

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie  
(Prof. Dr. med. L. Trümper)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Vergleichende Analysen von drei verschiedenen  
Burkitt-Lymphom-Zelllinien im CAM-Xenograft-  
Modell unter besonderer Berücksichtigung des  
Transkriptionsfaktors LEF1**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Alina Friederike Blumberg**

aus Göttingen

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. rer. nat. D. Kube

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting

Drittreferentin: Prof. Dr. med. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 17.10.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel

"Vergleichende Analysen von drei verschiedenen Burkitt-Lymphom-Zelllinien im CAM-Xenograft-Modell unter besonderer Berücksichtigung des Transkriptionsfaktors LEF1"

eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Alina Friederike Blumberg)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Maligne Lymphome .....	1
1.2 Burkitt-Lymphome .....	3
1.2.1 Der Transkriptionsfaktor LEF1 als molekularer Marker im Burkitt-Lymphom .....	5
1.3 <i>Vessel co-option</i> .....	7
1.4 Matrix-Metalloproteasen .....	8
1.5 Ausgangslage .....	9
1.6 Zielsetzung.....	10
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Material .....	11
2.1.1 Geräte .....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	12
2.1.3 Chemikalien .....	12
2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien .....	14
2.1.5 Antikörper.....	16
2.1.6 Zelllinien .....	16
2.1.7 Versuchstiere .....	17
2.1.8 Software .....	17
2.2 Methoden .....	18
2.2.1 Zellkultur.....	18
2.2.2 MTT-Test.....	20
2.2.3 Durchflusszytometrie.....	20

2.2.4	Proteinbiochemie .....	21
2.2.5	CAM-Assay .....	24
2.2.6	Histologische Methoden .....	25
2.2.7	Statistik.....	26
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
3.1	Der Einfluss von LEF1 auf die Tumormorphologie im CAM-Xenograft-Modell verschiedener Burkitt-Lymphom-Zelllinien.....	27
3.1.1	LEF1- <i>knockdown</i> in CAM-Tumoren der Zelllinie BL-30.....	27
3.1.2	LEF1- <i>knockdown</i> beeinflusst die Tumormorphologie in BL-41-CAM-Tumoren.....	41
3.2	Vergleichende Analysen des Verhaltens der Burkitt-Lymphom-Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 im CAM-Xenograft-Modell .....	52
3.2.1	MMP2 und MMP9 als mögliche Effektoren der Burkitt-Lymphom-Heterogenität im CAM-Modell .....	56
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>65</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Repräsentativer Nachweis der LEF1-Expression in BL-30-Zellen.....	28
Abbildung 3-2: Detektion der GFP-Expression in den BL-30-Zellen mittels Durchflusszytometrie und in CAM-Tumoren durch Fluoreszenzmikroskopie. ....	29
Abbildung 3-3: Größenvergleich der BL-30-CAM-Tumoren ( $2 \times 10^6$ applizierte Zellen).....	31
Abbildung 3-4: Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl ( $2 \times 10^6$ applizierte Zellen). ....	32
Abbildung 3-5: Übersicht über repräsentative mikroskopische Aufnahmen ausgewählter CAM-Tumoren. ....	33
Abbildung 3-6: Größenvergleich der BL-30-CAM-Tumoren ( $1 \times 10^6$ applizierte Zellen).....	35
Abbildung 3-7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der BL-30-Tumoren ( $1 \times 10^6$ applizierte Zellen). ....	36
Abbildung 3-8: Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl ( $1 \times 10^6$ applizierte Zellen). ....	37
Abbildung 3-9: Übersicht über BL-30-CAM-Tumoren ( $1 \times 10^6$ applizierte Zellen).....	39
Abbildung 3-10: LEF1-KD führt im BL-2-CAM-Modell zu geringerer Tumorzellichte und <i>vessel co-option</i> .....	41
Abbildung 3-11: Repräsentativer Nachweis der LEF1-Expression in BL-41-Zellen.....	42
Abbildung 3-12: Detektion der GFP-Expression in den BL-41-Zelllinien mittels Durchflusszytometrie und in CAM-Tumoren durch Fluoreszenzmikroskopie. ....	43
Abbildung 3-13: Größenvergleich der BL-41-CAM-Tumoren.....	44
Abbildung 3-14: Repräsentative Auswahl der nativen BL-41-CAM-Tumoren.....	45
Abbildung 3-15: Repräsentative Auswahl von Tumorschnitten der vier BL-41-Subzelllinien.....	47
Abbildung 3-16: <i>Vessel co-option</i> bei <i>In-ovo</i> -Lymphomen der BL-41 nach LEF1-KD.....	48

Abbildung 3-17: LEF1-exprimierende BL-41-Tumoren zeigen keine besondere Affinität zu Blutgefäßen.....	49
Abbildung 3-18: BL-41-Tumoren weisen als morphologische Besonderheit regelmäßig eine verdickte CAM auf.....	50
Abbildung 3-19: Eine verdickte CAM zeigt sich bei BL-41-Tumoren unabhängig von der applizierten Zellzahl.....	51
Abbildung 3-20: Vergleich zweier Hellfeldaufnahmen der BL-41-Tumoren..	51
Abbildung 3-21: Die Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 unterschieden sich <i>in vitro</i> nicht signifikant in ihrer Proliferation.....	52
Abbildung 3-22: Größenunterschiede der BL-41-, BL-2- und BL-30-CAM-Tumoren. ....	53
Abbildung 3-23: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der extrahierten CAM-Tumor-Präparate.....	54
Abbildung 3-24: Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl (n).....	54
Abbildung 3-25: BL-41-, BL-2- und BL-30-CAM-Tumoren unterscheiden sich in ihrer mikroskopisch sichtbaren Zelldichte. ....	55
Abbildung 3-26: Repräsentatives Zymogramm konditionierter Medien von BL-30, BL-2 und BL-41.. ....	57

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte .....	11
Tabelle 2-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 2-3: Verwendete Chemikalien.....	12
Tabelle 2-4: Verwendete Puffer, Lösungen und Ansätze .....	14
Tabelle 2-5: Verwendete Antikörper .....	16
Tabelle 2-6: Verwendete Zelllinien .....	16
Tabelle 2-7: Mithilfe des pGIPZ-Vektors gentechnisch veränderte Burkitt-Lymphom-Zelllinien.....	17
Tabelle 2-8: Verwendete Versuchstiere .....	17
Tabelle 2-9: Verwendete Software .....	17
Tabelle 3-1: Übersicht über die BL-30-CAM-Tumoren (2x 10 <sup>6</sup> applizierte Zellen).....	30
Tabelle 3-2: Übersicht über die BL-30-CAM-Tumoren (1 x 10 <sup>6</sup> applizierte Zellen).....	34
Tabelle 3-3: Zusammenfassung der BL-41-Tumoren.....	44
Tabelle 3-4: Zusammenfassung der geernteten Tumoren. ....	53



## Abkürzungsverzeichnis

4-IPBA	<i>4-iodophenylboronic acid</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAM	Chorion-Allantois-Membran
CM	<i>conditioned medium</i>
ctrl	<i>control</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ID3	<i>inhibitor of DNA-binding 3</i>
Ig	Immunglobulin
KD	<i>knockdown</i>
LEF1	<i>lymphoid enhancer-binding factor-1</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ns-control	<i>non-silencing control</i>
P/S	Penicillin / Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	<i>phenylmethylsulfonylfluorid</i>
RIPA	<i>radio-immunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	<i>small hairpin ribonucleic acid</i>
shRNAmir	<i>microRNA-adapted shRNA</i>

TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>TBS-Tween</i>
TCF	<i>T cell factor</i>
TEMED	N, N, N', N', -Tetramethyl-ethan-1,2-diamin
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
WHO	World Health Organization
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>

# 1. Einleitung

## 1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind Tumoren des lymphatischen Systems. Sie kennzeichnen sich durch die unkontrollierte monoklonale Expansion von Lymphozyten und deren Vorläuferzellen (Kaiser und Neubauer 2013). Histologisch und historisch wird zwischen dem Hodgkin-Lymphom, das sich durch das Vorhandensein von charakteristischen großen mehrkernigen Sternberg-Reed-Zellen und einkernigen Hodgkin-Zellen auszeichnet, und den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) unterschieden (Lennert 1977). Die heterogene Gruppe der NHL macht etwa 75% der malignen Lymphome aus (Ackermann 2014).

Beim Hodgkin-Lymphom handelt es sich um ein Lymphom der B-Zellreihe, das mit einer Inzidenz von 3:100 000 Einwohnern pro Jahr auftritt und etwa ein Viertel der lymphatischen Malignome ausmacht (Piper 2007; Ackermann 2014).

Alle anderen lymphatischen Neoplasien werden als NHL zusammengefasst. Hierbei handelt es sich um eine heterogene Krankheitsgruppe, die nach der WHO-Klassifikation in erster Linie nach ihrer Abstammung von B- oder T-Lymphozyten unterteilt werden und bei denen ferner danach differenziert wird, ob sie von früheren oder späteren (peripheren) Vorläuferzellen der Lymphopoese ausgehen (Jaffe 2009; Dürkop et al. 2011). Die B-Zell-Lymphome stellen dabei mit etwa 90 % die weitaus häufigste Entität dar (Stein 2011). Die Gruppe der T-Zell-Lymphome macht dagegen nur etwa 5-10 % aller lymphatischen Tumoren aus, wobei dieser Anteil einer starken regionalen Abhängigkeit unterworfen ist (Stein 2011).

Auch wenn eigentlich durch die WHO(World Health Organization)-Klassifikation überholt, findet sich auch heute noch die Einteilung der Lymphome in niedrig- und hochmaligne durch die modifizierte Kiel-Klassifikation von 1992 (Lennert und Feller 1992). Lennert und seine Mitarbeiter beachtetten hierbei vor allem mikroskopische und klinische Gesichtspunkte (Lennert et al. 1975). Die hochmalignen Lymphome bestanden vorwiegend aus „blastischen“ (unreiferen) Zellen, die aggressiven Lymphomen entsprachen und sich durch eine rasche klinische Progredienz auszeichneten (Lennert und Feller 1992; Tiemann und Trümper 2001). Niedrigma-

ligne bzw. indolente Lymphome gingen überwiegend von „zystischen“ (reiferen) Zellen aus und wurden einem langsamer fortschreitenden Krankheitsverlauf zugeordnet (Lennert und Feller 1992; Tiemann und Trümper 2001). Da sich der Zusammenhang zwischen morphologischer Reife der Zellen und klinischer Aggressivität nicht für alle NHL zeigte und teilweise sehr irreführend ist, wird diese Einteilung zunehmend aufgegeben (Tiemann und Trümper 2001).

Nach dem 2013 veröffentlichten Bericht des Robert Koch-Instituts „Krebs in Deutschland 2009/2010“ zählen die NHL mit einer Inzidenz von 11-16:100 000 Einwohnern pro Jahr und einem Anteil von 3,4 % an allen Krebsneuerkrankungen Deutschlands zu den zehn häufigsten Malignomerkrankungen, wobei die Erkrankungsrate der NHL eine steigende Tendenz aufweist (Berger et al. 2013; Robert Koch-Institut 2013). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 69 Jahren und für Frauen bei 71 Jahren, dabei steigt das Erkrankungsrisiko im Laufe des Lebens nahezu kontinuierlich an (Robert Koch-Institut 2013). Die 5-Jahres-Überlebensrate aller NHL beträgt derzeit 67 % (Robert Koch-Institut 2013).

Die klinischen Symptome der malignen Lymphome sind von der primären Lokalisation abhängig, können aber auch ganz fehlen. Im Vordergrund stehen schmerzlose derbe Lymphknotenschwellungen (Sedlacek 2013). Außerdem können unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust auftreten (sog. B-Symptomatik) (Baumgärtel und Al-Abtah 2015). Einige Patienten entwickeln eine Hepato- und Splenomegalie, Anämie und Blutungsneigung (Baumgärtel und Al-Abtah 2015). Bei mediastinalem Befall können Atemwegobstruktionen und eine obere Einflusstauung, bei intestinaler Manifestation Bauchschmerzen oder Harnwegobstruktionen auffallen (Prinz 2012; Baumgärtel und Al-Abtah 2015). Die Diagnose wird in erster Linie durch Lymphknotenentnahme und anschließende histologische Untersuchung gestellt (Baumgärtel und Al-Abtah 2015). Als Risikofaktoren gelten Immunsuppression, z. B. nach Organtransplantationen oder bei Autoimmunerkrankungen, angeborene Immundefekte, Virusinfektionen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), dem Epstein-Barr-Virus (EBV) oder dem Humanen Herpesvirus Typ 8 (Sedlacek 2013). Eine familiäre/genetische Prädisposition scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen (Sedlacek 2013).

Die jeweilige Therapie richtet sich nach dem Subtyp und dem Erkrankungsstadium. Maligne Lymphome verfügen über eine gute Strahlensensibilität und Polychemotherapieempfindlichkeit (Ammon et al. 2013). Des Weiteren stehen Immuntherapeutika, wie der Anti-CD20-Antikörper Rituximab, der sich gegen B-Zellen richtet, sowie Interferon- $\alpha$  zur Verfügung. Bei rezidivierenden Erkrankungen kommt zudem eine hämatopoetische Stammzelltransplantation in Betracht (Matzdorff und Fritze 2012; Sedlacek 2013). In der Regel sprechen besonders die schnell wachsenden, aggressiven Lymphome, wie auch das Burkitt-Lymphom, gut auf die Therapie an, wohingegen indolente lymphatische Neoplasien, wie die chronisch-lymphatische Leukämie selten heilbar sind (Matzdorff und Fritze 2012).

## 1.2 Burkitt-Lymphome

Beim Burkitt-Lymphom (BL) handelt es sich um ein aggressives schnell proliferierendes extranodales B-Zell-NHL (Jaffe 2009; Sedlacek 2013). Benannt ist es nach Denis P. Burkitt, einem Arzt, dem während seiner Arbeit in Äquatorialafrika in den 1950er Jahren gehäuft Kiefertumoren bei Kindern aufgefallen waren (Burkitt 1958). Man unterscheidet drei Formen, einen endemischen, einen sporadischen und einen Immundefekt-assoziierten Typ (Mosse und Weck 2010). Der 1958 von Burkitt beschriebene endemische Typ betrifft in erster Linie afrikanische Kinder zwischen fünf und zehn Jahren und äußert sich durch massive Kieferwinkellymphome und intestinale Lymphadenopathien (Piper 2007). Es handelt sich um den häufigsten pädiatrischen Tumor in afrikanischen Malariagebieten (Molyneux et al. 2012). In über 95 % der Fälle sind die Tumorzellen positiv für das Epstein-Barr-Virus (EBV) (Epstein et al. 1964; Kersten et al. 1998). Das sporadische BL macht beim Erwachsenen etwa 1-2 % aller Lymphome aus, bei Kindern dagegen 40 % (Mosse und Weck 2010). Typischerweise ist beim sporadischen Typ lymphatisches Gewebe im terminalen Ileum oder der Waldeyer-Rachenring betroffen, wohingegen eine Kieferbeteiligung äußerst selten ist (Piper 2007; Mosse und Weck 2010). Eine EBV-Assoziation findet sich hier bei 20-30 % (Piper 2007). Bei HIV-Infektion oder nach Organtransplantation spricht man von einem Immundefekt-assoziierten BL (Mosse und Weck 2010).

Das BL wird mit hochdosierten kombinierten Chemotherapeutika behandelt, die u.a. Methotrexat, Cyclophosphamid oder Doxorubicin enthalten (Hummel et al.

2006; Sedlacek 2013). Außerdem kommt der monoklonale CD-20 Antikörper Rituximab erfolgreich zum Einsatz (Li und Chen 2012). Hierdurch wird eine komplette Remission bei etwa 90 % der Kinder und 70 % der Erwachsenen erreicht (Diviné et al. 2005; Hummel et al. 2006). In therapieresistenten Fällen kann zudem eine autologe hämatologische Stammzelltransplantation durchgeführt werden (Sedlacek 2013). Radiotherapie und operative Verkleinerung der Tumormasse hingegen sind i. d. R. nicht indiziert (Tiemann und Trümper 2001).

