immunabwehr. B- und T-Zellen warten hier auf ihre Aktivierung durch Erreger, die ins Blut gelangen konnten. Die CD19⁺-B-Zellen werden im Knochenmark gebildet und sind wie die CD90⁺-T-Zellen Teil des spezifischen Immunsystems. Die T-Zellen entstammen dem Thymus und können in die CD4⁺-T-Helfer-Zellen und die zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen untergliedert werden.

Im Alter von 10 Wochen lagen außer einer leichten Erhöhung des B-Zell-Anteils bei den p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Proben im Vergleich zu den p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Proben keine Unterschiede im Anteil von B- im Vergleich zu den T-Zellen vor (s. Abb. 34). Bei den 25-Wochen-alten Tieren zeigten sich erhöhte Anteile von T-Zellen in Milz und Lymphknoten der p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Tiere (s. Abb. 35).

Der Anteil der CD4⁺-T-Zellen in der Milz war bei den p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Mäusen im Alter von 10 Wochen reduziert und der Anteil der CD8⁺-T-Zellen in Milz und Lymphknoten im Vergleich zu den p53^{+/+} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Vergleichstieren erhöht (s. Abb. 34). Im Alter von 25 Wochen zeigt sich hingegen ein erhöhter Anteil CD8⁺-T-Zellen in p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Milzen und -Lymphknoten im Vergleich zum entsprechenden Anteil in p53^{+/+} Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Milzen und -Lymphknoten, während sich bei den SLy1^{WT}-Proben diese Unterschiede nicht ergeben.

In den Milzen und inguinalen Lymphknoten der 25 Wochen alten Tiere sind die Anteile der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen SLy1-abhängig verändert (s. Abb. 35C/D). SLy1^{KO}-Mäuse haben einen verringerten Anteil CD4⁺-T-Zellen und einen erhöhten Anteil CD8⁺-T-Zellen in Milz und Lymphknoten unabhängig von der p53-Expression. Diese Unterschiede sind bei den Mäusen im Alter von 10 Wochen nicht statistisch signifikant vorhanden (s. Abb. 34C/D).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in beiden Altersgruppen SLy1^{KO}-typische Veränderungen in Milz- und Lymphknoten-Populationen zu beobachten sind, während sich durch die p53-Defizienz der T-Zellen keine Konsequenzen für die Verteilung der Lymphozyten-Populationen in den peripheren lymphatischen Organen ergeben.

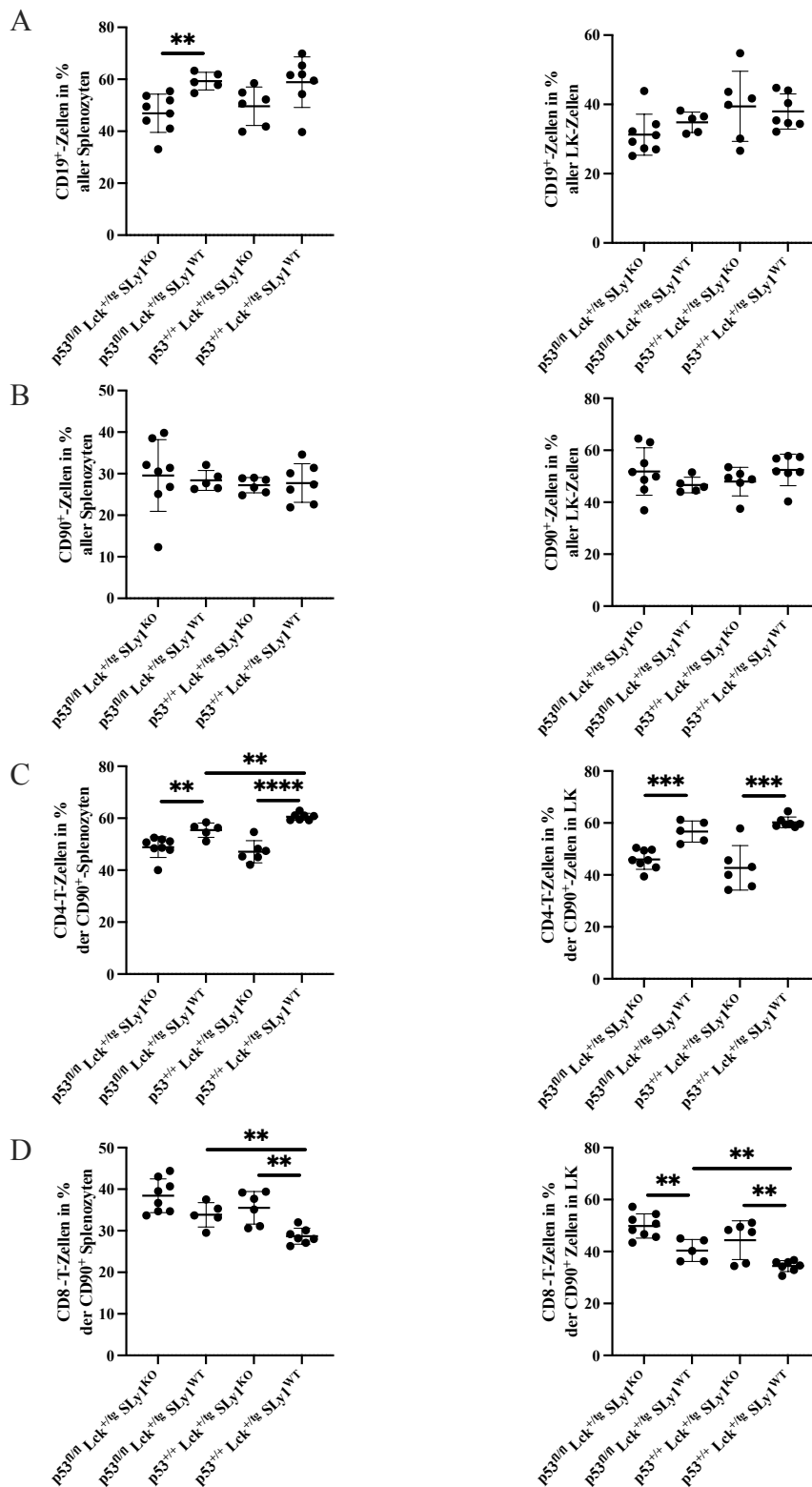


Abbildung 34. Lymphozytenpopulationen in Milz und inguinalen LK von $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Tieren im Alter von 10 Wochen

(A) Anteil $CD19^+$ -Zellen in Milz und inguinalen LK

(B) Anteil $CD90^+$ -Zellen in Milz und inguinalen LK

(C) Anteil $CD4^+$ -T-Zellen an $CD90^+$ -Zellen in Milz und inguinalen LK

(D) Anteil $CD8^+$ -T-Zellen an $CD90^+$ -Zellen in Milz und inguinalen LK

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von $n=5-8$ Mäusen, ungepaarter t-Test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

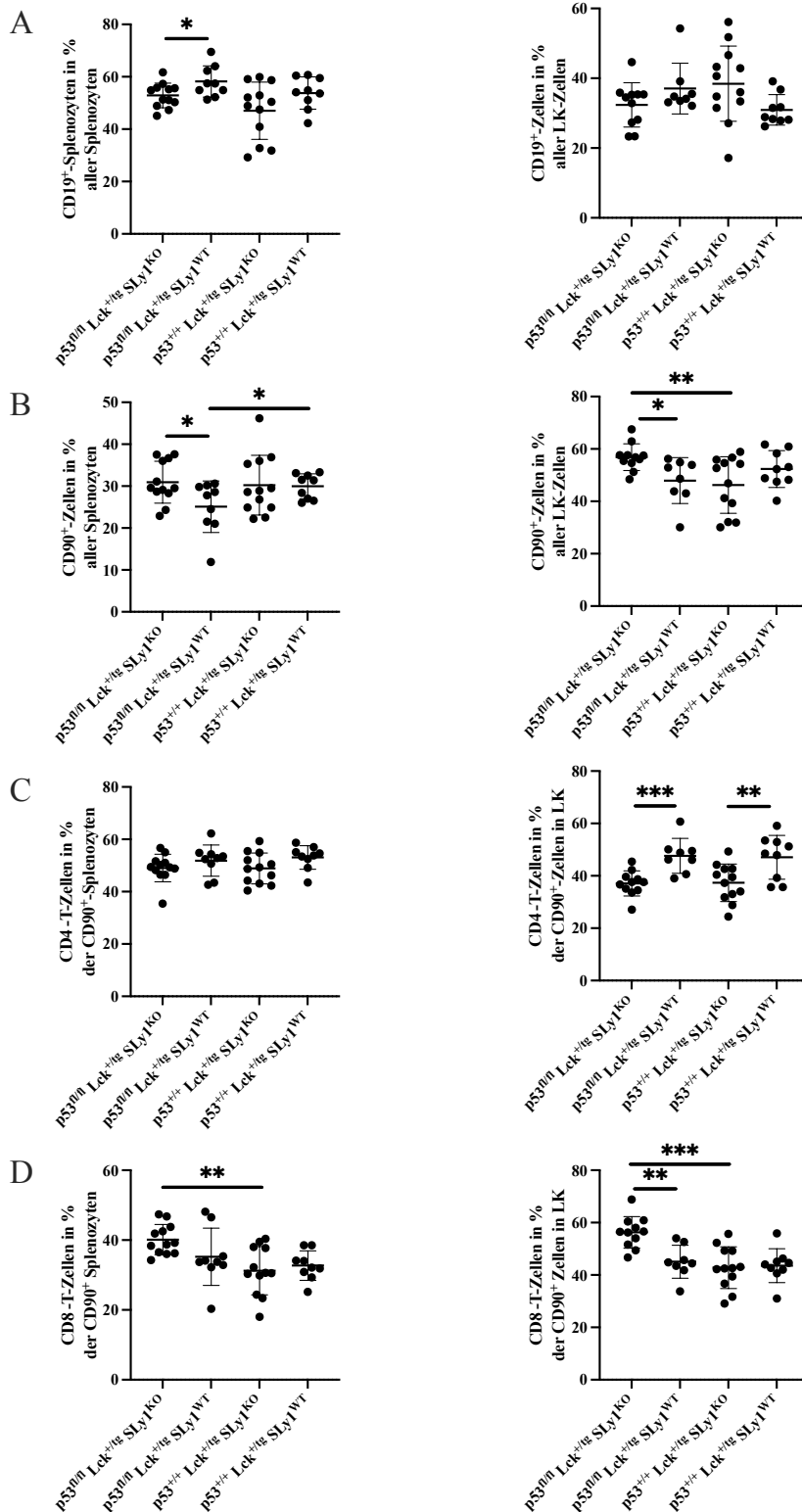


Abbildung 35. Lymphozytenpopulationen in Milz und inguinalen LK von p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Tieren im Alter von 25 Wochen

(A) Anteil CD19⁺-Zellen in Milz und inguinalen LK

(B) Anteil CD90⁺-Zellen in Milz und inguinalen LK

(C) Anteil CD4⁺-T-Zellen an CD90⁺-Zellen in Milz und inguinalen LK

(D) Anteil CD8⁺-T-Zellen an CD90⁺-Zellen in Milz und inguinalen LK

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=9-12 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.6 Eingeschränktes Überleben und Tumorentwicklung bei p53-Defizienz

Eine FACS-Analyse der lymphatischen Organe 50-Wochen-alter Mäuse mit p53-Defizienz entsprechend des Vorgehens bei den 10- und 25-Wochen-alten Mäusen war geplant, wurde jedoch bei deutlich reduziertem Überleben der Tiere mit T-Zell-spezifischer p53-Defizienz nicht durchgeführt.

Einige p53^{fl/fl} Lck^{+tg}-Tiere sind mit sichtbaren Tumoren axillär und inguinal oder eingeschränktem Allgemeinzustand mit sichtbaren Atembemühungen aufgefallen und konnten präpariert werden. Hier waren deutliche Raumforderungen der Thymi bzw. von Lymphknoten und Milz sichtbar (s. Abb. 36). In Abbildung 36A sind Thymus, Milz und inguinale Lymphknoten einer Maus mit deutlicher Vergrößerung des Thymus (einem Thymom entsprechend) und leichter Vergrößerung der Milz dargestellt. In Abbildung 36B sieht man die Lymphorgane einer Maus mit deutlich vergrößerter Milz, sowie deutlich vergrößerten inguinalen und axillären Lymphknoten (einem Lymphom entsprechend). Der Thymus dieser Maus erscheint nicht vergrößert. In den Gruppen ohne p53-Defizienz sind keine Thymome oder Lymphome aufgetreten.