Das BL ist mit einer Verdopplungszeit von ca. 24 h der am schnellsten proliferierende Tumor des Menschen (Tiemann und Trümper 2001; Matzdorff und Fritze 2012; Molyneux et al. 2012). Außerdem handelt es sich um einen der ersten Tumoren, für den eine Onkogen-aktivierende Chromosomentranslokation festgestellt wurde (Zech et al. 1976; Molyneux et al. 2012). Als molekulares Charakteristikum des BL gilt eine Translokation des Protoonkogens *MYC* auf Chromosom 8 im Bereich q24 (Zech et al. 1976; Dalla-Favera et al. 1982; Molyneux et al. 2012; Sedlacek 2013). *MYC* ist ein universaler Verstärker aller in einer Zelle aktiven Gene (Nie et al. 2012). Es ist in vielen wachstumsfördernden Signaltransduktionswegen beteiligt und ein unmittelbar respondierendes Gen in den Signalketten vieler membranständiger Rezeptorkomplexe, wodurch *MYC* eine zentrale Rolle in Prozessen des Zellwachstums, der Proliferation, Stammzellregulation und Tumorgenese spielt (Kelly et al. 1983; Armelin et al. 1984; Dang 2012). Durch die Translokation gelangt *MYC* in 76-85 % der BL unter den Einfluss des auf Chromosom 14q32 gelegenen *enhancers* für die schwere H-Kette des Immunglobulin(*Ig*)-Gens und wird dadurch konstitutiv exprimiert (Zech et al. 1976; Dalla-Favera et al. 1982; Lenoir et al. 1985; Sedlacek 2013). In 10-16 % findet sich *MYC* in der Nähe der leichten *Ig*-Kette lambda auf Chromosom 22 (t(8;22)(q24;q11)) und in 5-8 % besteht die Translokation t(2;8)(p11;q24), wodurch *MYC* sich in dem Bereich der leichten *Ig*-Kette kappa findet (Dalla-Favera et al. 1982; Lenoir et al. 1985; Sedlacek 2013). In seltenen Fällen kann auch eine *MYC*-Translokation in nicht-*Ig*-Genbereiche festgestellt werden (Bertrand et al. 2007).

Eine *MYC*-Translokation alleine reicht allerdings nicht aus, um ein BL entstehen zu lassen (Richter et al. 2012). So konnten mithilfe von DNA-Sequenzierungen von BL-Proben genetische Veränderungen an über 2000 Stellen detektiert werden

(Richter et al. 2012). Love *et al.* (2012) stellten bei 34 % (20 von 59), Richter *et al.* (2012) sogar bei 68 % (36 von 53) der untersuchten BL eine Mutation im *inhibitor of DNA-binding 3* (ID3) fest. Dagegen tragen nur 13 % anderer B-Zell-Lymphome mit *Ig-MYC*-Translokation eine *ID3*-Mutation. Während *ID3* in seiner Wildtyp-Form als Tumorsuppressor fungiert, bewirkt es über eine fehlende Hemmung von TCF (*T cell factor*)-3 eine signifikante Hochregulierung des Zyklin D3 (Schmitz et al. 2014). Zyklin D3 wiederum vermittelt die G1- zu S-Phase-Transformation im Zellzyklus und wirkt damit proliferationsfördernd (Schmitz et al. 2014). *Gain-of-function*-Mutationen von TCF-3 finden sich bei 11 % der BL und von Zyklin D3 bei 38 % (Schmitz et al. 2012). Mutationen im *ID3*-Gen führen außerdem zu einer höheren Expression von bekannten *MYC*-Zielgenen (Love et al. 2012). Somit scheint die Kooperation zwischen Mutationen im *ID3*/TCF-3-Modul und *Ig-MYC*-Translokation ein wichtiges Kennzeichen der BL-Genese darzustellen, insbesondere, weil sie im nahe verwandten diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) kaum vorkommen (Richter et al. 2012; Schmitz et al. 2014). Ein weiteres Charakteristikum des BL stellt die aberrante Expression des Transkriptionsfaktors *lymphoid enhancer-binding factor-1* (LEF1) dar (Walther et al. 2013).

### 1.2.1 Der Transkriptionsfaktor LEF1 als molekularer Marker im Burkitt-Lymphom

Der *lymphoid enhancer-binding factor-1* (LEF1) zählt zu der Familie der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren (Travis et al. 1991; Reya et al. 2000). Das *LEF1*-Gen kodiert für ein dazugehöriges Protein, das unter anderem essentiell an der frühen Thymozytenreifung beteiligt ist (Steinke und Xue 2014). LEF1 wird nur in B-Progenitor-Zellen und T-Lymphozyten, physiologischerweise aber nicht in reifen B-Zellen exprimiert (Travis et al. 1991; Reya et al. 2000; Walther et al. 2013).

Die Faktoren der TCF/LEF1-Familie vermitteln über die Assoziation mit  $\beta$ -Catenin im Zellkern eine transkriptionelle Antwort im kanonischen Wnt-Signalweg (Behrens et al. 1996; Huber et al. 1996; Brunner et al. 1997; Riese et al. 1997; Reya et al. 2000). Über diesen werden verschiedenste physiologische Mechanismen moduliert. Dazu gehören Proliferation, Apoptose und die Differenzierung von embryonalen und adulten Stammzellen (Arce et al. 2006; Holland et al. 2013).  $\beta$ -Catenin wirkt dabei als Schlüsselmediator: Bei Wnt-Stimulation oder bestimmten Genmutati-

tionen wird  $\beta$ -Catenin im Zytosol stabilisiert und über Ran/Importin in den Nukleolus verlagert (Behrens et al. 1996; Huber et al. 1996; Reya et al. 2000). Dort bindet es an TCF/LEF1, wodurch Zelltyp-abhängig verschiedene Zielgene aktiviert werden (Jamieson et al. 2014; Scarpa und Ninfali 2015). Dies kann auch zur Aktivierung von Protoonkogenen wie *MYC* führen (He et al. 1998; Barker et al. 2000). In Verbindung mit  $\beta$ -Catenin kann LEF1 Zellproliferation und Tumorzellinvasion regulieren (Li et al. 2009). Der nukleare Import und die folgende  $\beta$ -Catenin Akkumulation korreliert außerdem positiv mit dem klinischen Grad vieler onkologischer Erkrankungen (Jamieson et al. 2014).

Globale Genexpressionsprofile von Patientenproben durch Hummel *et al.* (2006) führten zu der molekularen Definition des BL mit *LEF1* als Signaturgen. In der gezielten Untersuchung von *LEF1* in B-Zell-Lymphomen durch Walther *et al.* (2013) exprimierten 15 von 18 Patienten mit BL das *LEF1*-Gen sowie alle chronischen (6 von 6) und akuten B-Zell-Leukämien (6 von 6). Bei leukämischen Zellen überrascht dieses Ergebnis nicht, da sie aus Vorläufer-B-Zellen des Knochenmarks hervorgehen, die regelhaft LEF1-positiv sind und LEF1-abhängig proliferieren (Travis et al. 1991; Reya et al. 2000; Piper 2007). Mantelzelllymphome (0 von 5), Marginalzonenlymphome (0 von 6), folliculäre Lymphome (0 von 12), DLBCL (1 von 31) sowie reguläre Keimzentrums-B-Zellen aus Follikeln der Lymphknoten waren dagegen LEF1-negativ (Walther et al. 2013). Der Anteil von BL-Gewebe, das LEF1 exprimiert, ist damit außergewöhnlich hoch. Da physiologische Keimzentrums-B-Zellen LEF1-negativ sind, kann dessen Expression im BL als aberrant angesehen werden (Walther et al. 2013). In *microarray*-Analysen nach transientem *LEF1-knockdown* (KD) zeigte sich außerdem, dass LEF1 auch transkriptionell aktiv ist: Hier konnten neue auch mit Krebs assoziierte LEF1-Zielgene identifiziert werden (Walther et al. 2013).

LEF1 spielt auch in anderen malignen Neoplasien eine Rolle. So zeigte sich auch in Kolonkarzinom-Gewebe, verglichen mit umliegendem normalem Kolongewebe, eine signifikant erhöhte Konzentration von LEF1-mRNA und -Protein (Waterman 2004; Wang et al. 2013). In Untersuchungen durch Wang *et al.* (2013a+b) war eine erhöhte LEF1-Expression im Kolonkarzinom mit einer tieferen Tumorinfiltration, mehr Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie einem kürzeren Gesamtüberleben



assoziiert. Des Weiteren reduzierte ein LEF1-KD hier die Tumor-Zell-Viabilität, die Invasionskapazität und induzierte Apoptose (Wang et al. 2013). Als Zielgene von LEF1 konnten die Matrix-Metalloproteasen 2 und -9 identifiziert werden, deren Expression durch LEF1-KD gehemmt wurde (Wang et al. 2013). Im Maus-Xenograft-Modell wurde durch den LEF1-KD das Tumorwachstum gehemmt (Wang et al. 2013). Auch im Endometriumkarzinom ist eine Überexpression von LEF1 im Vergleich zum physiologischen Endometrium beschrieben (Shelton et al. 2012). Im Prostatakarzinom stellt LEF1 einen Schlüsselregulator der Androgen-Rezeptor-Expression dar (Li et al. 2009). Auch hier gehen erhöhte LEF1-Level mit gesteigertem Tumorzellwachstum und verstärkter Tumorzellinvasion einher (Li et al. 2009).

### **1.3 Vessel co-option**

Lange wurde angenommen, dass die meisten Tumoren und Metastasen als avaskuläre Zellansammlungen beginnen und nur durch die Induktion neuer Blutgefäße über die Größe von ein paar Millimetern hinaus wachsen können (Folkman 1971; Folkman 1990). Holash *et al.* (1999) stellten mit ihren Analysen diese bis dahin vorherrschende Meinung in Frage. Sie erkannten in Rattengliomen, dass maligne Zellen stattdessen schnell bereits existierende Gefäße kooptieren und erst danach beginnen, Angiogenese zu betreiben. Paradoxerweise geht von diesen Gefäßen daraufhin keine Angiogenese aus, vielmehr gehen sie im Verlauf vermutlich als Zeichen der Wirtsabwehr zu Grunde (Holash et al. 1999). Diese Gefäßregression hat zunächst die zentrale Nekrose des Tumors zur Folge (Holash et al. 1999). Durch die Hypoxie der Tumorzellen wird gleichzeitig am Tumorrand Angiogenese initiiert, wodurch der Tumor schließlich doch weiter versorgt wird und wächst (Shweiki et al. 1995; Holash et al. 1999). Eine zentrale Rolle wird in beiden Prozessen der Hochregulation des Angioprotein-2 und des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zugeschrieben (Holash et al. 1999). Diese sogenannte *vessel co-option* ist mittlerweile in vielen verschiedenen menschlichen Tumoren beschrieben, bevorzugt jedoch in gut durchblutetem Gewebe (Donnem et al. 2013). Auch im NHL ist diese Mikrozirkulation über präexistente Gefäße möglich und befähigt den Tumor auch ohne Neoangiogenese zum Wachstum und zur Metastasierung (Passalidou et al. 2003).

## 1.4 Matrix-Metalloproteasen

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die von der Zelle in die extrazelluläre Matrix abgegeben werden können und diese in ihrer aktiven Form abbauen (Alberts et al. 2011; Jacob und Prekeris 2015). Man unterscheidet nach ihrer Primärstruktur über 25 sekretierte oder sich an der Zellmembran befindliche Enzyme (Sternlicht und Werb 2001). MMPs spielen eine entscheidende Rolle bei den physiologischen Prozessen der Morphogenese, Wundheilung, Embryogenese und Angiogenese (Woessner 1991; Buddecke 2002).

Nach wie vor gilt der Schritt der Metastasierung als einer der entscheidenden Wendepunkte während einer Krebserkrankung, durch den sich die Lebenserwartung i. d. R. drastisch verringert (Jacob und Prekeris 2015). In vielen Studien wird angenommen, dass die Progression eines Tumors auf intrinsischen Eigenschaften der Tumorzellen beruht, wie deren Fähigkeit zu migrieren und zu invadieren (Jacob und Prekeris 2015). Abgesehen davon sind aber auch viele extrinsische Faktoren, z. B. Proteine der extrazellulären Matrix essentiell an der Regulation der Metastasierung beteiligt (Jacob und Prekeris 2015). Mindestens 14 der bekannten MMPs sind in der Tumorentwicklung und -progression beschrieben worden (Köhrmann et al. 2009). MMPs wirken in jedem Stadium der Tumorprogression mit, nicht nur wie ursprünglich angenommen, erst bei fortgeschrittener Erkrankung (Fingleton 2006). Bekannt sind in erster Linie die pro-tumorösen Funktionen; MMPs können aber auch anti-tumoröse Eigenschaften innehaben (Fingleton 2006).

Die ursprünglich beschriebene Tumor-assoziierte Rolle der MMPs lag in der Degradation der Basalmembran (Liotta et al. 1980). Der Verlust dieser Barrierefunktion ist ein wichtiger Schritt der Tumorzellinvasion und Metastasierung (Roskelley et al. 1995; Roskelley und Bissell 1995; Jacob und Prekeris 2015). Außerdem scheinen MMPs Zelladhäsionsmoleküle zu degradieren, Wachstumsfaktoren freizusetzen und zu aktivieren sowie die Tumorangiogenese zu stimulieren (Polette et al. 2004; Jacob et al. 2013). Unter den MMPs stellen MMP2, -9 und -14 Schlüsselmediatoren in der Vermittlung verschiedenster Aspekte des Tumorstwachstums und der Metastasierung dar (Chambers und Matrisian 1997; Egeblad und Werb 2002; Polette et al. 2004; Patel et al. 2009). Die Gelatinasen MMP2 und

MMP9 werden mit der Degradation der Basalmembran in Verbindung gebracht (Martin und Matrisian 2007). Außerdem ist ihr Einfluss bereits beim Mamma- und Kolon-Karzinom beschrieben, bei letzterem auch insbesondere durch LEF1 reguliert (Damodharan et al. 2011; Jacob et al. 2013; Wang et al. 2013).

## 1.5 Ausgangslage

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor LEF1 im Burkitt-Lymphom aberrant exprimiert wird (Walther et al. 2013). Außerdem konnten in *microarray*-Analysen nach transientem LEF1-*knockdown* (KD) neue Zielgene von LEF1 identifiziert werden (Walther et al. 2013). Durch Becker *et al.* (2012) wurde das Chorion-Allantois-Membran(CAM)-Xenograft-Modell erstmals für Analysen der Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL-2 genutzt und Stefan Ueberdiek begann in seiner Promotion (2016) mit stabilen LEF1-KD-Zelllinien die bis dahin unbekanntes *In-ovo*-Effekte von LEF1 in Bezug auf das Tumorstadium zu untersuchen.

In den darauf aufbauenden, bisher unveröffentlichten Experimenten mit der Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL-2 von Pia Wilming (2017) zeigten LEF1-KD-Tumoren weniger Einblutungen, als dies bei den Kontrollen der Fall war. Von den aberrant LEF1-exprimierenden CAM-Neoplasien zeigten 26,5 % Hämorrhagien, während dieser Anteil bei LEF1-KD Zellen nur 10,7 % betrug. Des Weiteren ließ sich bei den KD-Tumoren in der HE-Färbung eine Konzentration der Tumorzellen um einzelne Blutgefäße beobachten (sog. *vessel co-option*). Außerdem zeigte sich im *In-vitro*-Migrationsassay mit der Endothelzelllinie HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), dass die Endothelzellen durch den Anreiz der konditionierten Medien LEF1-exprimierender BL-2-Zelllinien stärker migrieren als mit konditionierten Medien der KD-Zelllinien. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass der Transkriptionsfaktor LEF1 eine Rolle in der Endothelzellpermeabilität von Burkitt-Lymphomen im Xenograft-Modell spielen könnte.

Da die Effekte des LEF1-KD bisher lediglich bei einer BL-Zelllinie untersucht wurden, galt es unter anderem festzustellen, ob diese auch bei anderen BL-Modell-Zelllinien zu beobachten sind und die Daten auf Burkitt-Lymphome im Allgemeinen übertragen werden können.