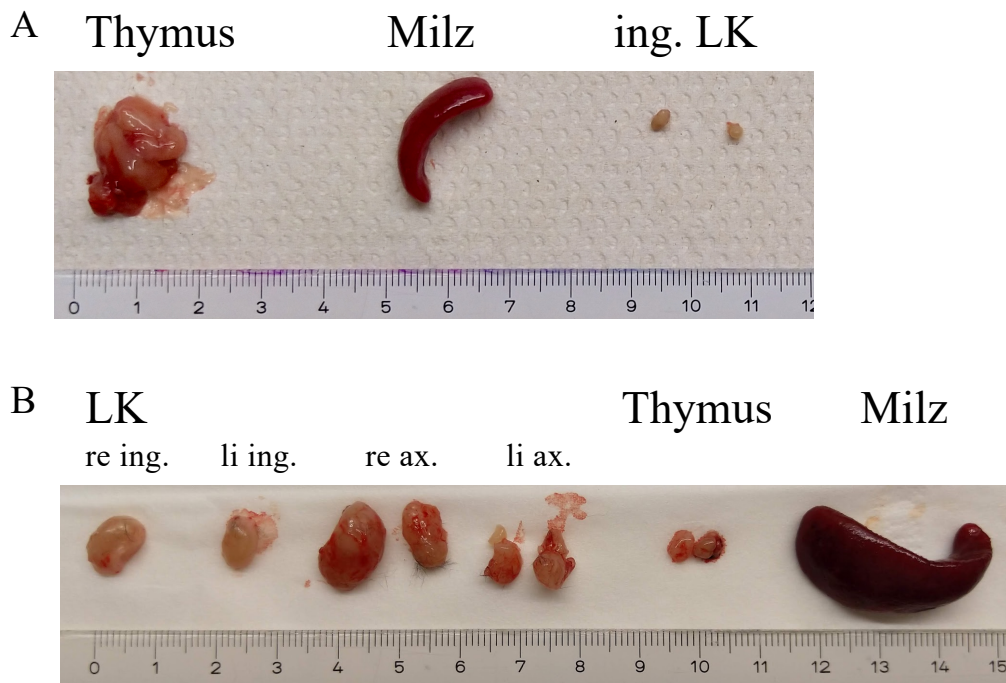


Abbildung 36. Thymom- und Lymphomphänotyp p53-defizienter Tiere

(A) Thymus (einem Thymom entsprechend), Milz und inguinale Lymphknoten einer 17-Woche alten p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Maus

(B) Axilläre und inguinale Lymphknoten (einem Lymphom entsprechend), Thymus und Milz einer 33-Woche alten p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Maus

3.6.1 Durchflusszytometrische Untersuchung entarteter Zellen

Ein Teil der Tiere mit diesen Phänotypen wurde entsprechend den Untersuchungen an gesunden Tieren per Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei fiel auf, dass sich die Zellen der betroffenen Tiere nicht mit der Antikörper-Färbung zuordnen ließen. In Abbildung 37A/B sind die durchflusszytometrische Untersuchung der Thymozytenpopulationen zweier solcher Mäuse dargestellt. Die Thymozyten einer Maus mit vergrößertem Thymus (s. Abb. 37A), ließen sich nicht nach ihrer CD4- und CD8-Expression auftrennen. Bei einer Maus mit Lymphom-Phänotyp und makroskopisch gesund erscheinendem Thymus ließen sich nur sehr wenige Zellen mit dem CD90.2-Antikörper anfärben (s. Abb. 37B). In Abbildung 37C sind die Ergebnisse der Untersuchung der Thymozytenpopulationen einer gesund erscheinenden Maus gezeigt, welche jedoch deutlich von den üblichen Werten abweichende Anteile der DN, DP und SP Thymozyten zeigen (rot markiert in Abb. 32).

Lymphknoten- und Milzzellen dieser Tiere wurden ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert (s. Abb. 38). Bei der Maus mit vergrößertem Thymus (A) fiel eine Zellpopulation mit Expression von CD19 und CD90.2 auf, sowie ein großer Anteil der T-Zellen, die sich weder den CD4- noch den CD8-T-Zellen zuordnen ließen. In dem untersuchten Tier mit vergrößerter Milz und Lymphknoten (B) sind nur ein sehr geringer Anteil der Zellen über den CD90.2-Rezeptor den T-Zellen zuzuordnen, so dass auf eine Auftrennung nach CD4- und CD8-Expression verzichtet wurde.

In allen diesen Proben aus Thymus, Lymphknoten und Milz fällt auf, dass bei der Darstellung nach Lichtstreuungseigenschaften (d.h. FSC- und SSC-Parameter) (s. Abb. 37 und 38, jeweils linke Spalte) eine große Streuung der Zellen mit teilweise deutlich über die Grenzen des an gesunden Lymphozyten festgelegten Lymphozytengates (s. Abb. 6 und 7) hinausgehen. Auch bei den Thymusproben der $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Tiere mit großer Abweichung in DN und DP Anteilen (in Abb. 29, 32, 33, 42 und 43 rot markiert) sind die SSC-Werte erhöht.

3. Ergebnisse

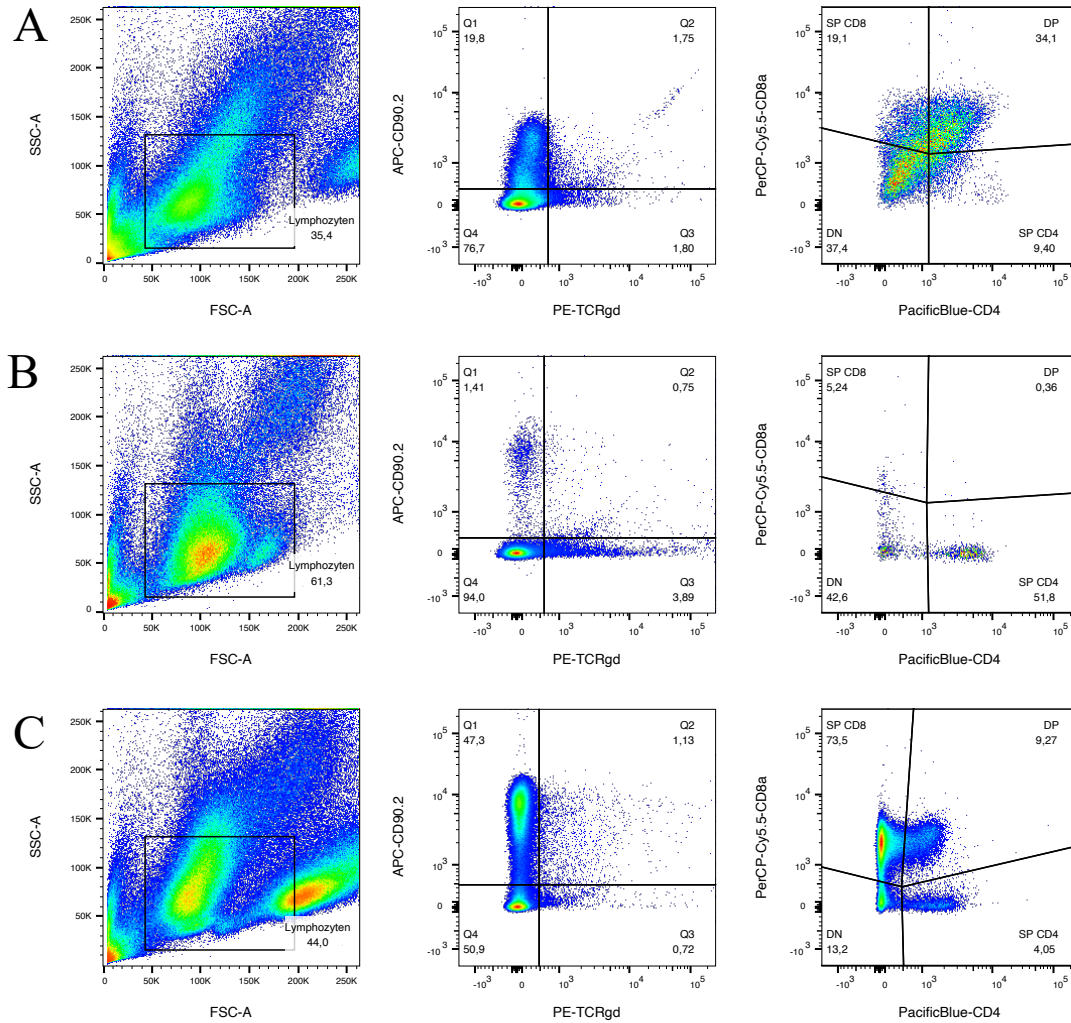


Abbildung 37. Durchflusszytometrische Untersuchung der Thymozytenpopulationen bei Entartung

Dargestellt sind die Gesamthymozyten, die Auftrennung nach Expression von CD90.2 und TCR $\gamma\delta$, sowie die Auftrennung nach Expression von CD4 und CD8 von einer

(A) Maus mit deutlich vergrößertem Thymus

(B) Maus mit vergrößerter Milz und Lymphknoten

(C) p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Maus ohne auffälligen Phänotyp, die im Rahmen der Versuche an 25-Wo-alten Mäusen untersucht wurde

3. Ergebnisse

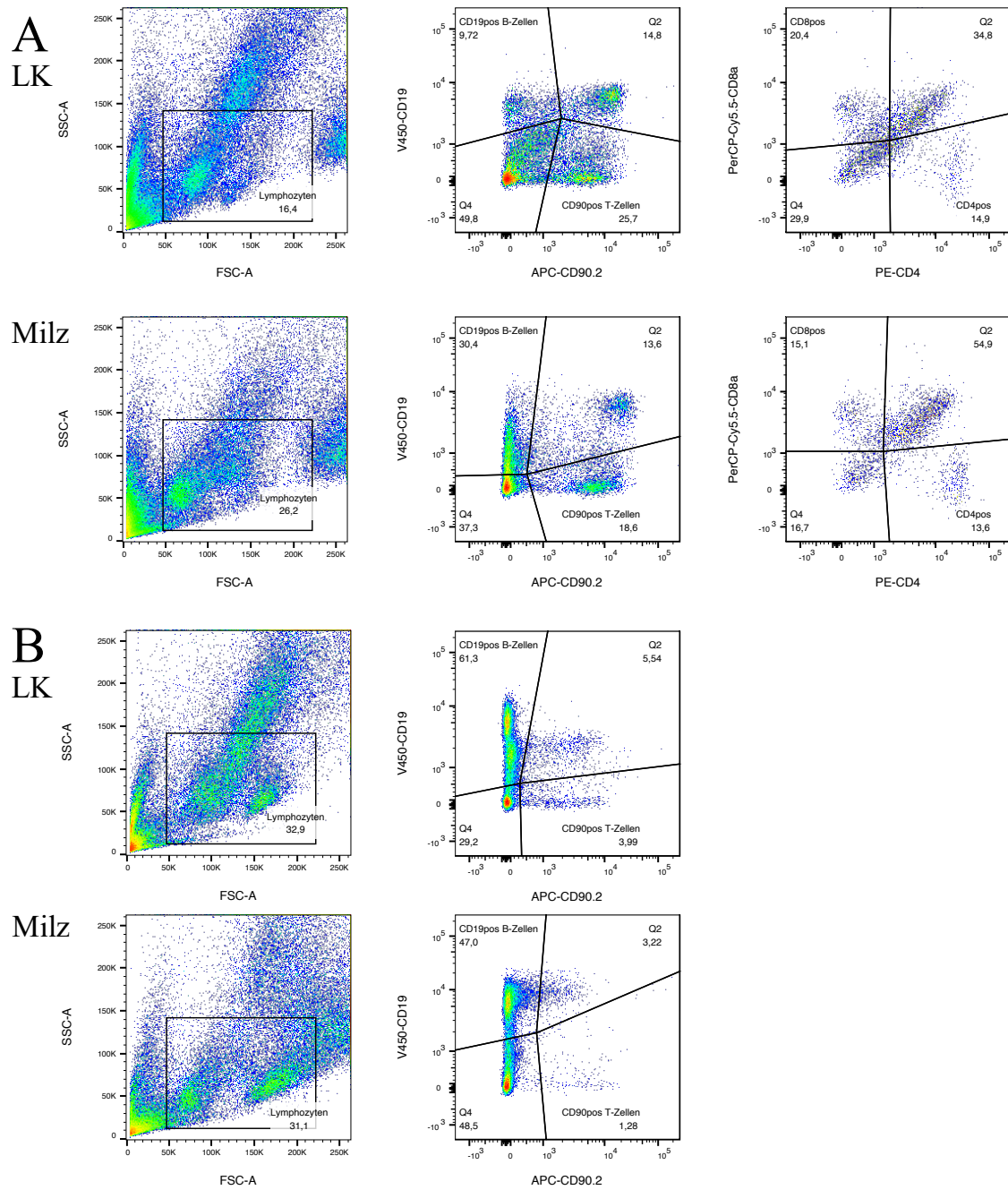


Abbildung 38. Durchflusszytometrische Untersuchung der LK- und Milz-Zellen bei Entartung

Dargestellt sind die LK- und Milzzellen, die Auftrennung nach Expression von CD90.2 und CD19, sowie die Auftrennung der T-Zellen nach Expression von CD4 und CD8 von einer (A) Maus mit deutlich vergrößertem Thymus (B) Maus mit vergrößerter Milz und Lymphknoten

3.6.2 Überlebensanalyse bei p53-Defizienz

Um die Anfälligkeit der Gruppen für letale Tumorleiden zu untersuchen, wurde retrospektiv das Überleben der Tiere bis zum Alter von 50 Wochen analysiert und in Abbildung 39 dargestellt. Von den $p53^{+/+}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO}$ - und $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/+}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Tiere sind weniger als 25% vor Erreichen des Endes des Untersuchungszeitpunkts mit 50 Wochen verstorben. Von den $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{KO}$ -Tieren haben 20% und von den $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT}$ -Tieren keines das Alter von 50 Wochen erreicht. Für diese Analyse wurden Tiere, die für die Versuche getötet wurden zensiert, so dass sich die Gesamtzahl der Tiere, auf die sich der Anteil verstorbener Tiere bezieht, im Verlauf der Zeit reduziert. Eine Übersicht über Zensuren und Tode befindet sich in Tabelle 23, eine genaue Aufstellung von Zensurzeitpunkten sowie Todeszeitpunkten und -ursachen sind im Anhang in Tabelle 24 aufgeführt.

$p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT}$ -Tiere hatten in dieser Untersuchung die geringsten Überlebenschancen und erreichten ein medianes Überleben von 27 Wochen. Bei den $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{KO}$ -Tieren lag dieses bei 39 Wochen. Die Überlebenskurven wurden mit einem Log-Rank-Test verglichen und unterschieden sich signifikant ($p=0,0486$). Außerdem unterschieden sich die Überlebenskurven der $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT}$ - und $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{KO}$ -Gruppen jeweils signifikant zu ihren $p53^{+/+}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Vergleichsgruppen (s. Anhang Tab. 25).

3. Ergebnisse

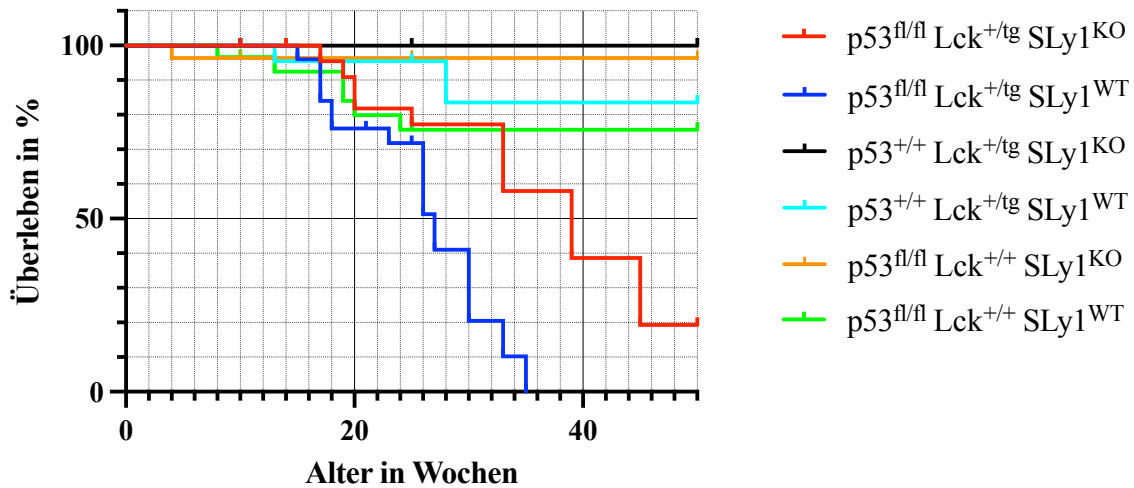


Abbildung 39. Überleben von $p53^{fl/fl}$ Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}- im Vergleich zu $p53^{+/+}$ Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}- und $p53^{fl/fl}$ Lck^{+/+} SLy1^{WT/KO}-Tieren

Der Graph zeigt das Überleben von je n=25-31 Mäusen bis zum Alter von 50 Wochen. Tiere, die zum geplanten Versuch im Alter von 10, 25 und 50 Wochen getötet wurden, wurden zensiert (s. Tab. 23). Tiere, welche wegen ihres schlechten Allgemeinzustands präpariert wurden, gelten als verstorben. Eine Aufschlüsselung der einzelnen Todeszeitpunkte und -ursachen befindet sich im Anhang in Tab. 24.

Ergebnisse der statistischen Auswertung mit Log-Rank-Test sind im Anhang in Tab. 25 angegeben.

Tabelle 23. Überleben von $p53^{fl/fl}$ Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Tieren

Tode entsprechen verstorbenen Tieren und solchen, welche wegen ihres schlechten Allgemeinzustands präpariert wurden. Zensuren entsprechen dem Ausscheiden der Tiere aus der Überlebensstatistik, wegen der Präparation für Versuche im Alter von 10, 25 und 50 Wochen.

Eine Aufschlüsselung der einzelnen Todeszeitpunkte und -ursachen befindet sich im Anhang in Tab. 24.

Genotyp	n-Zahl	Tode	Zensuren	medianes Überleben in Wo
$p53^{fl/fl}$ Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	30	7	23	39
$p53^{fl/fl}$ Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	31	15	16	27
$p53^{+/+}$ Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	25	0	25	Das natürliche Überleben dieser Tiere kann nicht beurteilt werden, da der Endpunkt des Versuches mit 50 Wochen erreicht wurde.
$p53^{+/+}$ Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	29	2	27	
$p53^{fl/fl}$ Lck ^{+/+} SLy1 ^{KO}	28	1	27	
$p53^{fl/fl}$ Lck ^{+/+} SLy1 ^{WT}	30	6	24	

4

Diskussion

4.1 Aktivierung des p53-Signalwegs in SLy1^{KO}-Thymozyten

Der p53-Signalweg schützt den Organismus als Ganzes vor den Folgen von Zellen mit DNA-Schäden und die einzelne Zelle vor dem Entstehen dieser und wirkt dadurch als zentraler Tumorsuppressor (Klusmann et al. 2016). Wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, kann die p53-Expression über den DDR-Signalweg, sowie über die Mdm2-abhängige Ubiquitylierung reguliert werden. Folge einer Hochregulation von p53 sind Apoptose und Seneszenz der Zellen.

Ein Zusammenhang zwischen einer SLy1-Defizienz und der Hochregulation des p53-Signalwegs wurde zunächst von Isabel Kloos (2021) im Rahmen einer erhöhten p53-Expression in SLy1^{KO}-DN Thymozyten in einem Leukämie-Array festgestellt. Bei nachfolgenden qPCR-Untersuchungen konnte die Hochregulation in SLy1^{KO}-Gesamthymozyten bestätigt werden, in DN und DP Thymozyten jedoch nicht. Bei Untersuchungen des DDR-Signalwegs auf mRNA- und Protein-Ebene in SLy1^{KO}-Thymozyten hat Lena Gruber (2021) eine vermehrte Expression der DDR-Proteine und von p53 in SLy1^{KO}-Thymozyten beobachten können. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob dies auch ein erhöhtes Vorliegen der phosphorylierten Proteine nach sich zieht.

Die beschriebene vermehrte Expression der DDR-Proteine konnte für ATM und ATR bestätigt werden, für Chk1, Chk2, und p53 jedoch nicht signifikant. Bei Kumulation der Daten von Lena Gruber (2021) und aus der vorliegenden Arbeit, können jedoch auch für diese Proteine signifikante Erhöhungen festgestellt werden (s. Abb. 40). Die Hochregulation von ATM und ATR war mit einer jeweils 1,8fachen Expression in SLy1^{KO}-Thymozyten am stärksten.

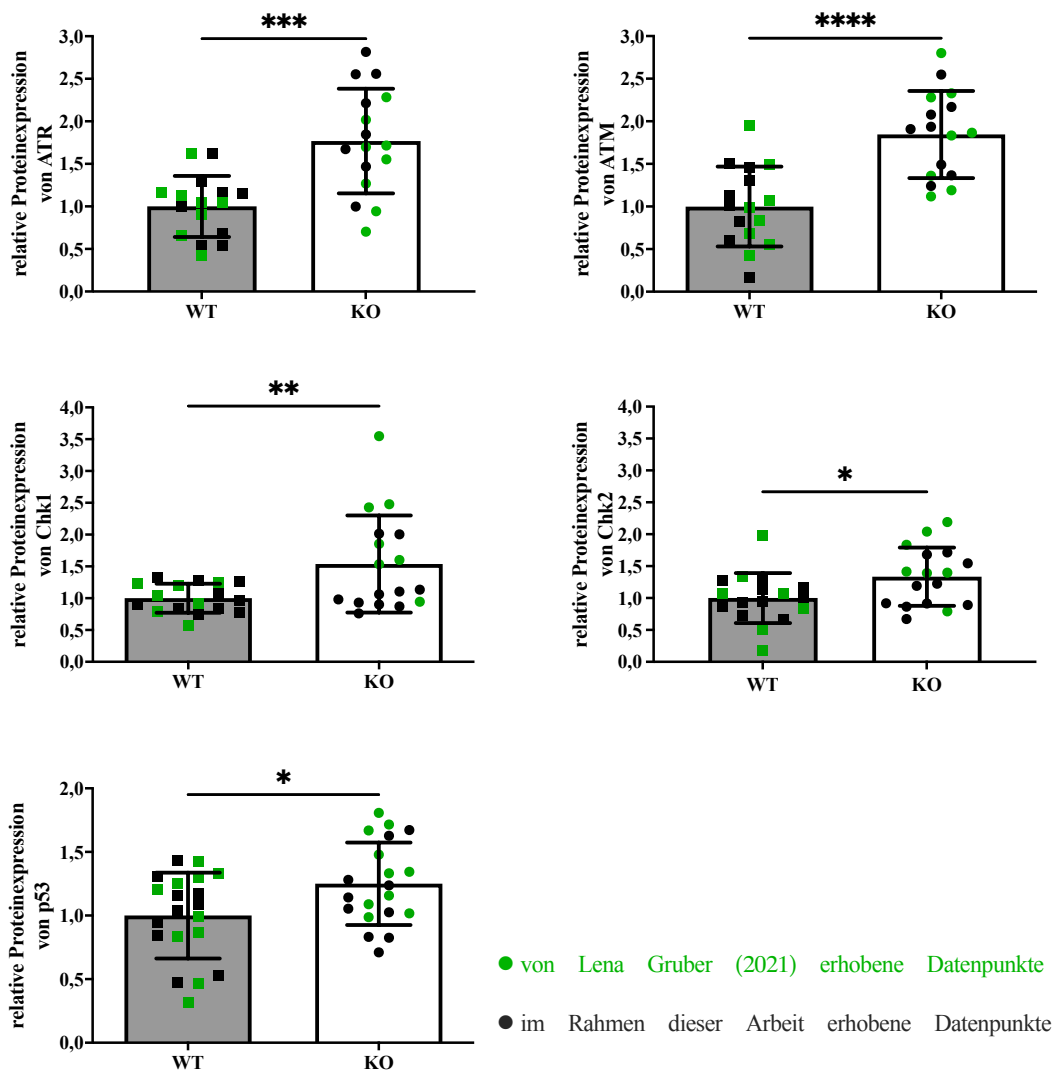


Abbildung 40. Proteinexpression der DDR-Kinasen und p53 in SLy1^{KO}-Thymozyten
Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=16-20 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

In grün dargestellte Datenpunkte wurden im Rahmen der Arbeit von Lena Gruber (2021) erhoben.

Die beobachtete vermehrte Expression von ATM bei anteilig gleichbleibender Phosphorylierung, spricht dafür, dass das vermehrt vorliegende aktive ATM Resultat einer vermehrten Transkription oder Translation ist. Dafür sprechen auch die von Lena Gruber (2021) gemessenen erhöhten ATM-mRNA-Level in SLy1^{KO}-Thymozyten. Auch bei der ATR-Expression deutet die erhöhte Proteinexpression bei gleichbleibender Phosphorylierung auf eine SLy1-abhängige Veränderung in der ATR-Transkription oder einen Einfluss des SLy1-Knockouts auf die Aktivierung des Signalwegs hin.

Sethy et al. (2018) schlagen Smarcal1 und BRG1 als potenzielle Transkriptionsfaktoren für ATM und ATR vor. Außerdem ist p18 (auch EEF1EF oder AIMP3) als Bestandteil des tRNA-Synthetase-Komplex an der Translation von ATM beteiligt (Park et al. 2005).

p18^{-/-}-Tiere sind nicht lebensfähig, in p18^{+/-}-Tieren werden eine spontane Tumorbildung, vermehrte Proliferation und eine verringerte p53-Expression beschrieben (Park et al. 2005). Eine hemmende Interaktion von SLy1 mit p18 wäre also eine mögliche Erklärung für die beobachteten Veränderungen im p53-Signalweg der SLy1^{KO}-Thymozyten.

Alternativ ist ein möglicher Grund für die deutlich erhöhte Expression von ATM und ATR eine durch den SLy1-Knockout induzierte Aktivierung des DDR-Signalwegs durch die entsprechenden DNA-Schäden. Hier ist jedoch unklar, wieso dieser Mechanismus nicht gleichzeitig auch zur vermehrten Phosphorylierung führen würde.

Die verstärkte Phosphorylierung von p53 an Ser15 in SLy1^{KO}-Thymozyten kann Folge der erhöhten Expression und Phosphorylierung von ATM sein. Da diese Phosphorylierung zu einem vermindertem Abbau von p53 durch Mdm2 führt, kann davon ausgegangen werden, dass in SLy1^{KO}-Thymozyten im Vergleich zu Wildtyp-Thymozyten, mehr aktives p53 vorhanden ist.