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die biologische Funktion von LEF1 im Burkitt-Lymphom zu analysieren. Hierzu sollte der in der Zelllinie BL-2 beobachtete Effekt von LEF1 auf die Tumervaskularisierung im CAM-Xenograft-Modell auf dessen Reproduzierbarkeit in anderen BL-Zelllinien untersucht werden: Handelt es sich dabei um eine BL-2-spezifische Funktion von LEF1 oder kann dieser Effekt für BL im Allgemeinen angenommen werden? Um diese Frage zu beantworten, wurden zusätzlich zur Zelllinie BL-2-Subklone der Zelllinien BL-30 und BL-41 mit LEF1-KD und *scrambled*-shRNA-exprimierende Kontrollen auf die CAM von Hühnerembryonen aufgetragen. Unterschiede der Tumorentwicklung wurden durch deren Ausmessung und Histologie verglichen. Gleichzeitig sollte auch ein Vergleich des CAM-Wachstums der parenteralen Zelllinien sowie eine Analyse Matrix-degradierender Prozesse durchgeführt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 2-1: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Accu Jet	Brand, Hamburg, Deutschland
Brutschrank Cytoperm	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Canoscan 5600F	Canon, Tokio, Japan
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centromat MO Schüttler	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer und Wet-Blot-System	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
GFL 3005 Schüttelapparat mit Kreisbewegung	GFL, Burgwedel, Deutschland
Glimmer-Sägeblatt 0,4 mm	Seipp, Langgöns, Deutschland
Hera freeze -80 °C Gefrierschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Ikamag RCT Magnetrührer/Heizplatte	IKA, Staufen, Deutschland
Inverses Durchlichtmikroskop Televal 31	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Kameraarm RLR	Kaiser Fototechnik GmbH & CO.KG, Buchen, Deutschland
Leica DFC290	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica DM5000 B	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica M 125	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica MZ16 FA	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Luminescent Image Analyzer LAS-4000	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Microflow Laminar Downflow Workstation	Bioquell, UK
Microm HM 355S	MICROM, Walldorf, Deutschland
Multifuge 3 L-R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Neubauerzählkammer	LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
NOVEX® DryEase® Gel Drying System	Life Technologies, Carlsbad, USA
Pinzette Dumont 5-Inox-E	Sigma, Osterode, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Shandon Citadel 2000 Tissue Processor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Shandon Histocentre™ 3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sunrise™ Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Taumelrollmischer RM 5	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
Thermocycler 60 Wasserbad	Bio-med GmbH, Theres, Deutschland
Tischzentrifuge 1-15k	Sigma, Osterode, Deutschland
Transluminator TI3, UV-Lichtquelle	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ultra Low -152 °C Gefrierschrank	Sanyo, München, Deutschland
Varistain™ 24-4 Automatic Slide Stainer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Vortex Genie 2	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Waage L2200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Walac 1450 MicroBeta® Trilux Szintillations- und Lumineszenzzähler	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Wasserbad	Köttermann Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zeiss Axis Kop 40	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
96- und 24-Well-Platte (Rund-/Flachboden)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Bijou Container 7 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Cellstar Tissue Culture Dishes	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einbettformen aus Metall	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapier (Diethylaminoethyl-Zellulose)	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Leukosilk	BSN medical, Hamburg Deutschland
Nitrozellulosemembran Hybond™-C Extra	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Novex® DryEase® Mini Cellophane	Life Technologies, Carlsbad, USA
Objekträger Super Frost®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pasteur-Plast Pipetten, steril	ratiolab®, Dreieich, Deutschland
Perfusor® Syringe 50 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Polystyrene Round-Bottom Tube 5 ml	BD Biosciences, New Jersey, USA
Ready®Gel 10 % Zymogramm (Gelatine)	BioRad, München, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotilabo®- Einbettkassetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> ) für Suspensionszellen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 2-3: Verwendete Chemikalien**

Chemikalien	Hersteller
4-IPBA (4-Iodophenylboronic Acid)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	BioRad, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) (10 % in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Auto MACS™ Running Buffer	Miltenyi Biotec, Gladbach, Deutschland
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, New Jersey, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calcium-Chlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## 2. Material und Methoden

---

Complete™ Proteinaseinhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue G 250 pure	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DPX Eindeckmedium für Histologie	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Eosin B	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99 %	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd Lösung 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Full Range Rainbow Molecular Weight Markers RPN800E	GE Healthcare, München, Deutschland
Giemsa Stammlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kalium-Chlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mayer's Haemalaun Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol 99 %	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Methansäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Methyl- <sup>3</sup> H-Thymidin	GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natrium-Chlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Desoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paralplast Plus®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Phos-Stop	Roche, Basel, Schweiz
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S- Lösung (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Puromycin	Invivo Gen, San Diego, USA
ReBlot plus mild	Millipore, Schwalbach/Ts. Deutschland
Roti®-Histokit II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Load (4 x Probenpuffer)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 mit L-Glutamin	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trisbase Salzlösung (TBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Trypanblau 0.4 % in PBS	GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein Deutschland
Tween-20 (T)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasser HPLC Grad	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zymogramm Entwicklungspuffer (10x)	BioRad, München, Deutschland
$\alpha$ -Thioglycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

### 2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

**Tabelle 2-4: Verwendete Puffer, Lösungen und Ansätze**

<b>Puffer / Lösung / Ansatz</b>	<b>Zutaten</b>
Blockierlösung I	5 % BSA in TBS-T 0,1 %
Blockierlösung II	5 % Milchpulver in TBS-T 0,1 %
Bouin-Fixanz (wässriges Bouin)	71 % Formaldehyd 37 % 24 % ml Pikrinsäure 5 % Essigsäure 100 %
Einfriermedium	90 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO
Entfärbelösung	40 % Methanol 10 % Essigsäure
Färbelösung	40 % Methanol 10 % Essigsäure 0,5 % Coomassie Blau R-250
Fixierlösung	5 % Glycerin 30 % Methanol
Laufpuffer (10 x)	25 mM Trisbase 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
Lockelösung	152.45 mM NaCl 5.64 mM KCl 2.14 mM CaCl <sub>2</sub>
Luminol-Lösung	100 mM Tris/HCl pH 8,8 2,5 mM Luminol 4 mM 4-IPBA
MACS-Puffer	0,5 % (w/v) BSA in PBS
Mayers Hämalun-Lösung	1 g Hämalun 1000 ml Aqua bidestilliert 0,2 g NaJO <sub>3</sub> 50 g Kalialun 50 g Chloraldehydrat 1 g Zitronensäure
Paraformaldehyd 4 %	4 % PFA in PBS
Renaturierungslösung	2,5 % Triton-X-100



## 2. Material und Methoden

RIPA ( <i>radio-immunoprecipitation assay</i> )-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM TrisHCl (pH 7,4) 1 % (v/v) NP-40 (Igepal) 0,25 % (w/v) Natriumdeoxycholat 0,1 % (w/v) SDS PMSF 10 mg/ml (10 µl/ml RIPA-Stocklösung; frisch zugeben) Complete 20 x (40 µl/ml; frisch zugeben) Phos-Stop 20 x (40 µl/ml; frisch zugeben)
Sammelgel (für ein Gel)	2,5 ml Sammelgel-Mix 20 µl APS (10 %) 7,5 µl TEMED
Sammelgel-Mix (5 % Gel)	15 % (v/v) Acrylamid/Bis Solution (40 %) 125 mM Tris Base pH 6.8 0,1 % (w/v) SDS 5 mM EDTA
SDS Probenpuffer (4 x)	500 µl Roti@Load 1 (4 x) 1 % gesättigte Bromphenolblau-Lösung
SDS Zymographie Probenpuffer (2 x)	62,5 mM Tris-HCL, pH 6,8 4 % SDS 25 % Glycerol 0,01 % Bromphenolblau
TBS (1 x)	20 mM Tris-Base pH 7,6 137 mM NaCl pH 7,6
TBS-T	1 x TBS pH 7,6 0,1 % (v/v) Tween-20
Transferpuffer (10 x)	25 mM Trisbase pH 8,3 192 mM Glycin 15 % (v/v) Methanol
Trenngel 10 % (für 1 Gel)	5 ml Trenngel-Mix 40 µl APS (10 %) 15 µl TEMED
Trenngel-Mix (10 % Gel)	31.3 % (v/v) Acrylamid/Bis Solution (40 %) 332 mM Tris Base, pH 8.9 3.33 mM EDTA
Trypanblau-Lösung	0,4 % (w/v) Trypanblau in PBS
Zellkultur-Medium I (für Wildtyp-Zelllinien)	RPMI-1640 mit 4 mM L-Glutamin 10 % FCS 200 U/ml Penicillin 200 µg/ml Streptomycin
Zellkultur-Medium II (für transduzierte Zellen/ Puromycin-resistente Zellen)	RPMI-1640 mit 4 mM L-Glutamin 10 % FCS 200 U/ml Penicillin 200 µg/ml Streptomycin 1 µg/ml Puromycin
MTT-Lösung I	5 mg/ml MTT in PBS

MTT-Lösung II	33 % DMSO 5 % Ameisensäure 62 % Isopropanol
---------------	---

### 2.1.5 Antikörper

Tabelle 2-5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung für Immunoblot
<i>goat anti-mouse</i> IgG-HRP (D1609)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	1:20000 in 5 % Milchpulver in T-BST 0,1 %
<i>goat anti-rabbit</i> IgG-HRP (E1710)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	1:2000 in 5 % BSA in T-BST 0,1 %
<i>mouse anti-GAPDH</i> (6C5)	Abcam, Cambridge, UK	1:20000 in 5 % Milchpulver in T-BST 0,1 %
<i>rabbit anti-LEF1</i> (C18A7)	CellSignaling, Cambridge, UK	1:1000 in 5 % BSA in T-BST 0,1 %

### 2.1.6 Zelllinien

Tabelle 2-6: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
BL-2	B-Zelle, Burkitt-Lymphom, EBV-negativ, Ursprung wurde in folgendem Paper beschrieben: Vockerodt et al. 2001	Bertrand et al. 1981
BL-30	B-Zelle, Burkitt-Lymphom, EBV-negativ, Ursprung wurde in folgendem Paper beschrieben: Vockerodt et al. 2001	Calender et al. 1987
BL-41	B-Zelle, Burkitt-Lymphom, EBV-negativ, Ursprung wurde in folgendem Paper beschrieben: Vockerodt et al. 2001	Calender et al. 1987

**Tabelle 2-7: Mithilfe des pGIPZ-Vektors gentechnisch veränderte Burkitt-Lymphom-Zelllinien.** Gezeigt sind die Zelllinien mit LEF1-*knockdown* und die entsprechenden Kontroll-Zelllinien sowie die der Einfachheit halber im Folgenden verwendete Abkürzungen.

Zelllinie	Verwendete Abkürzung	Bindungsstelle der shRNA an LEF1
BL-2 pGIPZ LEF1 shA GFP high	BL-2 LEF1 sh1	3' UTR(Untranslatierte Region am 3' Ende)
BL-2 pGIPZ LEF1 shE	BL-2 LEF1 sh2	Exon 4
BL-2 pGIPZ ns-control1:2	BL-2 ctrl 1	---
BL-2 pGIPZ ns-control1:2*	BL-2 ctrl 2	---
BL-30 pGIPZ LEF1 shA3	BL-30 LEF1 sh1	3' UTR
BL-30 pGIPZ LEF1 shA4	BL-30 LEF1 sh2	3' UTR
BL-30 pGIPZ LEF1 shE2*	BL-30 LEF1 sh3	Exon 4
BL-30 pGIPZ ns-control3*	BL-30 ctrl 1	---
BL-30 pGIPZ ns-control4*	BL-30 ctrl 2	---
BL-41 pGIPZ LEF1 shE7*	BL-41 LEF1 sh1	Exon 4
BL-41 pGIPZ ns-control1*	BL-41 ctrl 1	---
BL-41 pGIPZ ns-control2*	BL-41 ctrl 2	---

### 2.1.7 Versuchstiere

**Tabelle 2-8: Verwendete Versuchstiere**

Versuchstier	Ursprung
SPF ( <i>specific pathogen free</i> ) befruchtete weiße Leghorn-Eier	VALO BioMedia, Osterholz-Scharmbeck, Deutschland

### 2.1.8 Software

**Tabelle 2-9: Verwendete Software**

Software	Hersteller
Graph Pad Prism 5.04 for Windows	Graph Pad Software Inc., San Diego, USA
IBM SPSS Statistics 24	IBM Corporation, Armonk, USA
IC Capture 2.0	The Imaging Source, Bremen, Deutschland
Image J 1.48s (image processing and analysis in Java)	Rayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Intrascience Imaging	Intrascience Limited, Dublin, Irland
LAS v 3.8 Leica Application Suite	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Microbeta Windows Workstation 4.0	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Microsoft Word, Power Point, Excel (2010)	Microsoft, Redmont, USA
NIS Elements F 2.20	Nikon, Tokio, Japan

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Burkitt-Lymphom-Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 verwendet. Die Suspensionszellen wurden mit einer Konzentration von  $0,3 - 1 \times 10^6$  Zellen pro ml Kulturmedium unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für alle Versuche wurden Zellen mit einer Viabilität von mindestens 90 % verwendet.

#### Burkitt-Lymphom-Zelllinien mit stabilem LEF1-*knockdown*

Zur funktionellen Charakterisierung des Transkriptionsfaktors LEF1 wurden die Burkitt-Lymphom-Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 lentiviral transduziert. Es handelt sich um einen 2001 durch Kappes und Wu entwickelten replikationsinkompetenten HIV-1-basierten Lentivirus (Thermo Fisher Scientific Inc 2013).

Das pGIPZ-shRNAmir (microRNA-30 basierte *short hairpin* RNA)-Konstrukt enthält eine gegen LEF1 gerichtete shRNA-Sequenz, die stabil in das Lymphomgenom integriert wird. Bei der nächsten Transkription wird auch die anti-LEF1-shRNA abgelesen. Die entstehende shRNA bindet dabei komplementär an die LEF1-mRNA (*messenger* RNA) und führt zu deren Degradation. Zur Selektion und Expressionskontrolle der shRNA enthält der pGIPZ-Vektor die Anlage einer Antibiotikumresistenz gegen Puromycin sowie zusätzlich eine *green fluorescent protein* (GFP)-Sequenz. Die Puromycinresistenz dient der Selektion der shRNAmir-exprimierenden Zellen. Die GFP-Expression erlaubt eine visuelle Quantifizierung der transduzierten Zellen via Durchflusszytometrie oder Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 2.2.3.). Eine *internal ribosomal entry site* (IRES) erlaubt die Expression der GFP- und Puromycinresistenzgene als einzelnes Transkript.

Als Kontrollen diente eine *non-silencing*-shRNA-Sequenz (*ns-control*), die ins Genom integriert wird, aber deren shRNA keine komplementäre Ziel-mRNA im humanen Genom binden kann. Die Puromycinresistenz und Fluoreszenzeigenschaf-

ten sind wie bei der LEF1-degradierenden Sequenz vorhanden, jedoch wird LEF1 regelhaft exprimiert.

Zu shRNA-Bindungsstellen und Zelllinien siehe 2.1.6.

### 2.2.1.2 Zellkonzentrations- und Viabilitätsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der Zellen wurde ein Aliquot eins zu eins mit einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung vermischt und mithilfe einer Neubauerzählkammer gezählt. Die Konzentration der lebenden Zellen errechnet sich wie folgt: Konzentration/ml = gezählte Zellanzahl/200 x  $10^6$ . Das Trypanblau dringt nur in geschädigte Zellwände toter Zellen ein und färbt diese im Gegensatz zu vitalen Zellen blau. Die Viabilität in Prozent ergibt sich aus dem Anteil der lebenden Zellen/Gesamtzellzahl.