Bei der Expression und Phosphorylierung von Mdm2 wurden keine Unterschiede zwischen SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten und -T-Zellen festgestellt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass SLy1 nicht direkt die Expression oder konstitutive Aktivierung durch Akt beeinflusst. Allerdings kann durch die durchgeführten Versuche nicht bewertet werden, ob Mdm2 als Endstrecke des pStat5- und des ATM-Signalwegs indirekt SLy1-abhängig in seiner Bindung an p53 eingeschränkt ist.

Auffällig ist, dass in den SLy1^{KO}-Thymozyten phosphoryliertes Stat5 hoch reguliert ist (Kloos 2021), bei gleichzeitig erhöhter Expression von p53. Ren et al. (2016) zeigen, dass die Phosphorylierung von Stat5 über die Herunterregulation von NPM1 zu einer Mdm2-abhängigen Herunterregulation von p53 führt. Dieser Mechanismus scheint in SLy1^{KO}-Thymozyten gestört zu sein. Ein möglicher Mechanismus für die Hochregulation von p53 wäre also auch eine Wirkung von SLy1 auf die Interaktion von NPM1 und Mdm2.

Reis et al. (2009) haben in SLy1^{KO}-DN Thymozyten erhöhte Anteile apoptotischer Zellen gemessen. Dass in der qPCR eine erhöhte mRNA-Expression von Noxa beobachtet wurde, entspricht dem erhöhten Niveau von aktivem p53. Ob jedoch die SLy1^{KO}-Thymozyten durch die Aktivierung des p53-Signalwegs eher zur Apoptose oder zur Seneszenz neigen, kann hierdurch nicht verstanden werden, da eine Erhöhung der für Seneszenz typischen mRNA p21 ebenfalls in den SLy1^{KO}-Thymozyten gemessen wurde (Gruber 2021).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Hochregulation des p53-Signalwegs bestätigt werden und erstmalig beobachtet werden, dass sich die Hochregulation von p53 und ATM auch auf das jeweilige phosphorylierte Protein bezieht. Eine veränderte Expression oder Phosphorylierung von Mdm2 als Hauptantagonist von p53 und Bindeglied des p53- und

IL-7R-Signalwegs konnte nicht beobachtet werden, wobei dies keinen Ausschluss einer reduzierten Interaktion erlaubt.

4.2 Aktivierung des IL-7R-Signalwegs in SLy1^{KO}-Thymozyten

Der IL-7R-Signalweg ist für Überleben und Proliferation der Thymozyten wichtig. Der IL-7-Rezeptor wird stadienabhängig exprimiert und ist vor allem in den DN1-3 Thymozyten vorhanden (Elkassar und Gress 2010). Isabel Kloos (2021) hat mittels qPCR gezeigt, dass der IL-7-Rezeptor in den SLy1^{KO}-Thymozyten überexprimiert wird und dies an einer vermehrten Expression in den DN Thymozyten liegt. Das physiologische Herunterregulieren der IL-7R-Expression beim Übergang vom DN zu DP Stadium findet sowohl in den WT- als auch in den SLy1^{KO}-Zellen statt (Kloos 2021). Im Gegensatz hierzu konnte in durchflusszytometrischen Versuchen gezeigt werden, dass die IL-7R α -Expression zwar in den Gesamthymozyten erhöht ist, bei den SLy1^{KO}-DN Thymozyten jedoch im Gegensatz zur Kontrollgruppe reduziert. Bei den SLy1^{KO}-DP Thymozyten konnte hingegen in der Durchflusszytometrie eine erhöhte Expression gezeigt werden (nicht publiziert, Daniel Schäll).

Außerdem hat Isabel Kloos (2021) beobachtet, dass in SLy1^{KO}-Thymozyten vermehrt Stat5b-mRNA vorliegt und Stat5 auf IL-7-Stimulation hin stärker phosphoryliert wird. Bcl-2-mRNA liegt als eines der Endprodukte des IL-7-Signalwegs in den SLy1^{KO}-Thymozyten ebenfalls vermehrt vor (Schäll 2015). Bei einer FACS-Analyse lässt sich die vermehrte Expression von Bcl-2 sowohl in DN und DP Thymozyten, sowie auch in SP Thymozyten feststellen (Schäll 2015).

Jak1 und Jak3 sind das Bindeglied zwischen der Stimulation des IL-7-Rezeptors durch das entsprechende Zytokin und der aktivierenden Phosphorylierung von Stat5. Die vermehrte Expression von Jak1, die in der vorliegenden Arbeit in SLy1^{KO}-Thymozyten beobachtet wurde (s. Abb 8), entspricht dieser Hochregulierung des IL-7R-Signalwegs. Dass Jak3 nicht hoch reguliert ist und die Phosphorylierung reduziert ist (s. Abb. 9), könnte eine kompensatorische Gegenregulation sein. Da auch die hemmende Phosphorylierung an Tyr981 des Jak3-Proteins neben der aktivierenden Phosphorylierung an Tyr980 notwendig ist für die Bindung des entsprechenden Antikörpers, ist das Fehlen dieser hemmenden Phosphorylierung als Bestandteil der Hochregulierung des Signalwegs eine weitere Erklärung für die reduzierte Phosphorylierung.

Dass bei den DN Thymozyten keine Veränderungen in der Jak1- und Jak3-Expression und -Phosphorylierung beobachtet wurden (s. Abb. 10 und 11), erlaubt die Vermutung, dass die

Beobachtung der Hochregulierung des IL-7R-Signalwegs in SLy1^{KO}-Thymozyten an der Hochregulierung in den DP Thymozyten und nicht an einer Hochregulierung in den DN Thymozyten liegt. Dies entspricht den durchflusszytometrisch bestimmten Veränderungen der IL-7R α -Expression in den SLy1^{KO}-Thymozyten (nicht publiziert, Daniel Schäll).

Obwohl der anti-apoptische IL-7R-Signalweg in SLy1^{KO}-Thymozyten überaktiviert ist, ist die Zahl der Thymozyten reduziert. Hong et al. (2012) schlagen eine altruistische Herunterregulation des IL-7-Rezeptors in DP Thymozyten vor, die in den SLy1^{KO}-Thymozyten möglicherweise gestört ist. Eine Erklärung für die reduzierte Thymozytenzahl ist, dass die den IL-7-Rezeptor überexprimierenden DP Thymozyten zu viel des Zytokins in Anspruch nehmen und die anderen Thymozyten dadurch an einer adäquaten Versorgung hindern.

Generell ist jedoch fraglich, inwiefern die durch die Analyse von Gesamthymozyten erworbenen Kenntnisse zu SLy1^{KO}-Thymozyten dadurch beeinflusst sind, dass die Gewichtung der einzelnen Thymozyten durch das Fehlen von SLy1 geprägt ist (Reis et al. 2009).

4.3 Mögliche Ursachen der Veränderungen in der Signalweg-Aktivierung

Ein möglicher Grund für die beobachteten Veränderungen in der Expression dieser beiden Signalwege ist eine SLy1-abhängige Regulation der IL-7R- oder Notch-Rezeptor-Expression auf Stimulation des T-Zell-Rezeptors hin.

Schäll et al. (2015) konnten einerseits eine TZR-abhängige Translokation von SLy1 in das Zytoplasma sowie eine Bindung an 14-3-3 β - und 14-3-3 τ -Proteine in peripheren T-Zellen aus der Milz zeigen. Von Untersuchungen an Thymozyten wissen wir, dass eine dem Notch-Signal folgende Phosphorylierung von SLy1 vom Vorhandensein eines präTZR-Signals abhängig ist (Reis et al. 2009). Reis et al. interpretieren dies als integrative Funktion des Notch und präTZR-Signalwegs von SLy1 in DN3 Thymozyten. Die TZR-abhängige Translokation von SLy1 in das Zytoplasma in Thymozyten ist noch nicht untersucht, ließe aber, falls sie sich bestätigen lässt, eine regulative Funktion im Zusammenhang mit der β -Selektion vermuten.

Als Adapterprotein ist eine mögliche Funktion von SLy1 eine über ein 14-3-3-Protein adaptierte Bindung an Transkriptionsfaktoren. 14-3-3-Proteine können eine Translokation vom Nukleus in das Zytoplasma stabilisieren und dadurch auf den Zellzyklus einwirken (Eckardt 2001; Muslin und Xing 2000). Bei der erstmaligen TZR-Aktivierung im Rahmen der β -Selektion könnte SLy1 gemeinsam mit einem Transkriptionsfaktor in das Zytoplasma translozieren. Das Gen könnte nachfolgend nicht weiter abgelesen werden und wird im DP Stadium nicht weiter transkribiert. Bei Fehlen des SLy1-Proteins wie in den untersuchten

SLy1^{KO}-Thymozyten, wäre eine mögliche Erklärung für die beobachteten Veränderungen, dass das IL-7-Rezeptor-Gen im Rahmen der β -Selektion nicht herunterreguliert wird und in den DP Thymozyten weiter abgelesen wird. Die Hochregulierung des p53-Signalwegs wäre in diesem Modell eine gegenregulatorische Maßnahme gegen die übermäßige proliferative Wirkung des IL-7-Rezeptor-Signalwegs in den DP Thymozyten.

Die Transkription des IL-7-Rezeptors in Thymozyten unterliegt einer komplexen und bisher nicht vollständig verstandenen stadienabhängigen Regulierung durch verschiedene Transkriptionsfaktoren (Hong et al. 2012). PU.1 ist ein Transkriptionsfaktor für den IL-7R in der frühen B-Zell-Entwicklung (DeKoter et al. 2002). In naiven T-Zellen reguliert Foxo1 die IL-7R-Expression (Kerdiles et al. 2009). In CD4⁺-T-Zellen ist der Transkriptionsfaktor Runx1 hierfür verantwortlich (Hsu et al. 2016).

In DN, DP und SP Thymozyten und reifen T-Zellen werden mehrere Formen des Transkriptionsfaktors GABP aus der Ets-Familie exprimiert (Xue et al. 2004). GABP α und GABP β wirken als Heterodimer und binden die selbe Sequenz im IL-7R-Promoter wie PU.1 (Xue et al. 2004). Unter einer durch einen *Gene Trap* erzeugten GABP α -Defizienz ist die IL-7R α -Expression deutlich reduziert und Mäuse mit homozygoter GABP α -Defizienz versterben am 15. Entwicklungstag (Xue et al. 2004). Bei Lck-Cre-induzierter T-Zell-spezifischer Depletion von GABP α in den Thymozyten und T-Zellen ist die Thymozytenzahl deutlich reduziert, es besteht eine Entwicklungsblockade der Thymozyten im DN3 Stadium und eine reduzierte Expression von TCR β in DN4 Thymozyten (Yu et al. 2010).

Dass GABP β an 14-3-3-Proteine binden kann und dadurch vom Nukleus in das Zytoplasma transloziert, konnte von Wu et al. (2013) im Zusammenhang mit der Regulation des Yap-Gens im Hippo-Signalweg gezeigt werden. Da SLy1 ebenfalls 14-3-3-Proteine bindet (Schäll et al. 2015), wäre es denkbar, dass hier eine Funktion für SLy1 in der Stabilisierung der Bindung von GABP an 14-3-3 und die nachfolgende Translokation in das Zytoplasma besteht.

Um eine Wirkung von SLy1 auf die Transkription des IL-7-Rezeptors zu prüfen, sollen im Anschluss an diese Arbeit Chromatin-Immunopräzipitations-Versuche (ChIP) zur Abhängigkeit der Bindung der bekannten IL-7-Transkriptionsfaktoren wie GABP vom Vorhandensein von SLy1 im Thymozyten erfolgen. Außerdem wäre interessant zu untersuchen, ob sich die Translokation von SLy1 in das Zytoplasma auf TZR-Aktivierung hin, in Thymozyten bestätigen lässt.

4.4 Entartung bei T-Zell-spezifischer p53-Deletion in Abhängigkeit von der SLy1-Expression

Um die Abhängigkeit der reduzierten Zellularität in den lymphatischen Organen der SLy1^{KO}-Tiere vom p53-Signalweg und eine mögliche funktionelle Wirkung von SLy1 in der Tumorigenese von T-Zell-Tumoren zu untersuchen, wurde eine Mauslinie mit T-Zell-spezifischer p53-Defizienz generiert.

Tiere mit Lck-abhängiger Cre-Rekombinase wurden mit Tieren mit einem von loxP-Stellen flankierten p53-Gen und mit Tieren mit SLy1-Knockout gekreuzt. Thymus, Milz und Lymphknoten der Tiere wurden im Alter von 10, 25 und 50 Wochen präpariert. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Thymozyten, sowie Zellen aus Milz und Lymphknoten per Durchflusszytometrie untersucht.

4.4.1 Auswirkung der Cre-Rekombinase unabhängig von einer p53-Defizienz

Bei der T-Zell-spezifischen p53-Defizienz unter Verwendung von p53-flankierenden loxP-Stellen und einer Lck-abhängigen Cre-Rekombinase ergeben sich zugleich mehrere Einflüsse auf den Versuch, die über verschiedene Kontrollgruppen kontrolliert werden müssen.