### 2.2.1.3 Gefrierkonservierung und Kultivierung eines gefrorenen Aliquots

Die Suspensionszellen wurden maximal vier Wochen in Kultur gehalten. Zur Konservierung der kultivierten Zellen wurden diese bei  $-150\text{ °C}$  eingefroren. Hierzu wurde zunächst die gewünschte Zellzahl bei 120 g und  $21\text{ °C}$  7 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in je 1 ml Einfriermedium pro  $5 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Darauffolgend wurde je 1 ml in ein Einfrierröhrchen abgefüllt (à  $5 \times 10^6$  Zellen) und zum schonenden Abkühlen ( $1\text{ °C/min}$ ) in Isopropanolboxen bei  $-80\text{ °C}$  zwischengelagert, bevor sie in  $-150\text{ °C}$  überführt wurden.

Um gefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die entsprechenden Einfrierröhrchen im Wasserbad bei  $37\text{ °C}$  schnell aufgetaut, der Inhalt mit 9 ml Zellkultur-Medium verdünnt und ein Aliquot zur Konzentrationsbestimmung entnommen. Der Rest wurde bei 120 g und  $21\text{ °C}$  7 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit Medium auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt.

### 2.2.1.4 Herstellung konditionierter Medien

Zur Herstellung konditionierter Medien (CM) wurden die Lymphom-Zelllinien in Zellkultur-Medium I mit einer Anfangskonzentration von  $3 \times 10^5$  / ml für 48 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde steril filtriert ( $0,2\text{-}\mu\text{m}$ -Poren) und bei  $4\text{ °C}$  maximal 4 Tage gelagert.

### 2.2.2 MTT-Test

Mithilfe des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-(MTT)-Tests lässt sich über die Reduktion des gelblichen Farbstoffes MTT in ein blauviolett Formazan die Glykolyserate der Zelle darstellen und somit indirekt auf die Zellviabilität und Zellproliferation schließen.

Die Zellen wurden bei 120 g, 21 °C 7 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Medium I auf eine Konzentration von  $10^5$  Zellen / ml verdünnt. Nach 20 h Inkubation in der Zellkulturflasche bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Suspensionszellen in gleichen Teilen mit Medium I verdünnt und je 100 µl der Verdünnung mit 10 µl MTT I als Sextett in einer 96-Well-Rundbodenplatte für vier Stunden inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde zentrifugiert (160 g, 21 °C, 10 min), der Überstand mit der Pipette abgenommen und 100 µl MTT-Lösung II dazugegeben. Zellen und der je nach Glykolyserate reduzierte, nun violette Farbstoff wurden mithilfe eines Schüttelapparates gelöst und die optische Dichte bei 560 nm, einem Referenzfilter von 720 nm gemessen und der Leerwert abgezogen. Je mehr Farbstoff reduziert wurde, desto höher die optische Dichte.

### 2.2.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Laser-basiertes Verfahren zur Zellcharakterisierung in Bezug auf Form, Oberflächenbeschaffenheit und Fluoreszenzeigenschaften. In dieser Arbeit wurde sie zur Quantifizierung der GFP-Expression der gentechnisch veränderten BL-Zellen und somit indirekt als Kontrolle für den pGIPZ-Vektor-vermittelten LEF1-KD verwendet. Hierzu wurden ca.  $2 \times 10^6$  Zellen aus der Zellkulturflasche entnommen und in einem Rundboden-Röhrchen bei 120 g und 21 °C 7 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer gelöst. Kurz vor der Messung wurden die Zellen im Vortexmischer durchmischt.

Während der Messung werden die angesaugten Zellen einzeln durch eine Flusskammer an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Abhängig von Zellgröße und Granularität wird dabei ein Streulicht erzeugt, das mittels Detektoren eingefangen wird. In einem dargestellten Dot Plot können dann zellpopulationsspezifische Charakte-

ristika erkannt werden. Außerdem kann über die Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht die Fluoreszenzeigenschaft, hier ausgelöst durch das GFP, bestimmt werden. Die Daten wurden durch die Software CellQuest™ (Becton Dickinson) analysiert.

### 2.2.4 Proteinbiochemie

#### 2.2.4.1 Zellyse

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurde stets auf Eis gekühlt gearbeitet. Zunächst wurden  $3 \times 10^6$  Zellen bei 120 g und 21 °C 7 min sedimentiert und das Zellpellet mit 1 ml kaltem PBS (4 °C) gewaschen. Es folgte erneutes Zentrifugieren bei 400 g und 4 °C 5 min. Jedes Zellpellet wurde in 100 µl RIPA-Lösung gelöst und 30 min lysiert, danach bei 500 g und 4 °C 15 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und die im Pellet befindlichen Zellreste verworfen.

#### 2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Proteinlysat erfolgte nach der Bradford Methode mittels Photometrie (Bradford 1976). Um aus der später ermittelten Absorption Rückschlüsse auf die tatsächliche Proteinkonzentration der Proben ziehen zu können, wurde eine BSA (*bovine serum albumin*)-Standardverdünnungsreihe (0 µg/ml – 100 µg/ml) erstellt. Die Proteinlysate und die RIPA-Lösung als Leerwert wurden 1:80 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und hiervon sowie von der Standardverdünnungsreihe je 50 µl als Triplets in eine 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde auf jede Probe 200 µl der Roti®Quant-Lösung (1 x) gegeben und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Aus den Ergebnissen der Standardverdünnungsreihe wurde eine Eichgerade erstellt und anhand derer die Proteinkonzentration der Lysate ermittelt.

#### 2.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Proteine lassen sich über einem elektrischen Feld ihrer Größe nach separieren. In Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöste Proteine nehmen proportional zu ihrer Masse negative Ladungen des anionischen SDS auf und können dann in einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durch die unterschiedlich starken Ladun-

gen aufgetrennt werden. Kleine und damit weniger negativ geladene Proteine wandern dabei schneller durch die Maschen des Polyacrylamidgels und finden sich weiter entfernt von der Auftragsstelle als große.

Das Gel besteht aus zwei Phasen, einem 5 %igen Sammelgel, in dem die Probe aufkonzentriert wird, und einem 10 %igen Trenngel, in dem die eigentliche Separation stattfindet. Pro Trenngel wurden zu 5 ml Trenngelmix 40 µl APS (10 %) und 15 µl TEMED gegeben, in die Gelhalterung gegossen und zur Glättung der Oberfläche mit Isopropanol bedeckt. Nach Polymerisation und Abgießen des Isopropanols wurde darauf das Sammelgel (2,5 ml Sammelgelmix, 20 µl 10 %iges APS, 7,5 µl TEMED) gegossen. Durch das Einstecken eines Kammes entstanden einzelne Fächer für die Proben.

Für eine Probe wurden zunächst 20 µg Protein in RIPA-Lysepuffer auf 15 µl verdünnt und mit 5 µl 4 x Roti<sup>®</sup>-Load 5 min bei 95 °C denaturiert, um dann nach Abkühlung auf Eis in eine Tasche des Gels aufgetragen zu werden. Bei 20 mA liefen die Proben etwa 20 min bis zum Erreichen der Trenngelgrenze, worauf die Stromstärke auf 40 mA erhöht wurde, bis die Proteinbande das Ende des Gels erreichte. Zur Detektion der Proteingröße wurde der Fullrange Rainbow<sup>™</sup> Marker verwendet.

#### 2.2.4.4 Immunoblot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran, auch Western-Blot genannt, erfolgte als Nass-Blot durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung von 100 V über 1 h bei 4 °C. Die Blotkammer wurde wie folgt aufgebaut, wobei alle Komponenten in Transferpuffer getränkt waren: Kathode(-), dünner Schwamm, zwei *whatmanpaper*, Polyacrylamidgel, Nitrozellulosemembran, zwei *whatmanpaper*, dünner Schwamm, Anode(+). Nach dem Blotten wurde die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung durch eine reversible Färbung mit dem Azofarbstoff Ponceau S überprüft und fotografisch dokumentiert, anschließend durch Schwenken in TBS-T 0,1 % wieder entfernt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen schloss sich ein einstündiges Blocken in 5 % Milch in TBS-T 0,1 % oder 5 % BSA in TBS-T 0,1 % an.

Die Färbung spezifischer Proteinbanden durch primäre Antikörper erfolgte, indem die Membran über Nacht (üN) bei 4 °C in einer Antikörperlösung inkubiert wurde.



Es folgten 3 x 10minütiges Waschen in TBS-T 0,1 % und 1 h Inkubation in sekundärem Antikörper anti-*rabbit* oder anti-*mouse* IgG-HRP. Danach wurde erneut 3 x 10 min in TBS-T 0,1 % gewaschen. An den sekundären Antikörper ist eine Meerrettichperoxidase gekoppelt (HRP, *horseradish peroxidase*), wodurch nach Aktivierung durch die Entwicklerlösung ein Chemilumineszenzsignal ausgestrahlt wird. Die Entwicklerlösung setzt sich aus einer luminolhaltigen Lösung und einer Peroxid-Lösung zusammen, die erst kurz vor Gebrauch in gleichen Teilen zusammen pipettiert und auf die Membran aufgetragen wurde. Nach einigen Minuten lichtgeschützter Inkubation wurde die ausgestrahlte Chemilumineszenz mit dem Luminescent Image Analyser detektiert.

Um eine Membran mehrfach zu färben, mussten die vorher verwendeten Antikörperkomponenten durch 15minütiges Strippen in 1 x *reblot-mild*-Lösung entfernt werden. Es folgte 3 x 10 min Waschen in TBS-T 0,1 % und 1 h Blocken in 5 % Milch in TBS-T 0,1 % oder 5 % BSA in TBS-T 0,1 %. Hiernach wiederholten sich die Schritte wie im vorherigen Absatz.

### 2.2.4.5 Zymographie

Die Zymographie dient dem semiquantitativen Nachweis der enzymatischen Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Die Probe wird auf speziellen Polyacrylamidgelen, die als Substrat der Proteasen Gelatine enthalten, elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die Proteasen renaturiert und verstoffwechseln dann in einem Entwicklungspuffer das Substrat. Nach Färbung des Gels verbleiben die Bereiche mit aktiven Proteasen als helle Banden. Die hier verwendeten Gelatine-Gele weisen MMP2 und MMP9 nach.

Die Zellüberstände (CM) wurden in gleichen Teilen mit 2 x Probenpuffer gemischt. Das 10 % Gelatine-Zymogramm-Gel wurde in Laufpuffer im BioRad Western Blot System eingespannt und je Tasche 24 µl aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 24 mA und V konstant, bis die Probe großzügig durchgelaufen war. Es schloss sich eine einstündige Renaturierung der Enzyme bei RT in der Renaturierungslösung an. Die Substratverdauung fand 48 h bei 37 °C in Entwicklungspuffer statt. Die Gelatine im Gel wurde mindestens 1 h bei RT in Coomassie-

Lösung gefärbt und die verdauten Bereiche danach 1-2 h in Entfärbungslösung wieder entfärbt, bis weiße Banden sichtbar wurden.

Die Gele konnten konserviert werden, indem sie 30 min bei RT in Fixierlösung geschwenkt und dann in ebenfalls darin getränkte Cellophan Folie eingespannt wurden. Die Konstruktion trocknete dann mindestens einen Tag.

### **2.2.5 CAM-Assay**

Mithilfe des Chorion-Allantois-Membran(CAM)-Assays können Tumorgenese und Ausbreitungscharakteristika *in vivo* im befruchteten Hühnereimodell beobachtet werden. Dies umfasst die Freilegung der CAM, das Beimpfen mit kultivierten Burkitt-Lymphom-Zellen und schließlich das Ernten der sich durch die Blutgefäße der CAM versorgenden Tumoren. Die unterschiedliche Entwicklung der Tumoren wurde durch deren Ausmessung und Histologie verglichen.

#### Freilegung der CAM

Nach drei Tagen Bebrütung und regelmäßigem Wenden der Hühnereier bei 37,8 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit, wurde mithilfe einer Säge in der Eischale ein kleines Fenster eröffnet. Damit sich der Embryo unter der Eihaut besser absenkt und er beim Entfernen dieser nicht verletzt wird, wurde zusätzlich seitlich in die Luftblase des Eis ein kleines Entlastungsloch gesägt und die Eihaut mit Lockelösung befeuchtet. Das Fenster wurde mit Leukosilk® verschlossen, die Hühnereier weiter im Brutschrank unter den genannten Bedingungen inkubiert.

#### Beimpfen der CAM mit Burkitt-Lymphom-Zellen

Die Beimpfung erfolgte sieben Tage nach der CAM-Freilegung, also am zehnten Tag der Embryonalentwicklung. Um gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden alle Zellen zwei Tage vor Beimpfung zentrifugiert und im Medium I kultiviert. Das Matrigel wurde von -20 °C auf -80 °C gekühlt, um dann auf Eis bei 4 °C üN langsam aufzutauen. Pro Ei wurden je nach Versuch 1 - 3 x 10<sup>6</sup> Zellen in 20 µl Matrigel aufgetragen. Die entsprechende Zellzahl wurde zentrifugiert (120 g, 21°C, 7 min), der Überstand verworfen, das Zellpellet in dem verbliebenen Restmedium resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter

Zentrifugation (400 g, 21 °C, 5 min), wurde der Rest des Mediums abgenommen. Die Zellen wurden nun im Matrigel gelöst und sofort auf Eis gelagert. Pro Ei wurden 20 µl dicht an der CAM aufgetragen.

### Extraktion der Tumoren

Vier Tage nach der Beimpfung, also am 14. Tag der Embryonalentwicklung, wurden die Tumoren mit einer Pinzette aus der CAM geschnitten, in PBS gewaschen und zwischengelagert. Die Tumoren wurden am selben Tag nativ lichtmikroskopisch fotografiert. Mit den entstandenen Fotos wurde später die Tumorphäche mit dem Programm Image J ermittelt. Die den GFP-Vektor enthaltenden Lymphome konnten zudem fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden.

### **2.2.6 Histologische Methoden**

#### 2.2.6.1 Fixierung und Einbettung der Tumoren in Paraffin

Die Tumoren wurden mindestens drei Tage in wässriger Bouin-Lösung bei 4 °C fixiert, danach über mehrere Tage in 70 % Ethanol gewaschen. Die fixierten Tumoren wurden maschinell im Shandon Citadel 2000 Tissue Processor für die Einbettung in Paraffin vorbereitet. Zum Entwässern durchliefen sie dabei eine aufsteigende Ethanolreihe (70 % für 3 h, 80 % für 1 h, 90 % für 1 h, 96 % für 1 h, 99 % für 2 h) und verblieben danach für 1,5 h in Isopropanol. Nach dreimaliger Inkubation in Xylol (30 min, 45 min, 45 min) wurden sie zunächst für 30 min, danach für 7 h bei 60 °C durch Paraplast Plus<sup>®</sup> infiltriert. Hiernach erfolgte die Einbettung der Präparate senkrecht ausgerichtet in Paraplast Plus<sup>®</sup> in kleine Einbettkassetten. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden mit dem Microtom 3 - 4 µm dick geschnitten, im Vakuum getrocknet und anschließend gefärbt.

#### 2.2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Tumorschnitte wurden maschinell mit dem Varistain<sup>™</sup> 24-4 Automatic Slide Stainer durch Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt. Hierbei wurden sie zunächst 2 x 5 min in Xylol entparaffiniert, durchliefen dann eine absteigende Ethanolreihe (je 2 min 99 %, 96 %, 80 % und 60 %), wurden 2 min in destilliertem Wasser getränkt und anschließend 4 min in Mayers Hämalaun-Lösung inkubiert. Es schloss sich ein einminütiges Waschen in destilliertem Wasser, gefolgt von einem

15minütigen Waschen unter fließendem Leitungswasser an. 7 min Färbung in Eosin, 1 min Waschen in destilliertem Wasser, je 1 min in 60 %, 80 %, 96 % Ethanol und 2 x 2 min in 99 % Ethanol und abschließende Überführung in Xylol vollendete die HE-Färbung. Im feuchten Zustand wurden sie schließlich mit DPX Eindeckmedium und Deckgläsern eingedeckt. Nach dem Trocknen üN konnten die Schnitte lichtmikroskopisch analysiert und fotografiert werden.