Carow et al. (2016) beschreiben Unterschiede zwischen WT-Mäusen und Lck^{+tg}-Vergleichstieren, die auch die hier vorliegenden Versuche betreffen. Zum einen beschreibt diese Gruppe eine reduzierte Thymozytenzahl, sowie erhöhte Anteile von DN und CD8⁺-Thymozyten in Lck^{+tg}-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (Carow et al. 2016). Außerdem werden ein erhöhter Anteil IL-7R⁺- und Annexin-V⁺-Thymozyten bei den Lck^{+tg}-Tieren beschrieben. Als mögliche Erklärung hierfür werden Pseudo-loxP-Stellen im Genom vorgeschlagen, die bei hoher Rekombinaseaktivität zusätzlich zu den eigentlichen loxP-Stellen ausgeschnitten werden. In einer Literaturstudie zeigen Carow et al. (2016), dass bei Publikationen, in denen die Rekombinase-negative Gruppe als Kontrollgruppe genutzt wird, signifikant häufiger eine der beobachteten Veränderungen als Ergebnis dokumentiert wird, im Vergleich zu Publikationen, die die Lck^{+tg}-Gruppe als Kontrolle nutzt.

In dieser Arbeit konnten auch einige der genannten Veränderungen beobachtet werden, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben wird und in den Abbildungen 28, 29 und im Anhang in den Abbildungen 42 und 43 zu sehen ist. Beim Vergleich von SLy1^{WT/KO}- mit den p53^{+/+} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Tieren fallen eine reduzierte Zellzahl sowie ein erhöhter Anteil DN Thymozyten und ein reduzierter Anteil DP Thymozyten auf. Wichtig ist, dass die durch den SLy1-Knockout ausgelöste Erhöhung der DN Thymozyten sowie die Erhöhung der

DN Thymozyten durch die Einführung der Cre-Rekombinase kumulativ wirken. Dadurch kann angenommen werden, dass bei den $p53^{fl/fl}$ Lck^{+tg} $SLy1^{WT/KO}$ -Tieren die Wirkung von SLy1 erhalten bleibt.

Obwohl die p53-Expression nicht durch die genetische Konstellation beeinflusst ist, ist die Entwicklung des Immunsystems der $p53^{+/+}$ Lck^{+tg} -Tiere beeinträchtigt und eine Kontrolle durch $SLy1^{WT/KO}$ oder $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/+}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Tiere reicht nicht aus. Daher wurden in den nachfolgenden Analysen die $p53^{+/+}$ Lck^{+tg} $SLy1^{WT/KO}$ -als Vergleichsgruppen zu den $p53^{fl/fl}$ Lck^{+tg} $SLy1^{WT/KO}$ -Tieren gewählt.

Kritisch anzumerken ist hier, dass sich auch die Ergebnisse der $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/+}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Tiere in manchen Parametern von den $SLy1^{WT/KO}$ -Tieren unterscheiden, die auf mögliche Auswirkungen des Einfügens der loxP-Stellen am p53-Gen hindeuten, auch wenn keine Rekombinase vorliegt. Hierzu gehören eine reduzierte Thymozytenzahl im Alter von 25 Wochen, sowie eine leichte Reduktion des Anteils der DN Thymozyten bei den $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/+}$ $SLy1^{WT}$ -Tieren im Vergleich zu den $SLy1^{WT}$ -Tieren. Diese Auswirkungen sind insgesamt als weniger relevant zu betrachten im Vergleich zu den durch das Einführen der Rekombinase induzierten Veränderungen.

4.4.2 p53 ist nicht Effektor der $SLy1^{KO}$ -induzierten Veränderungen

Bezogen auf die Zellzahlen sowie Verteilung der Thymozyten- und peripheren Lymphozytenpopulationen haben sich die Auswirkungen eines SLy1-Knockouts bei gleichzeitigem Vorliegen einer p53-Defizienz nicht verändert. Unter p53-Defizienz ist die Thymozytenzahl der $SLy1^{KO}$ -Tiere im Vergleich zu ihren $SLy1^{WT}$ -Geschwistern im Alter von 10 Wochen um 56%, die Splenozytenzahl um 54% und die Zellzahl der Lymphknoten um 40% reduziert (s. Abb. 30). Dies entspricht den von Reis et al. (2009) beobachteten Veränderungen in $SLy1^{KO}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Die reduzierten Zellzahlen in den lymphatischen Organen von $SLy1^{KO}$ -Tieren sind also nicht durch die beobachtete Überaktivierung des p53-Signalwegs induziert, da auch bei Fehlen dieses seneszenz- und apoptosefördernden Signalwegs weiterhin eine Reduktion der Zellzahl erhalten bleibt. Die Hypothese, dass p53 Teil der Endstrecke der SLy1-bedingten Veränderungen ist, die zu den reduzierten Thymozyten- und Splenozytenzahlen führen, kann hiermit also widerlegt werden.

Ein alternativer Mechanismus für die reduzierte Zellzahl der $SLy1^{KO}$ -Thymozyten ist ein Einfluss von SLy1 auf die Proliferation der Thymozyten. Die Proliferationsfähigkeit von $SLy1^{KO}$ -T-Zellen ist eingeschränkt, so dass auch im Rahmen einer Infektion die T-Zell-Antwort nicht ausreicht (Schäll et al. 2015). Die Proliferationsfähigkeit der $SLy1^{KO}$ -

Thymozyten ist bisher nicht untersucht, soll aber Bestandteil zukünftiger Versuche zum besseren Verständnis des SLy1-Mechanismus sein.

4.4.3 Reduziertes Überleben von p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Tieren

Im Rahmen der retrospektiven Überlebensanalyse (s. Abb. 39) konnte gezeigt werden, dass die T-Zell-spezifische p53-Defizienz zu einem verringerten Überleben der betroffenen Tiere führt. Das mediane Überleben der p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Tiere war auf 27 Wochen, das der p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Tiere auf 39 Wochen reduziert.

Der SLy1-Knockout konnte als teilweise schützender Faktor vor dem vorzeitigen Tod identifiziert werden. Die p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{KO}-Tiere haben in der retrospektiven Analyse des Überlebens signifikant länger gelebt als ihre p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Geschwister. Die mutmaßlich reduzierte Proliferationsfähigkeit beim SLy1-Knockout scheint die Auswirkungen der p53-Defizienz auf das Überleben teilweise ausgleichen zu können.

4.4.4 Veränderung der Lichtstreuungseigenschaften von p53-defizienten Zellen

Li et al. (2004) beschreiben bei Lymphoblasten aus Proben von Patienten mit T-ALL oder T-Lymphoblastischem Lymphom (LBL) einen Anstieg der FSC- und SSC-Werte, sowie eine jeweils eindeutige Zuordenbarkeit der CD4- und CD8-Expression, wobei diese in 7/15 Fällen DP war. In Thymomen beschreiben Li et al. Lymphozyten hingegen als klein in ihrer Lichtstreuungseigenschaft und mit einem charakteristischen Fleck (*smear*)-Muster bei der Auftrennung nach CD4- und CD8-Expression. Gorczyca et al. (2004) zeigen ebenfalls, dass bei der Durchflusszytometrie von Zellen aus einem T-LBL die meisten Zellen DP sind. In einem Beispiel ist die Auftrennung nach CD4- und CD8-Expression dem Bild im Anhang Abbildung 37A sehr ähnlich. Außerdem sind die FSC-Werte von Proben aus T-LBL erhöht (Gorczyca et al. 2004). Bei einer Studie zur durchflusszytometrischen Diagnostik heterogener T-Zell-Läsionen, wurden in 23% der Fälle erhöhte SSC-Werte gemessen (Gorczyca et al. 2002).

Aufgrund der Heterogenität vieler Krankheiten mit T-Zell-Ursprung, ist es schwierig, hier von eindeutigen Diagnosekriterien zu sprechen. Zudem unterscheiden sich die Oberflächenrezeptoren der Immunzellen in Mensch und Maus teils deutlich. Dennoch können einige der aus dem Menschen bei T-Zell-Erkrankungen bekannten Merkmale in der Durchflusszytometrie auch in der vorliegenden Arbeit bei Mäusen mit p53-Defizienz beobachtet werden. Entsprechende Veränderungen können in den Verteilungen der Thymozytenpopulationen im Alter von 25 Wochen (s. Abb. 32) beobachtet werden. Bei den p53^{fl/fl}

$Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Tieren sind die Anteile der DN Thymozyten teilweise deutlich erhöht und die der DP Thymozyten reduziert (s. Anhang Abb. 37C). Dies kann als ein möglicher Vorbote der Entartung der Thymozyten verstanden werden. Wenn die Lichtstreuungseigenschaften der Gruppe mit erhöhten DN und verringerten DP Anteilen mit denen ihrer scheinbar gesunden, genotypisch gleichen Geschwister und den bei kranken Tieren ermittelten Lichtstreuungseigenschaften verglichen werden, fällt auf, dass die SSC-Werte der rot markierten Gruppen sich signifikant von der schwarzen Gruppe unterscheiden (s. Abb. 41). Die FSC-Werte hingegen unterscheiden sich nicht zwischen den Subgruppen. Außerdem gibt es hier keinen Unterschied zwischen $SLy1$ -Expression oder -Defizienz.

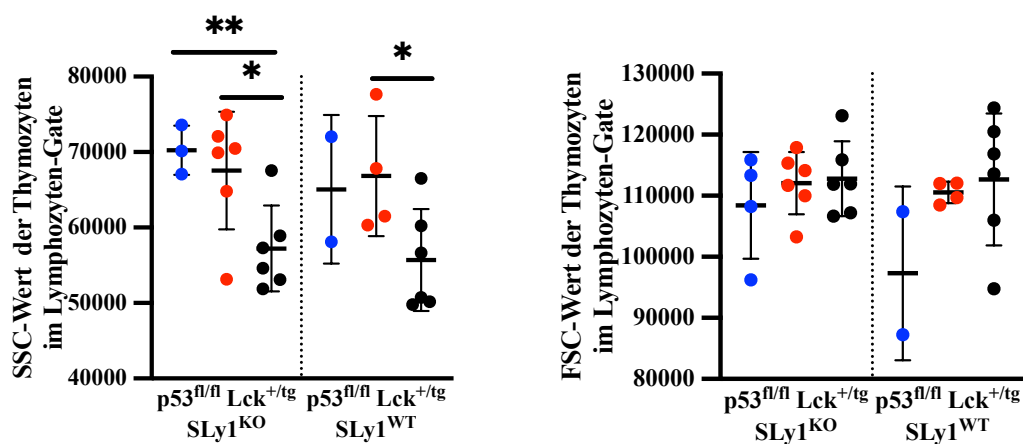


Abbildung 41. Veränderungen der SSC- und FSC-Werte von $p53^{fl/fl}$ $Lck^{+/tg}$ $SLy1^{WT/KO}$ -Thymozyten bei Entartung

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD der medianen SSC- (links) und FSC-Werte (rechts) der Thymozyten im Lymphozytengate von $n=2-6$ Mäusen, ungepaarter t-Test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

blau: phänotypisch kranke Tiere

rot: im Rahmen der geplanten Versuche analysierte Tiere mit erhöhten DN und reduzierten DP Anteilen (in Abb. 29, 32, 33, 42 und 43 ebenfalls rot markiert)

schwarz: im Rahmen der geplanten Versuche analysierte Tiere ohne Veränderung in der Verteilung der Thymozytenpopulationen (in Abb. 29, 32, 33, 42 und 43 ebenfalls schwarz markiert)

Dass sich diese Proben in mehreren Eigenschaften (d.h. Verteilung der DN und DP Anteile der Thymozyten und SSC-Wert) untereinander ähnlich sind und von den anderen Tieren der genotypisch gleichen Gruppe unterscheiden, erlaubt eine Kategorisierung als Untergruppe. Da nur ein sehr geringer Anteil der Tiere mit $p53$ -Defizienz bis zum Alter von 50 Wochen überlebt, ist zu vermuten, dass der Anteil an Proben, die solche Auffälligkeiten zeigen, mit dem Alter der Mäuse ansteigt und auch die in der untersuchten Gruppe „gesunden“ Tiere noch solche Veränderungen erfahren werden.

Da nur eine geringe Anzahl kranker Tiere durchflusszytometrisch untersucht wurde und sich diese Gruppe erneut in zwei Gruppen (Thymom- bzw. Lymphom-Phänotyp) aufteilen ließe,

sind die Ergebnisse dieser Daten nur eingeschränkt verlässlich und die Stichprobengrößen für eine statistische Auswertung sehr klein.

4.5 Ausblick

Das Adapterprotein SLy1 ist für die Entwicklung der T-Zellen ab dem DN Thymozyten-Stadium relevant. Es bleibt bisher unklar, wie SLy1 mechanistisch wirkt, es gibt jedoch verschiedene Ansätze im p53-Mdm2- und IL-7R-Signalweg für mögliche Wechselwirkungen mit SLy1, die Ursache für das reduzierte Überleben der SLy1^{KO}-Thymozyten sein können. Zum einen könnte SLy1 auf die Regulation der Transkription des IL-7-Rezeptors oder der Notch-Proteine wirken, andererseits könnte SLy1 auch über den IL-7R-Signalweg in die Antagonisierung von p53 über NPM1 und Mdm2 eingreifen. Da aus reifen T-Zellen bereits bekannt ist, dass der SLy1-Knockout zu einer reduzierten Proliferation mit nachfolgend schlechterem Ansprechen des Immunsystems auf eine *Listeria monocytogenes*-Infektion führt (Schäll et al. 2015), scheint der Ansatz, dass auch eine reduzierte Proliferation in den Thymozyten zur reduzierten Zellzahl führt, vielversprechend.

Das verbesserte Überleben der p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{KO}- im Vergleich zu p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT}-Mäusen weist auf eine schützende Funktion des SLy1-Knockouts im Bezug auf das Entartungsrisiko von T-Zellen hin. Das Vorliegen von SLy1 könnte Treiber oder Unterstützer einer T-Zell-Entartung sein. Hierdurch könnte SLy1 in Zukunft Bedeutung als (Proto-)Onkogen lymphatischer Tumorerkrankungen mit T-Zell-Ursprung gewinnen. Daniel Schäll (2015) zeigt, dass in den mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) von ALL-Patienten, sowie in PBMC-Proben von Rauchern mit Lungenkrebs im Vergleich zu gesunden Nicht-Rauchern, mehr SLy1-mRNA vorliegt. Schäll (2015) schlägt hierfür auch eine kompensatorische Hochregulation als mögliche Ursache vor. Unter Einbezug der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zum reduzierten Risiko eines Tumorgeschehens aus T-Zellen bei SLy1-Knockout, scheint jedoch eine tumorinduzierende Wirkung von SLy1 wahrscheinlicher.

Um die Funktion von SLy1 und den Mechanismus der Wirkung auf die T-Zell-Entwicklung besser zu verstehen, könnten in Zukunft Untersuchungen der SLy1-Expression in Zellen aus Tumoren mit T-Zell-Ursprung stattfinden, um herauszuarbeiten inwiefern SLy1 für die Entartung relevant ist.

5

Zusammenfassung

Das Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zelltypen, die reguliert werden müssen, um die Entstehung von Krankheiten zu verhindern. SLy1 ist ein Lymphozyten-spezifisches Adapterprotein, das Entwicklung und Funktion von T-, B- und NK-Zellen prägt. Mäuse mit SLy1-Knockout haben reduzierte Lymphozytenzahlen und funktionelle Defizite in ihren Immunantworten. Molekular sind eine erhöhte Expression des proliferations- und differenzierungsfördernden IL-7R- und seneszenz- und apoptose-einleitenden p53-Signalwegs in SLy1^{KO}-Thymozyten bekannt.

Es wurden Western Blots mit spezifischen Antikörper und qPCR-Untersuchung aus Proben von SLy1^{KO}- und Kontrolltieren durchgeführt, um Expression und Phosphorylierung des DDR-Signalwegs, von p53, Mdm2 und den Kinasen Jak1 und Jak3 des IL-7R-Signalwegs zu untersuchen. Bei der Analyse von Protein-Expression und -Phosphorylierung konnte eine Aktivierung des p53-Signalwegs in Thymozyten, im Besonderen in Bezug auf ATM, ATR und p53, festgestellt werden. Außerdem war die Jak1-Expression entsprechend der vorangegangenen Versuche zur erhöhten Expression des IL-7R-Signalwegs erhöht. In DN Thymozyten konnten hingegen keine Veränderungen durch die SLy1-Defizienz beobachtet werden.

Bei Tieren mit T-Zell-spezifischer p53-Defizienz wurde die Verteilung der Lymphozytenpopulationen per Durchflusszytometrie und Zellzählung untersucht. Außerdem wurde der Einfluss der p53-Defizienz auf das Überleben der Mäuse analysiert. Mit diesen Versuchen konnte eine direkte Abhängigkeit der Wirkung von SLy1 von der p53-Expression ausgeschlossen werden, da auch bei Mäusen mit T-Zell-spezifischer p53-Defizienz typische Veränderungen durch den SLy1-Knockout beobachtet werden konnten. Das Überleben der Tiere mit T-Zell-spezifischer p53-Defizienz war im Vergleich zu den Kontrollgruppen reduziert, wobei die Tiere mit SLy1^{WT} verstärkt betroffen waren. Es konnten einige Fälle mit Raumforderungen des Thymus, der Milz und der Lymphknoten beobachtet werden. Die SLy1-Defizienz konnte als schützender Faktor für Mäuse mit p53-defizienten T-Zellen identifiziert werden.

Um in Zukunft die Funktion von SLy1 besser zu verstehen, soll der Wirkmechanismus, möglicherweise im Zusammenhang der IL-7R-Transkriptionsregulation, und die Expressionsmuster von SLy1 in hämatologischen Krebserkrankungen mit T-Zell-Ursprung untersucht werden. Mit Blick auf die veränderte Regulation zellzyklusrelevanter Signalwege und das verbesserte Überleben von SLy1^{KO}-Mäusen bei T-Zell-spezifischer p53-Defizienz ist eine Funktion von SLy1 als (Proto-)Onkogen denkbar.

6

Literaturverzeichnis

- Arefanian, S., D. Schall, S. Chang, R. Ghasemi, R. Higashikubo, A. Zheleznyak, Y. Guo, J. Yu, H. Asgharian, W. Li, A. E. Gelman, D. Kreisel, A. R. French, H. Zaher, B. Plougastel-Douglas, L. Maggi, W. Yokoyama, S. Beer-Hammer und A. S. Krupnick (2016). „Deficiency of the adaptor protein SLY1 results in a natural killer cell ribosomopathy affecting tumor clearance“. In: *Oncoimmunology* 5.12, e1238543. ISSN: 2162-4011 (Print) 2162-4011 (Linking). DOI: 10.1080/2162402X.2016.1238543.
- Astoul, E., A. D. Laurence, N. Totty, S. Beer, D. R. Alexander und D. A. Cantrell (2003). „Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways“. In: *J Biol Chem* 278.11, S. 9267–75. ISSN: 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). DOI: 10.1074/jbc.M211252200.
- Bakkenist, C. J. und M. B. Kastan (2003). „DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation“. In: *Nature* 421.6922, S. 499–506. ISSN: 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). DOI: 10.1038/nature01368.
- Beer, S., T. Scheikl, B. Reis, N. Huser, K. Pfeffer und B. Holzmann (2005). „Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice“. In: *Mol Cell Biol* 25.21, S. 9646–60. ISSN: 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). DOI: 10.1128/MCB.25.21.9646-9660.2005.
- Beer, S., A. B. Simins, A. Schuster und B. Holzmann (2001). „Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells“. In: *Biochim Biophys Acta* 1520.1, S. 89–93. ISSN: 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). DOI: 10.1016/s0167-4781(01)00242-1.
- Bellavia, Diana, Marco Mecarozzi, Antonio Francesco Campese, Paola Grazioli, Alberto Gulino und Isabella Screpanti (2007). „Notch and Ikaros: Not Only Converging Players in T Cell Leukemia“. In: *Cell Cycle* 6.22, S. 2730–2734. ISSN: 1538-4101. DOI: 10.4161/cc.6.22.4894.
- Brandt, S., K. Ellwanger, C. Beuter-Gunia, M. Schuster, A. Hausser, I. Schmitz und S. Beer-Hammer (2010). „SLY2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex“. In: *Int J Biochem Cell Biol* 42.9, S. 1472–81. ISSN: 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking). DOI: 10.1016/j.biocel.2010.05.004.

- Capone, M., Jr. Hockett R. D. und A. Zlotnik (1998). „Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.21, S. 12522–7. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.95.21.12522.
- Carow, B., Y. Gao, J. Coquet, M. Reilly und M. E. Rottenberg (2016). „Ick-Driven Cre Expression Alters T Cell Development in the Thymus and the Frequencies and Functions of Peripheral T Cell Subsets“. In: *J Immunol* 197.6, S. 2261–8. ISSN: 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). DOI: 10.4049/jimmunol.1600827.
- Cehab, N. H., A. Malikzay, M. Appel und T. D. Halazonetis (2000). „Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53“. In: *Genes Dev* 14.3, S. 278–88. ISSN: 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking).
- Chen, L., D. M. Gilkes, Y. Pan, W. S. Lane und J. Chen (2005). „ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage“. In: *EMBO J* 24.19, S. 3411–22. ISSN: 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). DOI: 10.1038/sj.emboj.7600812.
- DeKoter, R. P., H. J. Lee und H. Singh (2002). „PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors“. In: *Immunity* 16.2, S. 297–309. ISSN: 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00269-8.
- Donskoy, E. und I. Goldschneider (1992). „Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice“. In: *J Immunol* 148.6, S. 1604–12. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- Dudley, E. C., H. T. Petrie, L. M. Shah, M. J. Owen und A. C. Hayday (1994). „T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice“. In: *Immunity* 1.2, S. 83–93. ISSN: 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). DOI: 10.1016/1074-7613(94)90102-3.
- Eckardt, N. A. (2001). „Transcription factors dial 14-3-3 for nuclear shuttle“. In: *Plant Cell* 13.11, S. 2385–9. ISSN: 1040-4651 (Print) 1040-4651 (Linking). DOI: 10.1105/tpc.13.11.2385.
- ElKassar, N. und R. E. Gress (2010). „An overview of IL-7 biology and its use in immunotherapy“. In: *J Immunotoxicol* 7.1, S. 1–7. ISSN: 1547-6901 (Electronic) 1547-691X (Linking). DOI: 10.3109/15476910903453296.
- Ewijk, W. van, E. W. Shores und A. Singer (1994). „Crosstalk in the mouse thymus“. In: *Immunol Today* 15.5, S. 214–7. ISSN: 0167-5699 (Print) 0167-5699 (Linking). DOI: 10.1016/0167-5699(94)90246-1.
- Godfrey, D. I., J. Kennedy, P. Mombaerts, S. Tonegawa und A. Zlotnik (1994). „Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8-

- thymocyte differentiation“. In: *J Immunol* 152.10, S. 4783–92. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda und A. Zlotnik (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“. In: *J Immunol* 150.10, S. 4244–52. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- Gorczyca, W., S. Tugulea, Z. Liu, X. Li, J. Y. Wong und J. Weisberger (2004). „Flow cytometry in the diagnosis of mediastinal tumors with emphasis on differentiating thymocytes from precursor T-lymphoblastic lymphoma/leukemia“. In: *Leuk Lymphoma* 45.3, S. 529–38. ISSN: 1042-8194 (Print) 1026-8022 (Linking). DOI: 10.1080/10428190310001598008.
- Gorczyca, W., J. Weisberger, Z. Liu, P. Tsang, M. Hossein, C. D. Wu, H. Dong, J. Y. Wong, S. Tugulea, S. Dee, M. R. Melamed und Z. Darzynkiewicz (2002). „An approach to diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry“. In: *Cytometry* 50.3, S. 177–90. ISSN: 0196-4763 (Print) 0196-4763 (Linking). DOI: 10.1002/cyto.10003.
- Gruber, Lena (2021). „Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 im p53-Signalweg“. Medizinische Dissertationsschrift. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Hong, C., M. A. Luckey und J. H. Park (2012). „Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development“. In: *Semin Immunol* 24.3, S. 151–8. ISSN: 1096-3618 (Electronic) 1044-5323 (Linking). DOI: 10.1016/j.smim.2012.02.002.
- Hozumi, K., C. Mailhos, N. Negishi, K. Hirano, T. Yahata, K. Ando, S. Zuklys, G. A. Hollander, D. T. Shima und S. Habu (2008). „Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development“. In: *J Exp Med* 205.11, S. 2507–13. ISSN: 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). DOI: 10.1084/jem.20080134.
- Hsu, F. C., M. J. Shapiro, B. Dash, C. C. Chen, M. M. Constans, J. Y. Chung, S. R. Romero Arocha, P. J. Belmonte, M. W. Chen, D. C. McWilliams und V. S. Shapiro (2016). „An Essential Role for the Transcription Factor Runx1 in T Cell Maturation“. In: *Sci Rep* 6, S. 23533. ISSN: 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). DOI: 10.1038/srep23533.
- Jaufmann, J., F. C. Franke, A. Sperlich, C. Blumendeller, I. Kloos, B. Schneider, D. Sasaki, K. P. Janssen und S. Beer-Hammer (2021). „The emerging and diverse roles of the SLy/SASH1-protein family in health and disease-Overview of three multifunctional proteins“. In: *FASEB J* 35.4, e21470. ISSN: 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). DOI: 10.1096/fj.202002495R.
- Jiang, Q., W. Q. Li, F. B. Aiello, R. Mazzucchelli, B. Asefa, A. R. Khaled und S. K. Durum (2005). „Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin“. In: *Cytokine Growth*