### 2.2.7 Statistik

Die Ergebnisse der Experimente wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (Mittelwert  $\pm$  SD) angegeben. Gruppenergebnisse wurden statistisch mittels ANOVA-Verfahren (*one-way analysis of variance*) bzw. Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunnett-post-Test oder *Dunn's multiple comparison*-Test verglichen. Zum Vergleich zweier parametrischer Gruppen wurde der T-Test angewendet. Die erforderlichen Testbedingungen, Normalverteilung und Varianzgleichheit, wurden mithilfe des Kolmogorov–Smirnov-Tests bzw. des F-Tests ermittelt. Kreuztabellen wurden mithilfe des exakten Tests nach Fisher ausgewertet. Das Signifikanzniveau lag bei \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Die Analysen wurden mit GraphPad Prism 5.04 und IBM SPSS Statistics 24 durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

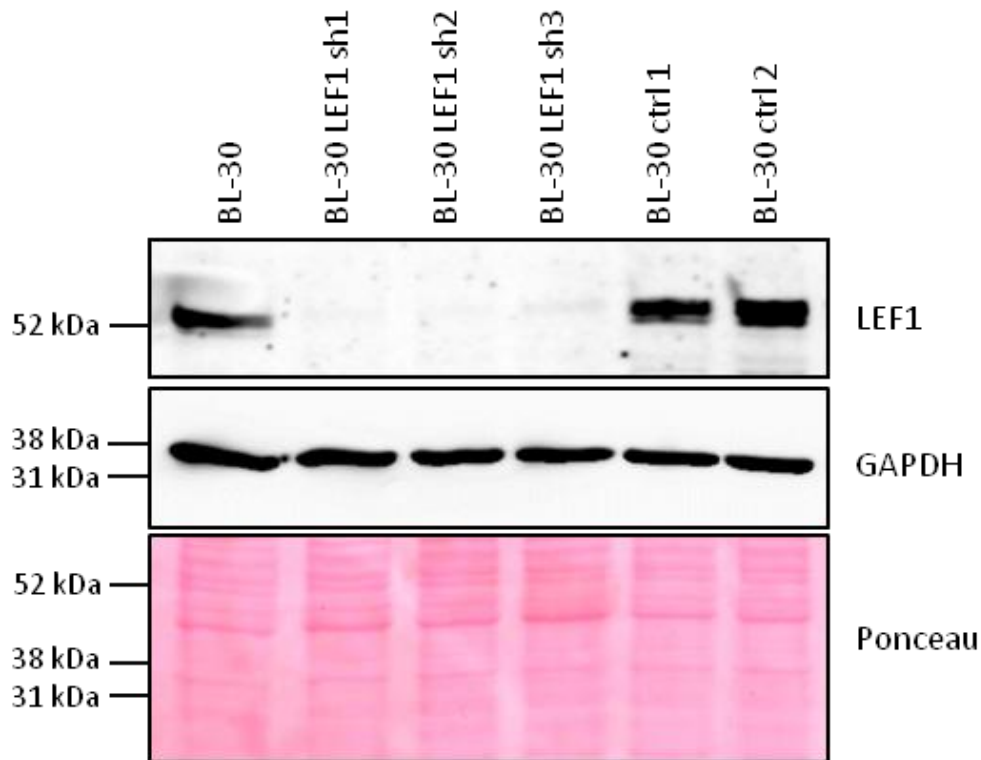
#### 3.1 Der Einfluss von LEF1 auf die Tumormorphologie im CAM-Xenograft-Modell verschiedener Burkitt-Lymphom-Zelllinien

Zur Charakterisierung des Einflusses von LEF1 im *In-vivo*-Xenograft-Modell der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinien BL-30 und BL-41 wurde der in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe für das Burkitt-Lymphom etablierte Chorion-Allantois-Membran-Assay verwendet (Becker et al. 2012; Klingenberg et al. 2014).

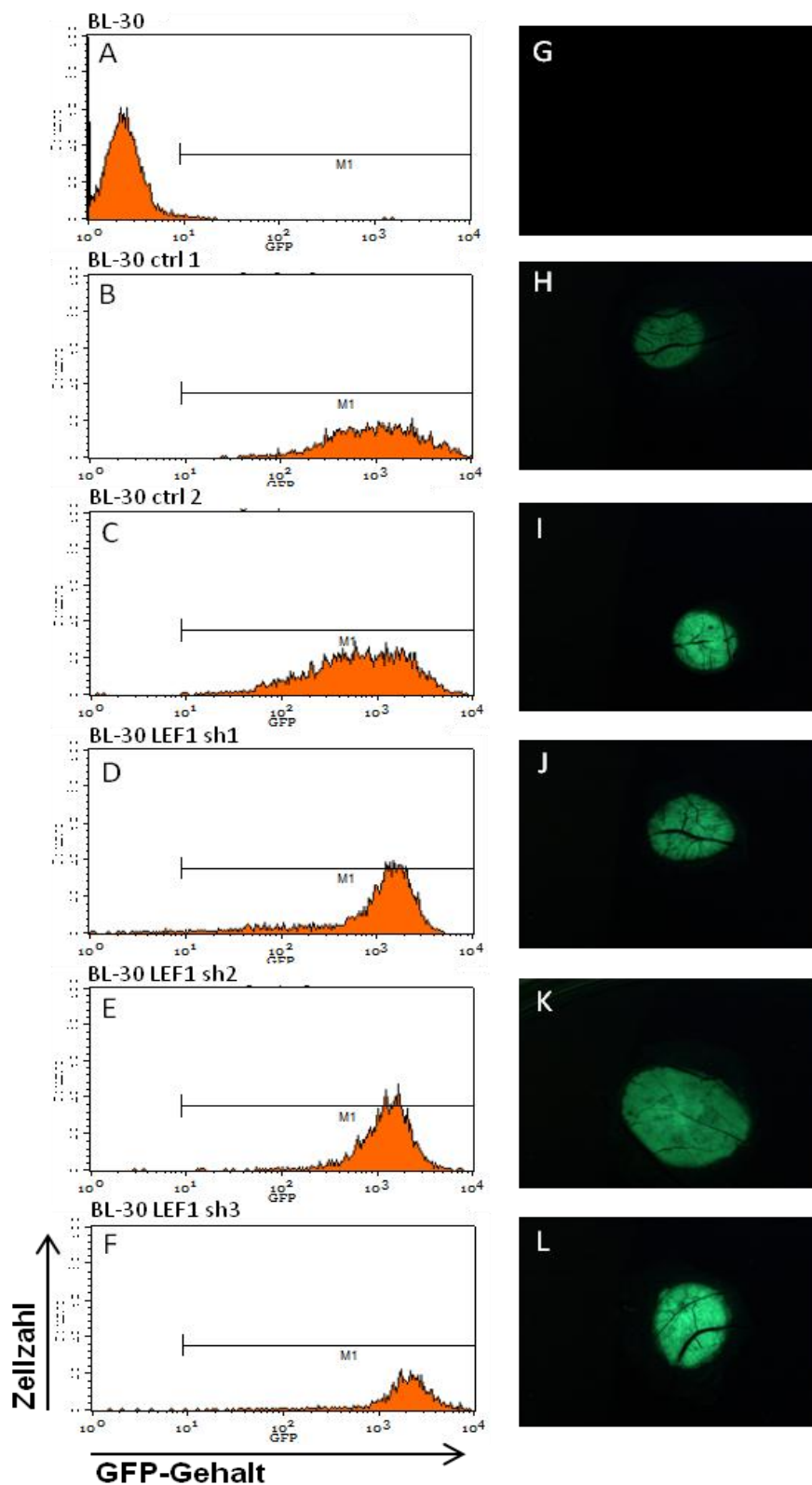
##### 3.1.1 LEF1-*knockdown* in CAM-Tumoren der Zelllinie BL-30

###### 3.1.1.1 Analysen von BL-30-CAM-Tumoren mit einer applizierten Zahl von $2 \times 10^6$ Zellen

Verwendet wurden zu Beginn zwei BL-30-Subklone mit LEF1-KD (BL-30 LEF1 sh1, BL-30 LEF1 sh2), in späteren Versuchen konnte eine dritte KD-Zelllinie hinzugezogen werden (BL-30 LEF1 sh3). Als Vergleich dienten zwei Kontrollen, die eine *scrambled*-shRNA exprimieren (BL-30 ctrl 1, BL-30 ctrl 2) und die Wildtyp-Zelllinie BL-30. Parallel zu jedem CAM-Assay wurde der LEF1-KD mittels Westernblot überprüft. In **Abbildung 3-1** lässt sich ein LEF1-KD in den genetisch veränderten Zellklonen BL-30 LEF1 sh1, sh2 und sh3 erkennen, wohingegen der Wildtyp und die beiden Kontrollen (BL-30 ctrl 1, BL-30 ctrl 2) wie erwartet LEF1 synthetisieren. Außerdem wurde vor dem CAM-Versuch der stabile Einbau des pGIPZ-Konstrukts in die transduzierten Zellklone durch Messung des GFP-Gehaltes mittels FACS-Analyse überprüft sowie am Ende des CAM-Assays die GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt (**Abbildung 3-2**). Aufgrund der Expressionskassette im pGIPZ-Konstrukt kann der GFP-Gehalt als Indikator für das Maß gesehen werden, in dem die transduzierte shRNA im Genom der Zellen abgelesen wird.



**Abbildung 3-1: Repräsentativer Nachweis der LEF1-Expression in BL-30-Zellen.** Die Abbildung zeigt vergleichende Immunoblotanalysen von BL-30-Zellen, in denen die LEF1-Proteinmenge nach LEF1-RNA-Interferenz-vermitteltem KD reduziert wurde. Dargestellt sind die parentale BL-30-Zelllinie sowie die *LEF1*-shRNA-exprimierenden Subzelllinien BL-30 LEF1 sh1, BL-30 LEF1 sh2 und BL-30 LEF1 sh3. Zum Vergleich dienen die *scrambled*-shRNA-exprimierenden Kontrollzelllinien BL-30 ctrl 1 und BL-30 ctrl 2, die nicht an Sequenzen im humanen Genom binden können und somit auch keinen LEF1-KD verursachen. GAPDH und Ponceau-Färbung dienen als Beladungskontrollen. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Proteinmassen entsprechend den genutzten Größenmarkern angegeben.



**Abbildung 3-2: Detektion der GFP-Expression in den BL-30-Zellen mittels Durchflusszytometrie und in CAM-Tumoren durch Fluoreszenzmikroskopie.** Die repräsentativen FACS-Analysen stellen die GFP-Fluoreszenz der viral transduzierten Zellen aufgetragen gegen die Zellzahl dar (A-F). Der Wildtyp BL-30 (A, G) ist genetisch unverändert und weist somit auch keine

GFP-Fluoreszenz auf. Jeweils rechts der FACS-Analyse ist die Fluoreszenzaufnahme eines entsprechenden CAM-Tumors dargestellt (G-L).

Um die *In-ovo*-Auswirkungen des LEF1-KD in der Zelllinie BL-30 zu charakterisieren wurden die zuvor beschriebenen *in vitro* kultivierten Zelllinien auf die CAM von Hühnerembryonen aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.5). Zunächst standen nur zwei Zelllinien mit reduzierter LEF1-Expression zur Verfügung (BL-30 LEF1 sh1 und sh2). Die Beimpfung der CAM wurde in den im Folgenden beschriebenen Versuchen mit  $2 \times 10^6$  Zellen pro Ei durchgeführt. Die entstandenen soliden und scharf begrenzten Tumoren wurden nach vier Tagen Bebrütung geerntet, nativ licht- und fluoreszenzmikroskopisch fotografiert und anschließend histologisch aufgearbeitet. Die histologischen Präparate wurden dann auf morphologische Besonderheiten hin untersucht. **Tabelle 3-1** zeigt eine Übersicht der geernteten Neoplasien und deren durchschnittliche Größe. Differenzen zwischen der Anzahl der geernteten Tumoren und der Zahl initial beimpfter Eier gehen auf Verluste durch Tod der Hühnerembryonen, Kontaminationen und unzureichendes Anwachsen der Tumoren zurück. Insgesamt konnten 67 von 80 Tumoren ausgewertet werden.

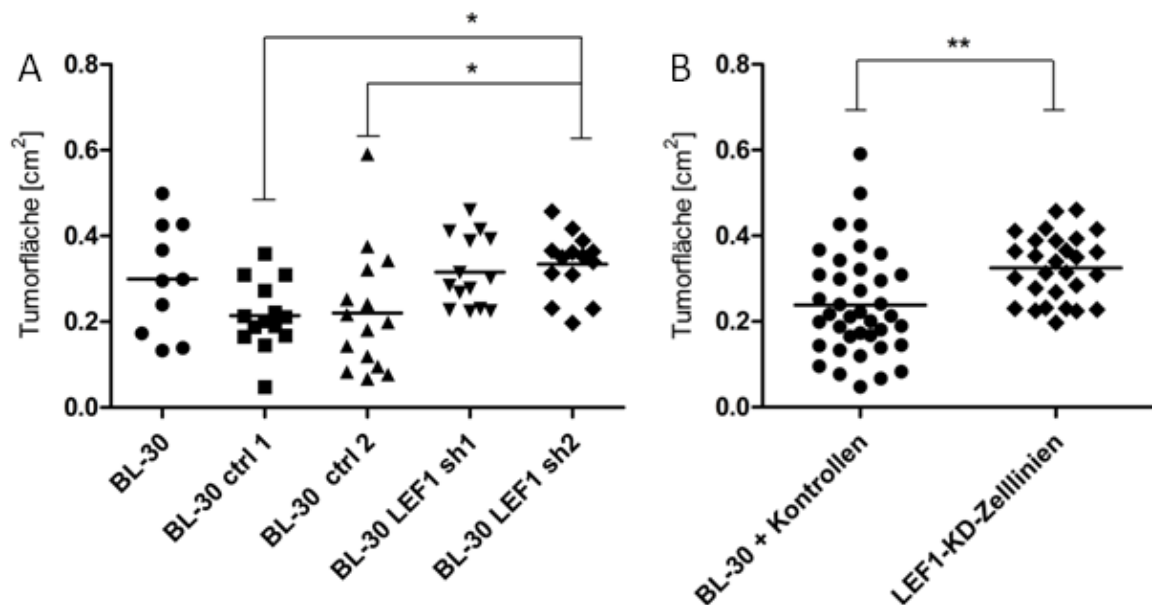
**Tabelle 3-1: Übersicht über die BL-30-CAM-Tumoren ( $2 \times 10^6$  applizierte Zellen).** Die Tabelle stellt die in zwei biologischen Replikaten geernteten CAM-Tumoren der verschiedenen BL-30-Subklone und die durchschnittliche Größe dar. Angegeben ist die Anzahl der geernteten Tumoren, in Klammern die Zahl der initial beimpften Eier.  $2 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Zelllinie	Zahl der geernteten Tumoren an den initial beimpften Eiern		Mittelwert der Tumorflächen [cm <sup>2</sup> ]
	1. CAM-Assay	2. CAM-Assay	
BL-30	5 (8)	5 (7)	0,300
BL-30 ctrl 1	9 (10)	5 (6)	0,214
BL-30 ctrl 2	9 (10)	6 (6)	0,221
BL-30 LEF1 sh1	8 (9)	6 (7)	0,316
BL-30 LEF1 sh2	9 (10)	5 (7)	0,334

In **Abbildung 3-3 A** sind die Größen der einzelnen Subzelllinien zusammenfassend graphisch dargestellt. In der Größenanalyse konnte festgestellt werden, dass die Kontrollzelllinien durchschnittlich kleiner sind als die Wildtyp-Zelllinie. Außerdem zeigen sich beide Kontrollen signifikant kleiner als die Zelllinie BL-30 LEF1



sh2. Die KD-Zelllinien und die BL-30 sind dagegen in ihrer Durchschnittsgröße vergleichbar. Werden die aberrant LEF1-exprimierenden Tumoren und die LEF1-KD-Neoplasien zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst, sind die KD-Tumoren immer noch signifikant größer (**Abbildung 3-3 B**).

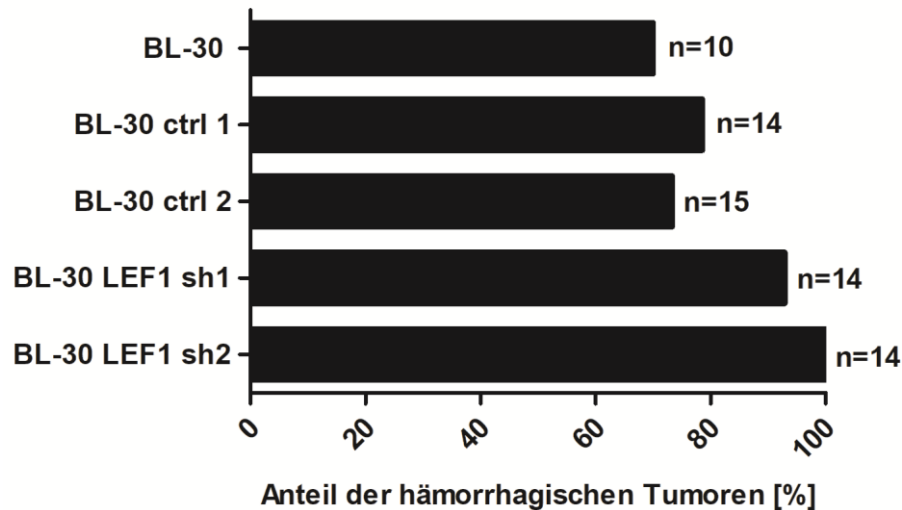


**Abbildung 3-3: Größenvergleich der BL-30-CAM-Tumoren ( $2 \times 10^6$  applizierte Zellen).** In der Grafik A sind die Größen der Tumoren in Form ihrer Fläche der einzelnen Zelllinien mit Mittelwert dargestellt. Die Zelllinie BL-30 LEF1 sh2 bildet signifikant größere Tumoren als die beiden Kontrollen BL-30 ctrl 1 und 2. Auffällig ist, dass die beiden Kontrollen sichtbar kleiner sind, als die parenterale BL-30 und diese auch keinen Größenunterschied zu den KD-Zelllinien zeigt. In Grafik B sind die aberrant LEF1-exprimierenden Zellen und die KD-Zelllinien zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst. Auch hier ist der Unterschied signifikant. A: Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's multiple comparison*-Test; \* $p < 0,05$ ; B: T-Test; \*\* $p < 0,01$ .  $2 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Insgesamt findet sich demnach ein Größenunterschied in Form der Fläche zwischen den LEF1-exprimierenden und LEF1-defizienten Tumoren. Die Kontrollzelllinien bilden dabei aber kleinere Tumoren als die parenterale BL-30.

Die Analyse der geernteten CAM-Tumoren zeigte, dass diese unabhängig vom LEF1-Status in 83,6 % der Fälle (56 von 67 geernteten Tumoren) am nativen Präparat sichtbare hämorrhagische Nekrosen aufwiesen. Der Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl der einzelnen Subzelllinien ist in **Abbil-**

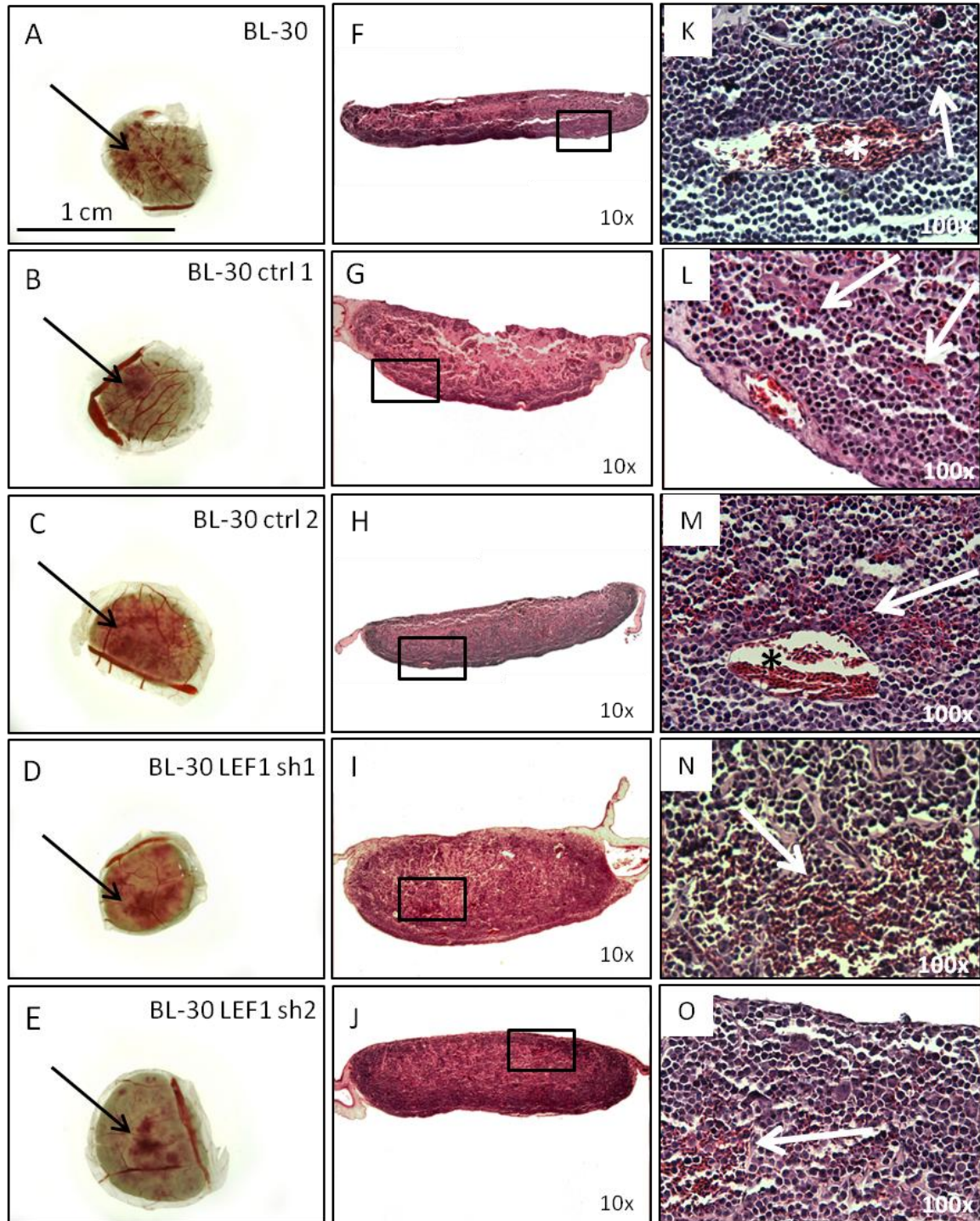
**Abbildung 3-4** dargestellt. In der statistischen Analyse findet sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen der Anzahl der eingebluteten Tumoren und der Subzelllinie.



**Abbildung 3-4: Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl ( $2 \times 10^6$  applizierte Zellen).** Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Gesamtzahl (n) der geernteten Präparate. Der Transkriptionsfaktor LEF1 begünstigt keine Einblutungen im BL-30-CAM-Modell. Die LEF1-KD-Zelllinien BL-30 LEF1 sh1 und sh2 zeigen tendenziell sogar häufiger Einblutungen als die Kontrollen und die Wildtyp-Zelllinie im nativen Präparat. Die Zahl der Einblutungen ist allerdings nicht signifikant abhängig von der Subzelllinie. Exakter Test nach Fisher bei  $p < 0,05$ .  $2 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Hier wird deutlich, dass bei LEF1-Expression keine hämorrhagischen Nekrosen in BL-30-Zellen begünstigt werden.

Nach der histologischen Aufarbeitung zeigen sich die Tumorzellen im HE-Schnitt dicht an dicht und füllen den Tumor gänzlich aus (**Abbildung 3-5 F-J**). Es finden sich im Zentrum kaum Überreste des Matrigels, in dem die Zellen appliziert wurden. Im Lymphomgewebe finden sich analog zu den nativ sichtbaren Einblutungen (**Abbildung 3-5 A-E**) reichlich freie Erythrozyten, die im Gegensatz zum Menschen beim Huhn kernhaltig sind (**Abbildung 3-5 K-O**). Im Randbereich sind die dort verstärkt auftretenden Gefäße eng im Lymphom-Zellverband eingeschlossen (**Abbildung 3-5 K-M und O**). In diesem dichten Erscheinungsbild war es nicht möglich, eine *vessel co-option* zu beobachten (**Abbildung 3-5 K-O**).



**Abbildung 3-5: Übersicht über repräsentative mikroskopische Aufnahmen ausgewählter CAM-Tumoren.** Alle Subzelllinien verfügen sehr häufig über sichtbare Einblutungen, die in A-E genauer dargestellt sind und eine hohe Zelldichte (F-J). Rechts der Hellfeldaufnahme eines repräsentativen Tumors sind die jeweils daraus gefertigten Schnitte abgebildet. Sowohl die parenterale BL-30 (A, F, K) und die Kontrollen (B, G, L: BL-30 ctrl 1 und C, H, M: BL-30 ctrl 2) als auch die LEF1-KD-Zelllinien BL-30 LEF1 sh1 (D, I, N) und sh2 (E, J, O) zeigen regelhaft makroskopisch (A-E) und mikroskopisch Hämorrhagien (K-O) im Tumorgewebe. Schwarzer Pfeil: Einblutungen. Wei-

ßer Pfeil: eosinophile kernhaltige Erythrozyten zwischen den Tumorzellen. Stern: Blutgefäß. 2 x 10<sup>6</sup> Zellen in 20 µl Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke 3-4 µm.

Um festzustellen, ob mögliche Effekte des LEF1-KD durch die große Anzahl der BL-30-Zellen im geernteten Präparat maskiert werden, wurde eine Versuchsreihe angeschlossen, in der die auf die CAM aufgetragene Zellzahl um 50 % auf 1 x 10<sup>6</sup> reduziert wurde.

### 3.1.1.2 Analysen von BL-30-CAM-Tumoren mit einer applizierten Zahl von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen

In den folgenden Untersuchungen wurde getestet, ob sich morphologische Unterschiede zwischen LEF1-aberranten und LEF1-reduzierten BL-30-CAM-Tumoren bei einer geringeren Anzahl der auf die CAM gegebenen Lymphomzellen erkennen lassen. In dem anschließend beschriebenen CAM-Assay konnten die KD-Zelllinien um eine weitere ergänzt werden (BL-30 LEF1 sh3).

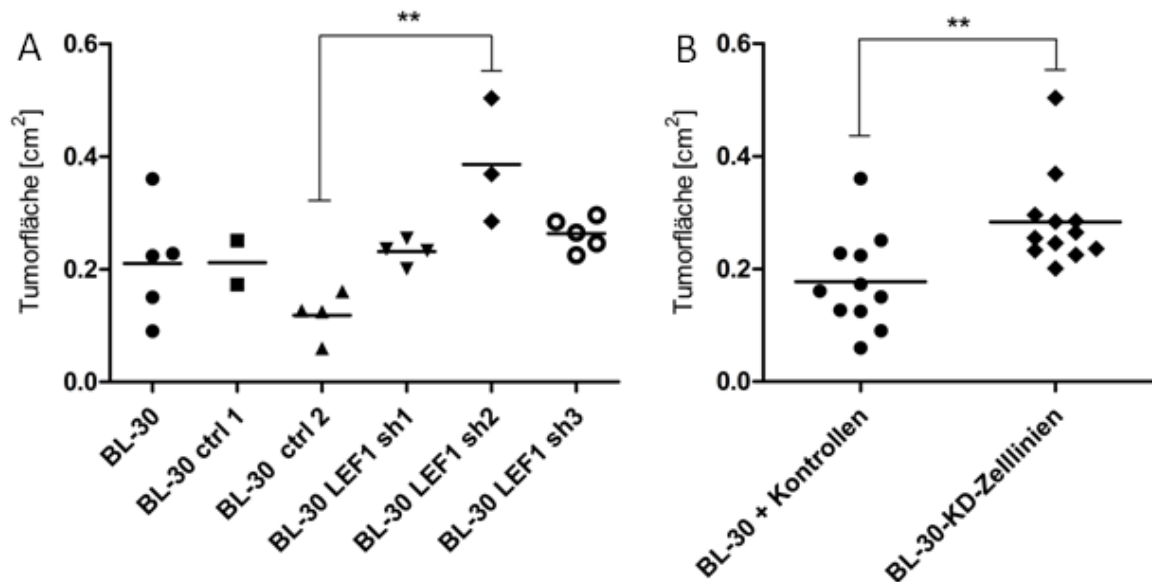
**Tabelle 3-2** gibt eine Übersicht über die Anzahl der pro Zelllinie geernteten CAM-Neoplasien und deren durchschnittliche Größe.

**Tabelle 3-2: Übersicht über die BL-30-CAM-Tumoren (1 x 10<sup>6</sup> applizierte Zellen).** Die Tabelle stellt die geernteten CAM-Tumoren der verschiedenen BL-30-Subklone und deren durchschnittliche Größe dar. Angegeben ist die Anzahl der geernteten Tumoren, in Klammern die Zahl der initial beimpften Eier. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 20 µl Matrigel, 4 d Inkubation.

Zelllinie	Zahl der geernteten Tumoren an den initial beimpften Eiern in einem CAM-Assay	Mittelwert der Tumorfleichen [cm <sup>2</sup> ]
BL-30	5 (6)	0,210
BL-30 ctrl 1	2 (5)	0,235
BL-30 ctrl 2	4 (5)	0,118
BL-30 LEF1 sh1	4 (5)	0,231
BL-30 LEF1 sh2	3 (5)	0,386
BL-30 LEF1 sh3	5 (6)	0,233

In **Abbildung 3-6 A** sind die einzelnen Tumorgößen graphisch aufgetragen. Die BL-30 ctrl 2 ist unterdurchschnittlich klein und die BL-30 LEF1 sh2 erneut überdurchschnittlich groß. Die weiteren Zelllinien unterscheiden sich kaum in ihrer Tu-

morggröße. Werden die parenterale BL-30 mit den beiden Kontrollen bzw. die KD-Zelllinien zusammengefasst, zeigt sich insgesamt ein signifikanter Größenunterschied zugunsten der KD-Tumoren (**Abbildung 3-6 B**).