- Factor Rev* 16.4-5, S. 513–33. ISSN: 1359-6101 (Print) 1359-6101 (Linking). DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.004.
- Kerdiles, Y. M., D. R. Beisner, R. Tinoco, A. S. Dejean, D. H. Castrillon, R. A. DePinho und S. M. Hedrick (2009). „Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor“. In: *Nat Immunol* 10.2, S. 176–84. ISSN: 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). DOI: 10.1038/ni.1689.
- Khanna, K. K., K. E. Keating, S. Kozlov, S. Scott, M. Gatei, K. Hobson, Y. Taya, B. Gabrielli, D. Chan, S. P. Lees-Miller und M. F. Lavin (1998). „ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction“. In: *Nat Genet* 20.4, S. 398–400. ISSN: 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). DOI: 10.1038/3882.
- Khosravi, R., R. Maya, T. Gottlieb, M. Oren, Y. Shiloh und D. Shkedy (1999). „Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.26, S. 14973–7. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.96.26.14973.
- Kisielow, P., H. S. Teh, H. Bluthmann und H. von Boehmer (1988). „Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules“. In: *Nature* 335.6192, S. 730–3. ISSN: 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). DOI: 10.1038/335730a0.
- Kloos, Isabel (2021). „Die Rolle von SLy1 bei der Entwicklung einer T-Zell-akuten lymphatischen Leukämie“. Medizinische Dissertationsschrift. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Klusmann, I., S. Rodewald, L. Muller, M. Friedrich, M. Wienken, Y. Li, R. Schulz-Heddergott und M. Dobbstein (2016). „p53 Activity Results in DNA Replication Fork Processivity“. In: *Cell Rep* 17.7, S. 1845–1857. ISSN: 2211-1247 (Electronic). DOI: 10.1016/j.celrep.2016.10.036.
- Kukuk, L., A. J. Dingley, J. Granzin, L. Nagel-Steger, P. Thiagarajan-Rosenkranz, D. Ciupka, K. Hanel, R. Batra-Safferling, V. Pacheco, M. Stoldt, K. Pfeffer, S. Beer-Hammer, D. Willbold und B. W. Koenig (2019). „Structure of the SLy1 SAM homodimer reveals a new interface for SAM domain self-association“. In: *Sci Rep* 9.1, S. 54. ISSN: 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). DOI: 10.1038/s41598-018-37185-3.
- Kurki, S., K. Peltonen, L. Latonen, T. M. Kiviharju, P. M. Ojala, D. Meek und M. Laiho (2004). „Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation“. In: *Cancer Cell* 5.5, S. 465–75. ISSN: 1535-6108 (Print) 1535-6108 (Linking). DOI: 10.1016/s1535-6108(04)00110-2.
- Kurochkina, N. und U. Guha (2013). „SH3 domains: modules of protein-protein interactions“. In: *Biophys Rev* 5.1, S. 29–39. ISSN: 1867-2450 (Print) 1867-2450 (Linking). DOI: 10.1007/s12551-012-0081-z.

- Levine, A. J. (1997). „p53, the cellular gatekeeper for growth and division“. In: *Cell* 88.3, S. 323–31. ISSN: 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81871-1.
- Li, S., J. Juco, K. P. Mann und J. T. Holden (2004). „Flow cytometry in the differential diagnosis of lymphocyte-rich thymoma from precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma“. In: *Am J Clin Pathol* 121.2, S. 268–74. ISSN: 0002-9173 (Print) 0002-9173 (Linking). DOI: 10.1309/K2FY-1TED-8GEG-FLNG.
- Liu, K. D., S. L. Gaffen, M. A. Goldsmith und W. C. Greene (1997). „Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation“. In: *Curr Biol* 7.11, S. 817–26. ISSN: 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). DOI: 10.1016/S0960-9822(06)00369-1.
- Liu, S., B. Shiotani, M. Lahiri, A. Marechal, A. Tse, C. C. Leung, J. N. Glover, X. H. Yang und L. Zou (2011). „ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation“. In: *Mol Cell* 43.2, S. 192–202. ISSN: 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). DOI: 10.1016/j.molcel.2011.06.019.
- Livak, F., M. Tourigny, D. G. Schatz und H. T. Petrie (1999). „Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development“. In: *J Immunol* 162.5, S. 2575–80. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- Mackall, C. L., T. J. Fry und R. E. Gress (2011). „Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application“. In: *Nat Rev Immunol* 11.5, S. 330–42. ISSN: 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). DOI: 10.1038/nri2970.
- Marino, S., M. Vooijs, H. van Der Gulden, J. Jonkers und A. Berns (2000). „Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum“. In: *Genes Dev* 14.8, S. 994–1004. ISSN: 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking).
- Matsuoka, S., G. Rotman, A. Ogawa, Y. Shiloh, K. Tamai und S. J. Elledge (2000). „Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97.19, S. 10389–94. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.190030497.
- Maya, R., M. Balass, S. T. Kim, D. Shkedy, J. F. Leal, O. Shifman, M. Moas, T. Buschmann, Z. Ronai, Y. Shiloh, M. B. Kastan, E. Katzir und M. Oren (2001). „ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage“. In: *Genes Dev* 15.9, S. 1067–77. ISSN: 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). DOI: 10.1101/gad.886901.
- Mayo, L. D. und D. B. Donner (2001). „A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.12, S. 13477–82. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.120000098.

- Sci U S A* 98.20, S. 11598–603. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.181181198.
- Michie, A. M. und J. C. Zuniga-Pflucker (2002). „Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection“. In: *Semin Immunol* 14.5, S. 311–23. ISSN: 1044-5323 (Print) 1044-5323 (Linking). DOI: 10.1016/s1044-5323(02)00064-7.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska und U. M. Moll (2003). „p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria“. In: *Mol Cell* 11.3, S. 577–90. ISSN: 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00050-9.
- Moll, U. M. und O. Petrenko (2003). „The MDM2-p53 interaction“. In: *Mol Cancer Res* 1.14, S. 1001–8. ISSN: 1541-7786 (Print) 1541-7786 (Linking).
- Muslin, A. J. und H. Xing (2000). „14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference“. In: *Cell Signal* 12.11-12, S. 703–9. ISSN: 0898-6568 (Print) 0898-6568 (Linking). DOI: 10.1016/s0898-6568(00)00131-5.
- Orban, P. C., D. Chui und J. D. Marth (1992). „Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89.15, S. 6861–5. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.89.15.6861.
- Park, B. J., J. W. Kang, S. W. Lee, S. J. Choi, Y. K. Shin, Y. H. Ahn, Y. H. Choi, D. Choi, K. S. Lee und S. Kim (2005). „The haploinsufficient tumor suppressor p18 upregulates p53 via interactions with ATM/ATR“. In: *Cell* 120.2, S. 209–21. ISSN: 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.054.
- Park, J. H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes und A. Singer (2004). „Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival“. In: *Immunity* 21.2, S. 289–302. ISSN: 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). DOI: 10.1016/j.immuni.2004.07.016.
- Pelletier, J., F. Riano-Canalias, E. Almacellas, C. Mauvezin, S. Samino, S. Feu, S. Menoyo, A. Domostegui, M. Garcia-Cajide, R. Salazar, C. Cortes, R. Marcos, A. Tauler, O. Yanes, N. Agell, S. C. Kozma, A. Gentilella und G. Thomas (2020). „Nucleotide depletion reveals the impaired ribosome biogenesis checkpoint as a barrier against DNA damage“. In: *EMBO J* 39.13, e103838. ISSN: 1460-2075 (Electronic) 0261-4189 (Linking). DOI: 10.15252/embj.2019103838.
- Petrie, H. T., F. Livak, D. G. Schatz, A. Strasser, I. N. Crispe und K. Shortman (1993). „Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes“. In: *J Exp Med* 178.2, S. 615–22. ISSN: 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). DOI: 10.1084/jem.178.2.615.

- Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald und M. Aguet (1999). „Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1“. In: *Immunity* 10.5, S. 547–58. ISSN: 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80054-0.
- Reis, B., K. Pfeffer und S. Beer-Hammer (2009). „The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development“. In: *BMC Immunol* 10, S. 38. ISSN: 1471-2172 (Electronic) 1471-2172 (Linking). DOI: 10.1186/1471-2172-10-38.
- Ren, Z., J. L. Aerts, H. Vandenplas, J. A. Wang, O. Gorbenko, J. P. Chen, P. Giron, C. Heirman, C. Goyvaerts, E. Zacksenhaus, M. D. Minden, V. Stambolic, K. Breckpot und J. De Greve (2016). „Phosphorylated STAT5 regulates p53 expression via BRCA1/BARD1-NPM1 and MDM2“. In: *Cell Death Dis* 7.12, e2560. ISSN: 2041-4889 (Electronic). DOI: 10.1038/cddis.2016.430.
- Rimkus, C., M. Martini, J. Friederichs, R. Rosenberg, D. Doll, J. R. Siewert, B. Holzmann und K. P. Janssen (2006). „Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer“. In: *Br J Cancer* 95.10, S. 1419–23. ISSN: 0007-0920 (Print) 0007-0920 (Linking). DOI: 10.1038/sj.bjc.6603452.
- Schäll, D. (2015). „Das Adapterprotein SLY1 - Ein Zelltyp-spezifischer Regulator des Immunsystems“. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Schäll, D., F. Schmitt, B. Reis, S. Brandt und S. Beer-Hammer (2015). „SLY1 regulates T-cell proliferation during *Listeria monocytogenes* infection in a Foxo1-dependent manner“. In: *Eur J Immunol* 45.11, S. 3087–97. ISSN: 1521-4141 (Electronic) 0014-2980 (Linking). DOI: 10.1002/eji.201545609.
- Schultz, J., C. P. Ponting, K. Hofmann und P. Bork (1997). „SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation“. In: *Protein Sci* 6.1, S. 249–53. ISSN: 0961-8368 (Print) 0961-8368 (Linking). DOI: 10.1002/pro.5560060128.
- Sethy, R., R. Rakesh, K. Patne, V. Arya, T. Sharma, D. T. Haokip, R. Kumari und R. Muthuswami (2018). „Regulation of ATM and ATR by SMARCA1 and BRG1“. In: *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1861.12, S. 1076–1092. ISSN: 1876-4320 (Electronic) 1874-9399 (Linking). DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.10.004.
- Shieh, S. Y., J. Ahn, K. Tamai, Y. Taya und C. Prives (2000). „The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites“. In: *Genes Dev* 14.3, S. 289–300. ISSN: 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking).

- Shieh, S. Y., M. Ikeda, Y. Taya und C. Prives (1997). „DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2“. In: *Cell* 91.3, S. 325–34. ISSN: 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80416-x.
- Shiotani, B. und L. Zou (2009). „ATR signaling at a glance“. In: *J Cell Sci* 122.Pt 3, S. 301–4. ISSN: 0021-9533 (Print) 0021-9533 (Linking). DOI: 10.1242/jcs.035105.
- Smith, J., L. M. Tho, N. Xu und D. A. Gillespie (2010). „The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer“. In: *Adv Cancer Res* 108, S. 73–112. ISSN: 2162-5557 (Electronic) 0065-230X (Linking). DOI: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0.
- Starr, T. K., S. C. Jameson und K. A. Hogquist (2003). „Positive and negative selection of T cells“. In: *Annu Rev Immunol* 21, S. 139–76. ISSN: 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107.
- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, J. M. Williams, J. N. Sarkaria, W. A. Cliby, S. Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives und R. T. Abraham (1999). „A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53“. In: *Genes Dev* 13.2, S. 152–7. ISSN: 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). DOI: 10.1101/gad.13.2.152.
- Vauzour, D., K. Vafeiadou, C. Rice-Evans, E. Cadenas und J. P. Spencer (2007). „Inhibition of cellular proliferation by the genistein metabolite 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone is mediated by DNA damage and activation of the ATR signalling pathway“. In: *Arch Biochem Biophys* 468.2, S. 159–66. ISSN: 1096-0384 (Electronic) 0003-9861 (Linking). DOI: 10.1016/j.abb.2007.09.021.
- Wu, H., Y. Xiao, S. Zhang, S. Ji, L. Wei, F. Fan, J. Geng, J. Tian, X. Sun, F. Qin, C. Jin, J. Lin, Z. Y. Yin, T. Zhang, L. Luo, Y. Li, S. Song, S. C. Lin, X. Deng, F. Camargo, J. Avruch, L. Chen und D. Zhou (2013). „The Ets transcription factor GABP is a component of the hippo pathway essential for growth and antioxidant defense“. In: *Cell Rep* 3.5, S. 1663–77. ISSN: 2211-1247 (Electronic). DOI: 10.1016/j.celrep.2013.04.020.
- Wu, L. und A. J. Levine (1997). „Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene“. In: *Mol Med* 3.7, S. 441–51. ISSN: 1076-1551 (Print) 1076-1551 (Linking).
- Xue, H. H., J. Bollenbacher, V. Rovella, R. Tripuraneni, Y. B. Du, C. Y. Liu, A. Williams, J. P. McCoy und W. J. Leonard (2004). „GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells“. In: *Nat Immunol* 5.10, S. 1036–44. ISSN: 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). DOI: 10.1038/ni1117.
- Yu, S., D. M. Zhao, R. Jothi und H. H. Xue (2010). „Critical requirement of GABPalpha for normal T cell development“. In: *J Biol Chem* 285.14, S. 10179–88. ISSN: 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). DOI: 10.1074/jbc.M109.088740.