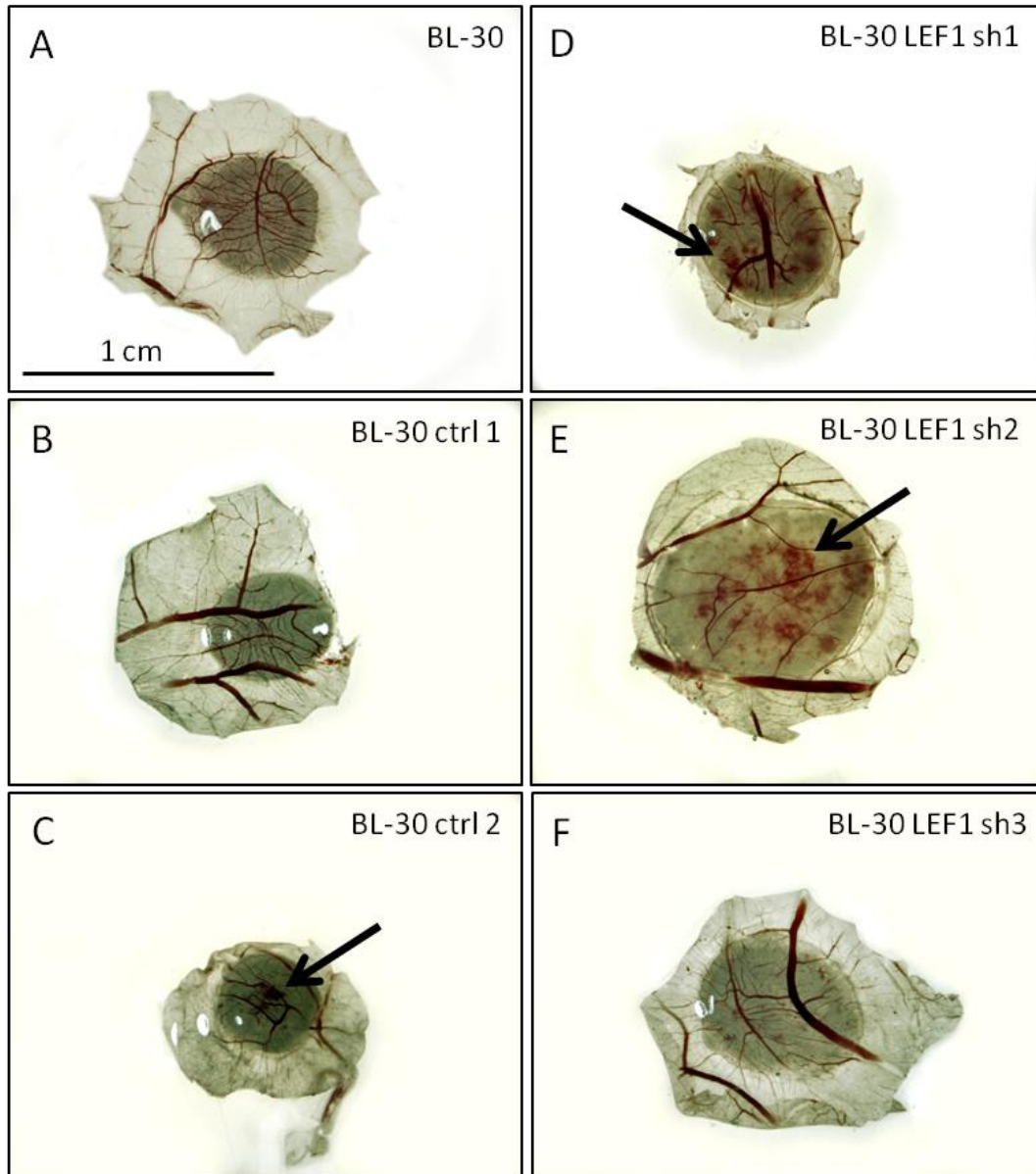
**Abbildung 3-6: Größenvergleich der BL-30-CAM-Tumoren ( $1 \times 10^6$  applizierte Zellen).** In der Grafik A sind die Größen der Tumoren in Form ihrer Fläche der einzelnen Zelllinien mit Mittelwert dargestellt. Die Zelllinie BL-30 LEF1 sh2 bildet signifikant größere Tumoren als die Kontrolle BL-30 ctrl 2. Die restlichen Zelllinien zeigen eine vergleichbare Größe. In Grafik B sind die aberrant LEF1-exprimierenden Zellen und die KD-Zelllinien zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst. Hier zeigt sich insgesamt ein signifikanter Unterschied. A: Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's multiple comparison*-Test; \* $p < 0,05$ ; B: T-Test; \*\* $p < 0,01$ .  $2 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Es findet sich demnach auch bei einer geringeren applizierten Zellzahl ein Größenunterschied in Form der Fläche zwischen den LEF1-exprimierenden und LEF1-defizienten Tumoren, wobei dieser in besonderem Maße durch zwei der sechs Zelllinien bedingt ist. Insgesamt sind die Ergebnisse konsistent mit **Abbildung 3-3**.

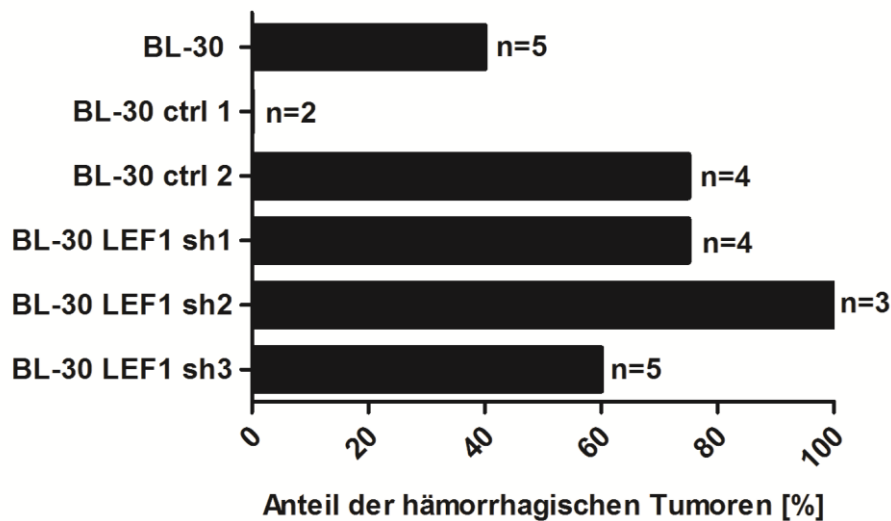
In den Hellfeldaufnahmen der **Abbildung 3-7** werden beispielhafte Tumoren der sechs Zelllinien gezeigt. Hämorrhagische Nekrosen am frisch geenteten Präparat waren trotz der Reduktion der Zellzahl bei 60,9% aller geernteten Tumoren sichtbar (14 von 23 Tumoren), auch wenn die Blutungen insgesamt schwächer als bei



$2 \times 10^6$  applizierten Zellen ausfielen (**Abbildung 3-7 C-E**). Die LEF1-KD-Zelllinie BL-30 LEF1 sh2 zeigt sogar häufiger Einblutungen als Kontrollen und Wildtyp, wobei sich insgesamt keine Abhängigkeit zwischen Zelllinie und Anzahl der hämorrhagischen Tumoren nachweisen lässt (**Abbildung 3-8**).

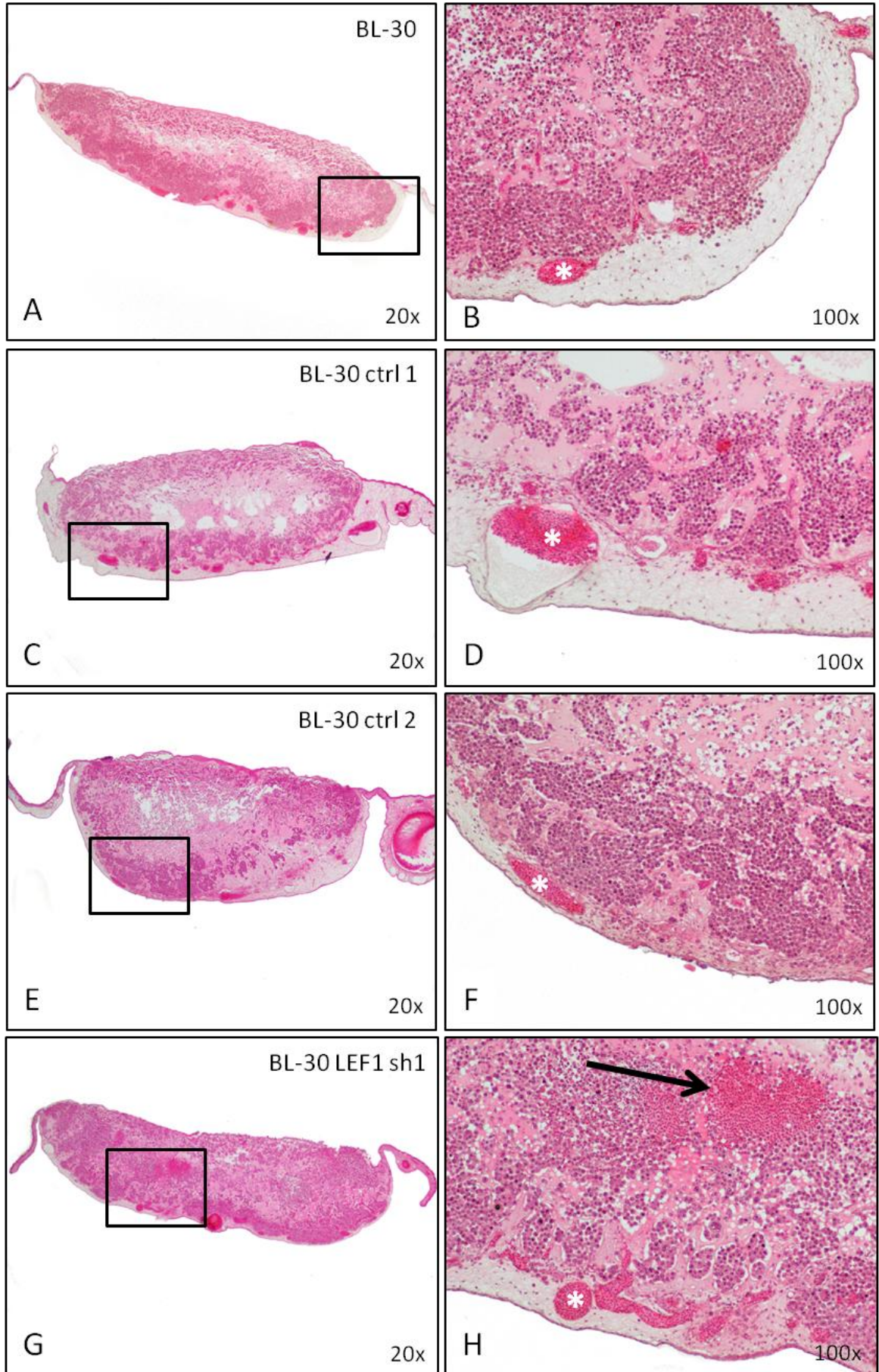


**Abbildung 3-7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der BL-30-Tumoren ( $1 \times 10^6$  applizierte Zellen).** Die Fotos zeigen repräsentative Aufnahmen der sechs verschiedenen BL-30-Zelllinien. Sowohl aberrant LEF1-exprimierende (A-C) als auch LEF1-defiziente BL-30-Tumoren (D-F) zeigen regelmäßig Hämorrhagien. Pfeil: hämorrhagischer Bereich.  $1 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

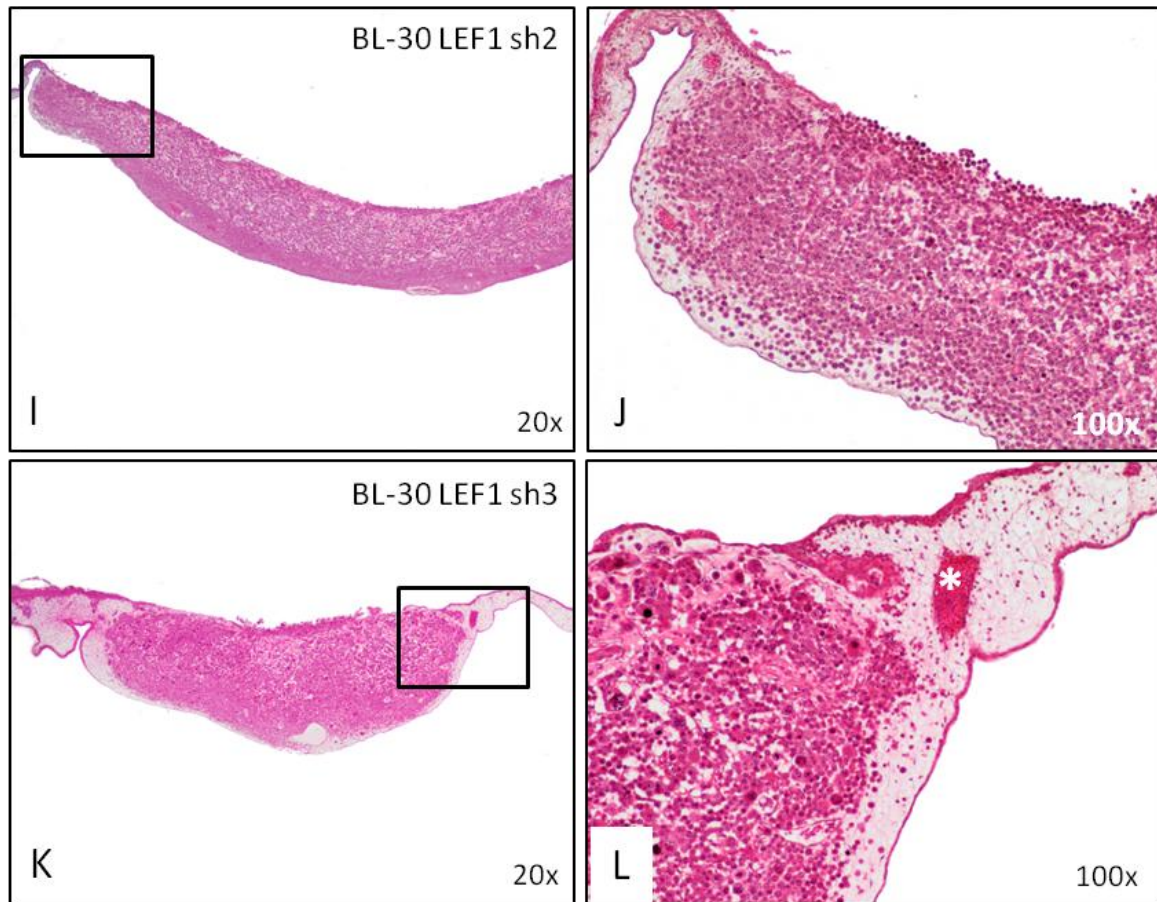


**Abbildung 3-8: Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl ( $1 \times 10^6$  applizierte Zellen).** Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Gesamtzahl (n) der geernteten Präparate. Der Transkriptionsfaktor LEF1 begünstigt keine Einblutungen im BL-30-CAM-Modell. Die LEF1-KD-Zelllinie BL-30 LEF1 sh2 zeigt sogar häufiger Einblutungen als Kontrollen und Wildtyp-Zelllinie im nativen Präparat. Die Zahl der Einblutungen ist nicht signifikant abhängig von der Subzelllinie. Exakter Test nach Fisher bei  $p < 0,05$ .  $1 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Auf histologischer Ebene fanden sich ebenfalls keine signifikanten morphologischen Abweichungen zwischen LEF1-exprimierenden Tumoren und Neoplasien mit reduzierter LEF1-Menge. Die Zelldichte der entstandenen Tumoren ist insgesamt sichtbar geringer als bei der doppelten aufgetragenen Zellzahl, welches durch das teilweise zwischen den Lymphomzellen noch sichtbare gleichmäßig eosinophil gefärbte Matrigel deutlich wird (**Abbildung 3-9** Vergrößerungen rechts). Auch freie Erythrozyten finden sich seltener, was sich mit den zwar in 60,9 % der Fälle vorhandenen, aber sich nicht immer über den gesamten Tumor ausbreitenden Blutungen deckt (vergl. **Abbildung 3-7** und **Abbildung 3-9**). Alle Zelllinien verfügen nach wie vor über keine herausragende Neigung, sich in ihrer Ausbreitung nach Blutgefäßen zu richten und zeigen ein ähnliches Maß an unverdaulichem Matrigel (**Abbildung 3-9**). Im Tumorrandbereich ist regelmäßig eine bindegewebige „Abkapselung“ der Lymphomzellen zum CAM-Gewebe zu erkennen (**Abbildung 3-9** B, D, F, H, L).