- Zeller, C., B. Hinzmann, S. Seitz, H. Prokoph, E. Burkhard-Goettges, J. Fischer, B. Jandrig, L. E. Schwarz, A. Rosenthal und S. Scherneck (2003). „SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer“. In: *Oncogene* 22.19, S. 2972–83. ISSN: 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). DOI: 10.1038/sj.onc.1206474.
- Zhao, H. und H. Piwnica-Worms (2001). „ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1“. In: *Mol Cell Biol* 21.13, S. 4129–39. ISSN: 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). DOI: 10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001.
- Zhou, Y. J., E. P. Hanson, Y. Q. Chen, K. Magnuson, M. Chen, P. G. Swann, R. L. Wange, P. S. Changelian und J. J. O’Shea (1997). „Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94.25, S. 13850–5. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.94.25.13850.

7

Anhang

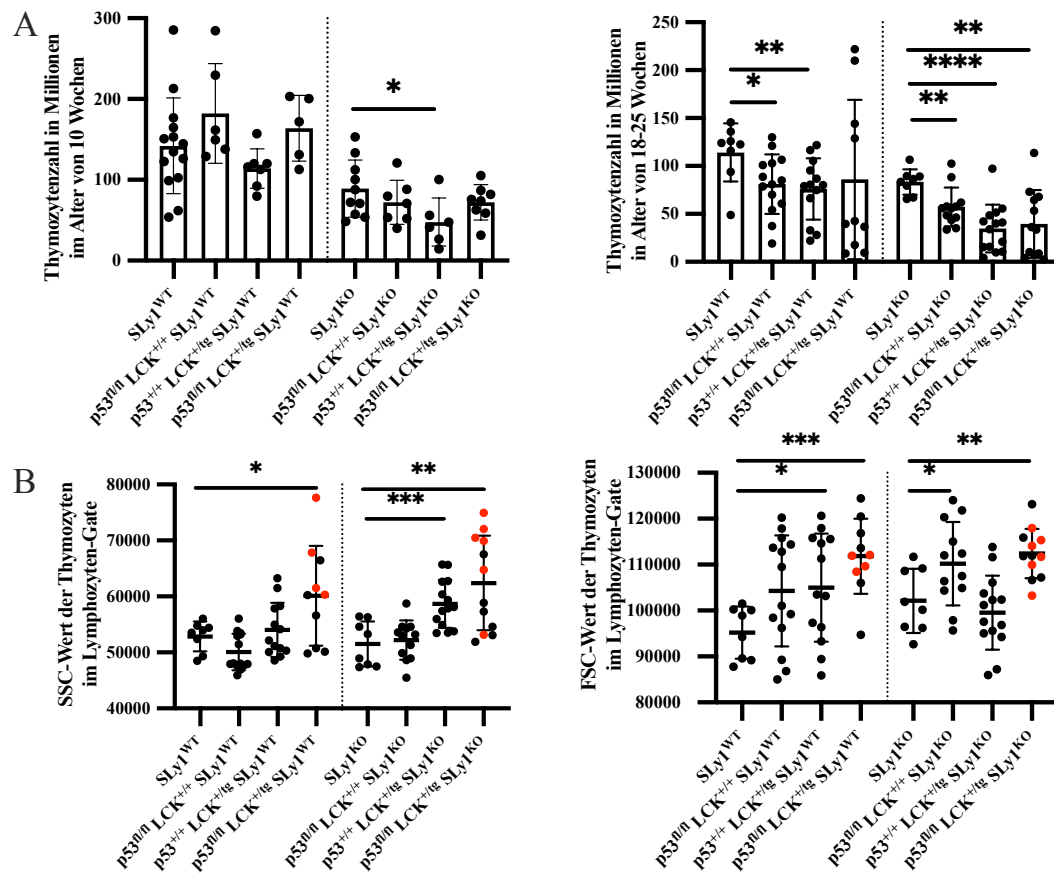


Abbildung 42. Thymozytenzahl, SSC- und FSC-Werte in allen Kontrollgruppen dargestellt nach SLy1-Expression

(A) Thymozytenzahl

(B) Durchschnittliche SSC- (links) und FSC-Werte (rechts) entsprechend Zellgranularität und -größe der Lymphozyten der Thymusproben

Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SD von n=5-14 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Signifikanzen sind nur in Bezug auf die SLy1^{WT} bzw. SLy1^{KO}-Gruppen der eigenen SLy1-Zugehörigkeit angegeben. Rot markiert sind Proben mit großen Anteilen DN Thymozyten und geringen Anteilen DP Thymozyten (s. auch Abb. 29, 32, 33, 41 und 43).

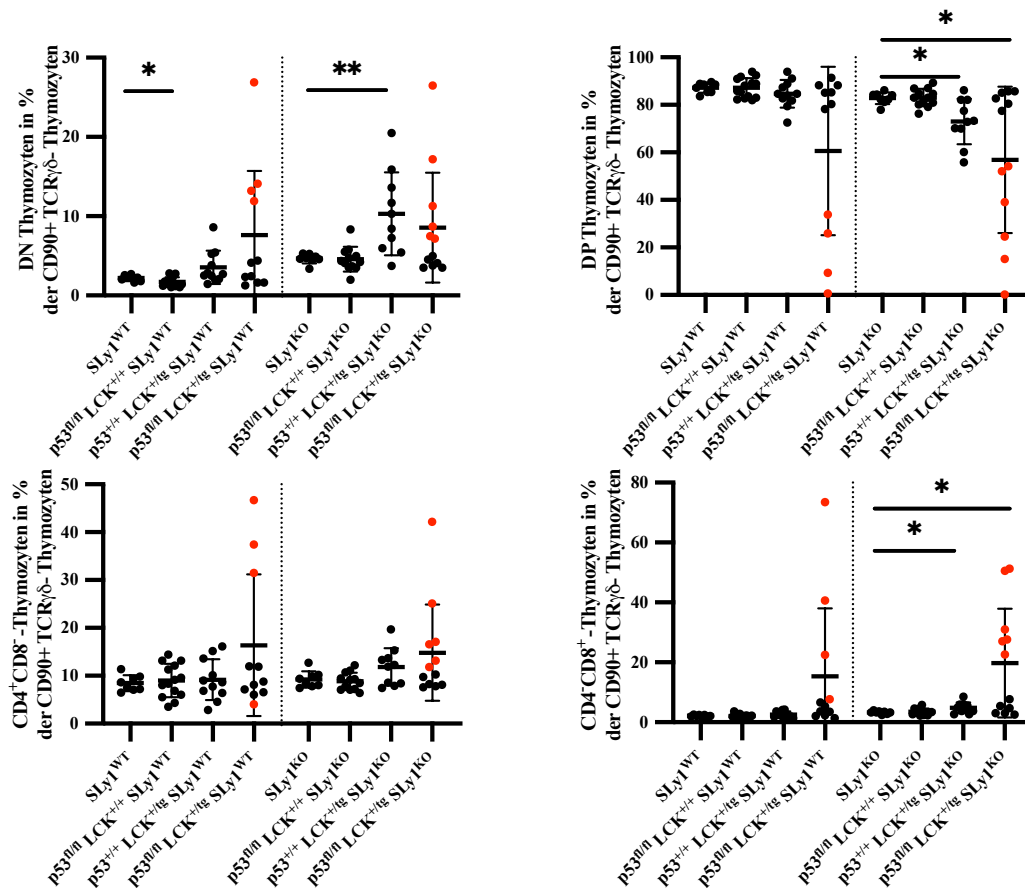


Abbildung 43. Thymozytenpopulationen in allen Kontrollgruppen dargestellt nach SLy1-Expression

DN, DP, CD4⁺ und CD8⁺ SP Thymozyten als % aller CD90⁺ TCRγδ⁻-Thymozyten

Die Graphen zeigen Mittelwerte ± SD von n=8-14 Mäusen, ungepaarter t-Test, *p<0,05, **p<0,01. Signifikanzen sind nur in Bezug auf die SLy1^{WT} bzw. SLy1^{KO}-Gruppen der eigenen SLy1-Zugehörigkeit angegeben. Rot markiert sind Proben mit großen Anteilen DN Thymozyten und geringen Anteilen DP Thymozyten (s. auch Abb. 29, 32, 33, 41 und 42).

Tabelle 24. Überleben von p53^{fl/fl} Lck^{+tg} SLy1^{WT/KO}-Tieren

Tode entsprechen verstorbenen Tieren und solchen, welche wegen ihres schlechten Allgemeinzustands präpariert wurden. Zensuren entsprechen dem Ausscheiden der Tiere aus der Überlebensstatistik für die Versuche im Alter von 10, 25 und 50 Wochen.

Genotyp	Gesamt	Zensur				Ereignis			
		10 Wo	25 Wo	50 Wo	sonstige	Vergrößerung Thymus	Vergrößerung Milz / LK	unklarer Tod	sonstige Todesursache
p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	30	8	13	1	1 (14 Wo)	2 (20, 25 Wo)	1 (39 Wo)	3 (17, 20, 33 Wo)	1 (GIT-Erkrankung, 45 Wo)
p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	31	5	10	0	1 (21 Wo)	3 (16, 17, 21 Wo)	1 (33 Wo)	10 (15, 17, 17, 18, 18, 23, 26, 27, 30, 35 Wo)	1 (Ileus, 26 Wo)
p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	25	6	14	5	0	0	0	0	0
p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	29	7	13	7	0	0	0	1 (28 Wo)	1 (Darm blutig-nekrotisch, 13 Wo)
p53 ^{fl/fl} Lck ^{+/+} SLy1 ^{KO}	28	10	12	5	0	0	0	1 (4 Wo)	0
p53 ^{fl/fl} Lck ^{+/+} SLy1 ^{WT}	30	6	14	4	0	0	0	5 (13, 19, 19, 20, 24 Wo)	1 (Speicheldrüsenabszess, 8 Wo)

Tabelle 25. Statistische Auswertung der Überlebenskurven

Die Überlebenskurven der Tiere zweier Genotyp-Gruppen (s. Abb. 39) wurden jeweils mit Log-Rank (Mantel-Cox)-Test verglichen, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+/+} SLy1 ^{KO}	p53 ^{fl/fl} Lck ^{+/+} SLy1 ^{WT}
p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}		*	**	*	*	ns
p53 ^{fl/fl} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	*		****	***	***	ns
p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{KO}	**	****		ns	ns	*
p53 ^{+/+} Lck ^{+tg} SLy1 ^{WT}	*	***	ns		ns	ns
p53 ^{fl/fl} Lck ^{+/+} SLy1 ^{KO}	*	***	ns	ns		ns
p53 ^{fl/fl} Lck ^{+/+} SLy1 ^{WT}	ns	ns	*	ns	ns	

A

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit „Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 in der T-Zell-Entwicklung“ wurde am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik unter Betreuung von Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer.

Die Western Blot- und qPCR-Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Sämtliche mRNA zur Durchführung der qPCR wurde freundlicherweise von Lena-Christin Gruber, Isabel Kloos und Daniel Schäll zur Verfügung gestellt.

Der Versuch der durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozytenpopulationen bei T-Zell-spezifischer p53-Defizienz wurde von Lena-Christin Gruber und mir durchgeführt. 3-6 Versuchstiere der 25-Wochen-alten Gruppen wurden von Lena-Christin Gruber untersucht und im Rahmen eines Vorversuchs in ihrer Doktorarbeit ausgewertet (Gruber 2021). Die Analyse aller 10-Wochen-alten, 50-Wochen-alten und der restlichen 25-Wochen-alten Tiere sowie der Tiere ohne Mutation im p53-Gen und ohne Lck-Cre-Rekombinase wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den

Barbara Schneider

B

Veröffentlichungen

Journal-Veröffentlichungen

Jaufmann, J., Franke, F. C., Sperlich, A., Blumendeller, C., Kloos, I., Schneider, B., Daisuke, S., Janssen, K.-P., Beer-Hammer, S. (2021). **The emerging and diverse roles of the SLy/SASH1-protein family in health and disease - Overview of three multifunctional proteins.** in: *FASEB J*, e21470. ISSN. 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). DOI: 10.1096/fj.202002495R.

Gruber, L.-C.* and Schneider, B.*, Nothnagel, C., Beer-Hammer, S. (2022). **Knockout of SLy1 decreases double-negative thymocyte proliferation and protects mice from p53-induced tumor formation.** in: *European Journal of Immunology*, 10.1002/eji.202250017. DOI: 10.1002/eji.202250017. *Gleicher Beitrag.

Konferenz-Beitrag

Schneider, B., Gruber, L.-C., Kloos, I., Beer-Hammer, S. **The role of SLy1 in thymocytes' p53 signaling.** 01.-04.09.2021; European Congress of Immunology.

C

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag geleistet haben:

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer für die Bereitstellung des Themas und die herzliche und kritische Begleitung im gesamten Prozess, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dr. Nürnberg für die Möglichkeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik zu promovieren.

Ich danke sämtlichen Mitarbeitern des Instituts, allen voran Claudia Müller, für die technische Unterstützung bei den Versuchen und für die Verwaltung der Versuchstierzucht.

Mein Dank gilt außerdem dem Interdisziplinären Promotionskolleg Medizin (IZKF) für die fachliche und finanzielle Unterstützung in der Durchführung dieser Arbeit.

Zuletzt bin ich sehr dankbar für das Zusammensein mit allen Doktoranden, die ich im Rahmen der experimentellen Arbeit kennengelernt habe: für die gegenseitige Unterstützung und Beratung, das gemeinsame Arbeiten und gemeinsame Pausen.