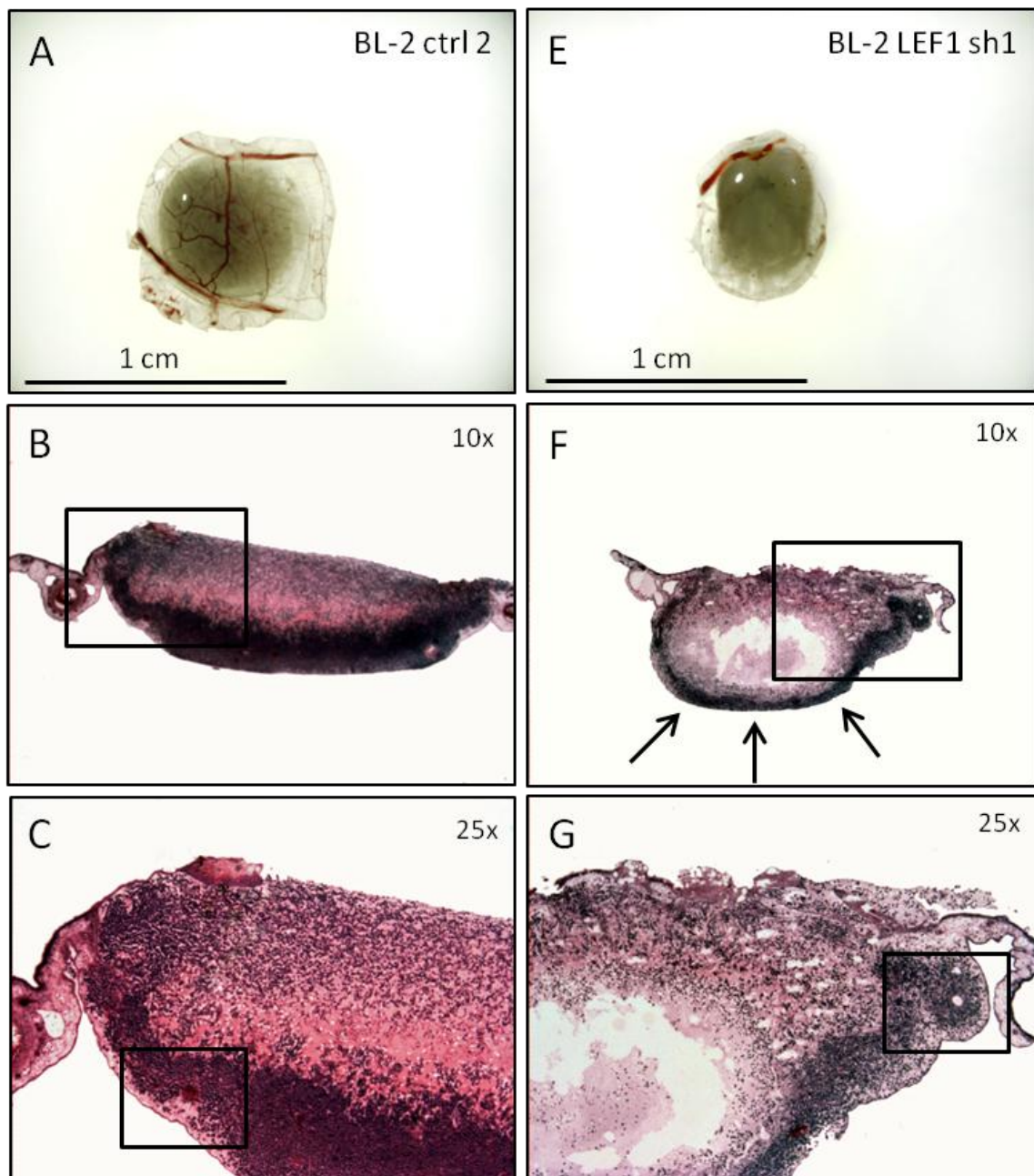


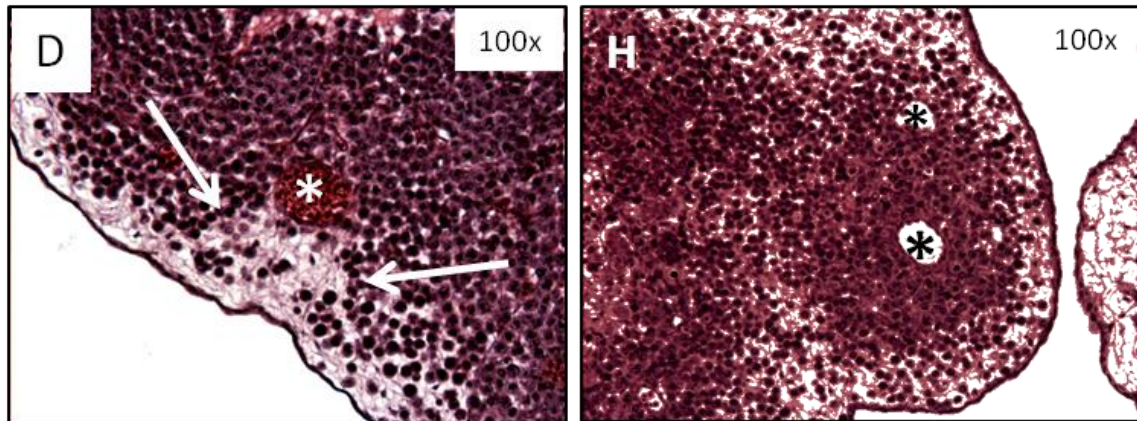


**Abbildung 3-9: Übersicht über BL-30-CAM-Tumoren ( $1 \times 10^6$  applizierte Zellen).** Die Abbildung zeigt in A-F repräsentative Tumoren der Subzelllinien mit aberranter LEF1-Expression und in G-L Tumoren der Zelllinien mit reduzierter LEF1-Menge. Rechts ist jeweils ein vergrößerter Ausschnitt aus der linken Übersichtsaufnahme abgebildet. Auch bei  $1 \times 10^6$  beimpften Zellen führt ein LEF1-KD zu keinen morphologischen Besonderheiten wie *vessel co-option*: Die Blutgefäße (Stern) im Randbereich sind nicht in besonderer Form von Lymphomzellen umringt (H, J, L). G und H zeigen einen repräsentativen Tumor der KD-Zelllinie BL-30 LEF1 sh1, bei dem ein eingebluteter Bereich angeschnitten ist (Pfeil). Insgesamt lassen sich keine nennenswerten morphologischen Unterschiede zwischen den Subzelllinien erkennen. Stern: Blutgefäß.  $1 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke 3-4  $\mu$ m.

Im Vergleich zu diesen Ergebnissen zeigt **Abbildung 3-10** die morphologischen Auffälligkeiten, die in der Zelllinie BL-2 nach LEF1-KD beobachtet werden konnten und auch in den medizinischen Doktorarbeiten von Stefan Ueberdiek (2016) und Pia Wilming (2017) beschrieben worden sind. Hier sind exemplarisch eine Kontrollzelllinie und ein Tumor mit reduzierter LEF1-Menge gegenübergestellt. Unter aberranter LEF1-Expression entwickelt sich ein dichter Tumor (vergl. **Abbildung 3-10 B und F**), wobei die einzelnen Lymphomzellen keine Ausrichtung nach Blut-

gefäßen erkennen lassen (**Abbildung 3-10 C und D**). Bei reduzierter LEF1-Menge zeigen sich dagegen zellärmere Tumoren, die außerdem das Phänomen der *vessel co-option* aufweisen, bei dem die Tumorzellen zu präexistierenden Gefäßen migrieren und entlang dieser proliferieren. Diese *vessel co-option* ist in den Bildern G und H zu erkennen. Abgesehen von den histologischen Unterschieden zeigten LEF1-positive BL-2-Tumoren mehr Hämorrhagien als LEF1-reduzierte (Wilming 2017).





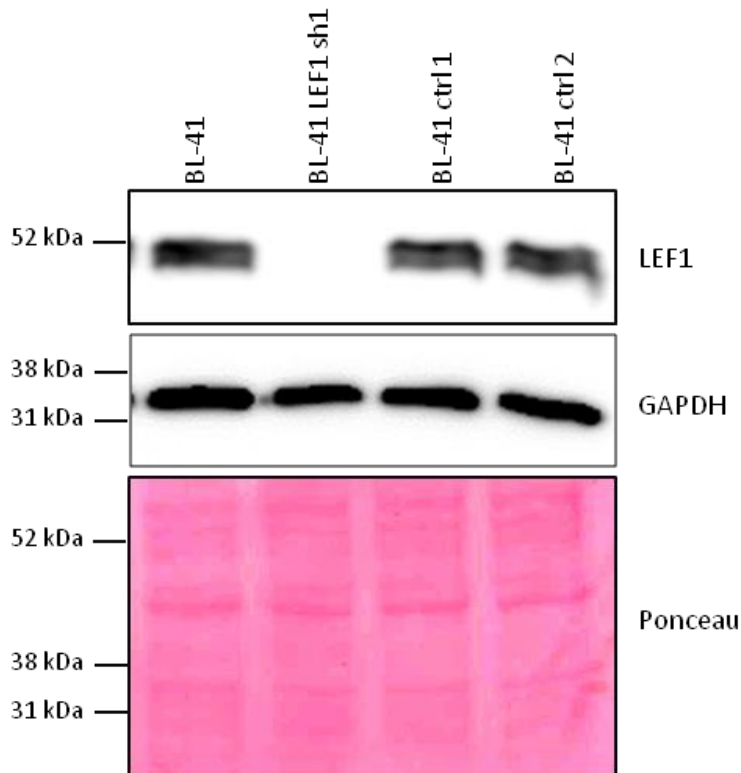
**Abbildung 3-10: LEF1-KD führt im BL-2-CAM-Modell zu geringerer Tumorzellichte und vessel co-option.** BL-2-CAM-Tumoren mit LEF1-KD (E-H: BL-2 LEF1 sh1) weisen im Gegensatz zur Kontrollgruppe (A-D: BL-2 ctrl 2) eine geringere Tumorzellichte, hauptsächlich Zellen als schmales Band im Tumorrandbereich (schwarze Pfeile, vgl. B und F) und eine Konzentration der Tumorzellen um Blutgefäße, die sog. *vessel co-option*, auf (G und H). Die Zellen der Kontrolle zeigen dagegen keine besondere Affinität, die Gefäße zu umschließen, es ist sogar eine Aussparung zu sehen (weiße Pfeile in D). A und E zeigen die entsprechenden nativen Tumoren, wobei die Kontrolle A eine stärkere Blutgefäßzeichnung aufweist. Stern: Blutgefäß.  $2 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke 3-4  $\mu$ m.

Zusammenfassend lässt sich auch nach Variation der beimpften Lymphomzellzahl im BL-30-CAM-Modell kein Nachweis eines Einflusses von LEF1 auf die Tumormorphologie, Tumorgöße und das Vorkommen von hämorrhagischen Nekrosen finden. Hier unterscheidet sich die Zelllinie BL-30 eindeutig von Tumoren der Zelllinie BL-2.

### 3.1.2 LEF1-knockdown beeinflusst die Tumormorphologie in BL-41-CAM-Tumoren

Im CAM-Xenograft-Modell zeigten die Experimente mit den Zelllinien BL-2 und BL-30 unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf den LEF1-KD. Daher war das Testen einer weiteren Zelllinie unerlässlich. Es wurde die BL-Zelllinie BL-41 ausgewählt und erneut genetisch veränderte Klone mit stabilem LEF1-KD und entsprechende Kontrollen eingesetzt. In diesen Versuchen konnte nur eine KD-Zelllinie mit ausreichendem LEF1-KD zur Verfügung gestellt werden. Insgesamt wurden vier Zelllinien miteinander verglichen: der BL-41-Wildtyp, BL-41 LEF1 sh1 als LEF1-KD sowie BL-41 ctrl 1 und BL-41 ctrl 2 als *scrambled*-shRNA-exprimierende Kontrollen. Der KD von LEF1 in der Zelllinie BL-41 LEF1 sh1 wurde

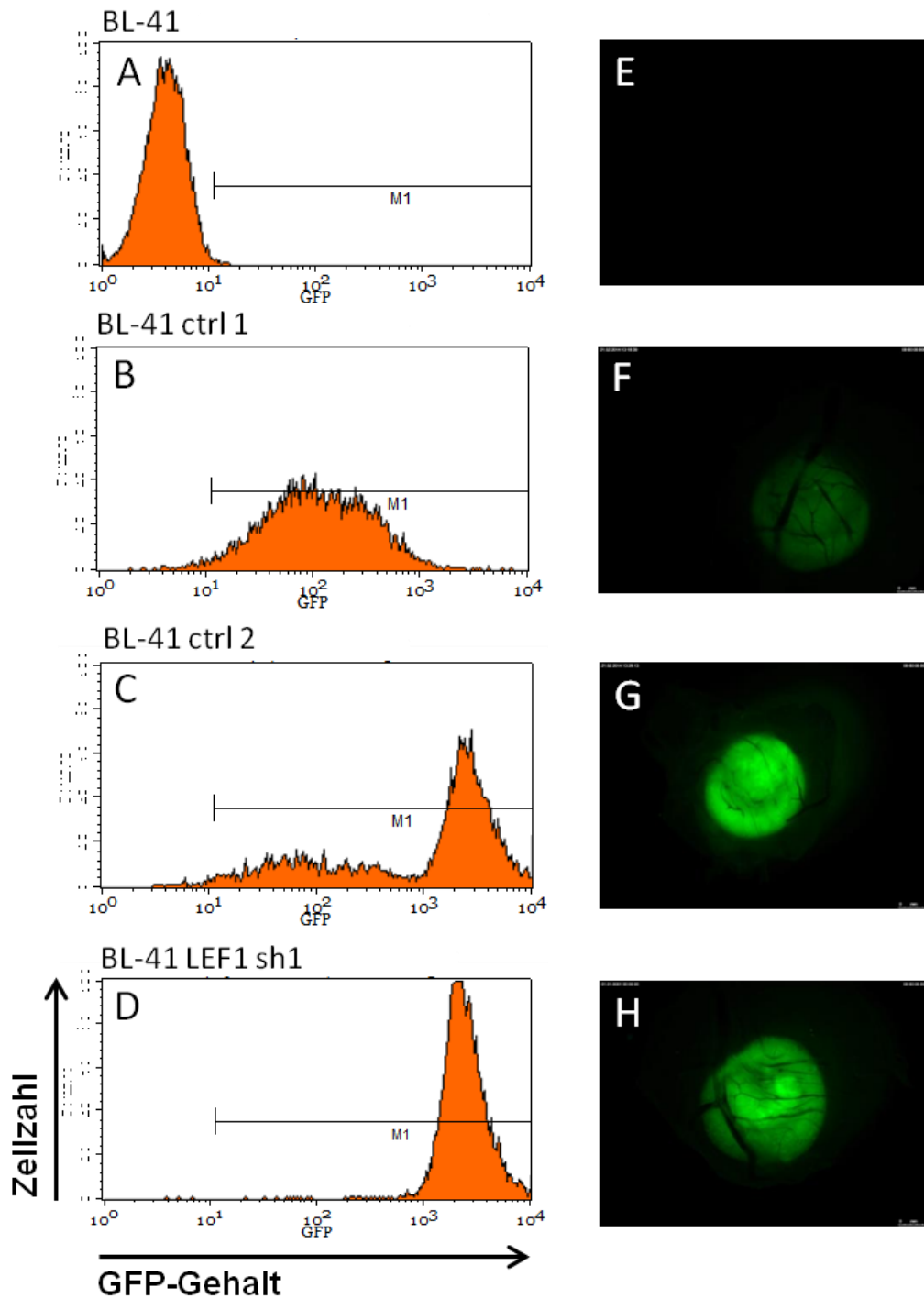
mithilfe eines Immunoblots in Lysaten dieser Zelllinien vor jeder Beimpfung der Eier verifiziert (**Abbildung 3-11**).



**Abbildung 3-11: Repräsentativer Nachweis der LEF1-Expression in BL-41-Zellen.** Die Abbildung zeigt vergleichende Immunoblotanalysen von BL-41-Zellen, in denen die LEF1-Proteinmenge nach LEF1-RNA-Interferenz vermitteltem KD reduziert wurde. Dargestellt sind die parentale BL-41-Zelllinie sowie die *LEF1*-shRNA-exprimierende Subzelllinie BL-41 LEF1 sh1. Zum Vergleich dienen die *scrambled*-shRNA-exprimierenden Kontrollzelllinien BL-41 ctrl 1 und BL-41 ctrl 2, die nicht an Sequenzen im humanen Genom binden können und somit auch keinen LEF1-KD verursachen. GAPDH und Ponceau-Färbung dienen als Beladungskontrollen. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Proteinmassen entsprechend den genutzten Größenmarkern angegeben.

Außerdem wurde vor dem CAM-Versuch mithilfe einer FACS-Analyse der stabile Einbau des pGIPZ-Konstrukts in die transduzierten Zellklone überprüft sowie am Ende des CAM-Assays die GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt (**Abbildung 3-12**). Der GFP-Gehalt kann als Indikator für das Maß gesehen werden, in dem die transduzierte shRNA im Genom der Zellen abgelesen wird.





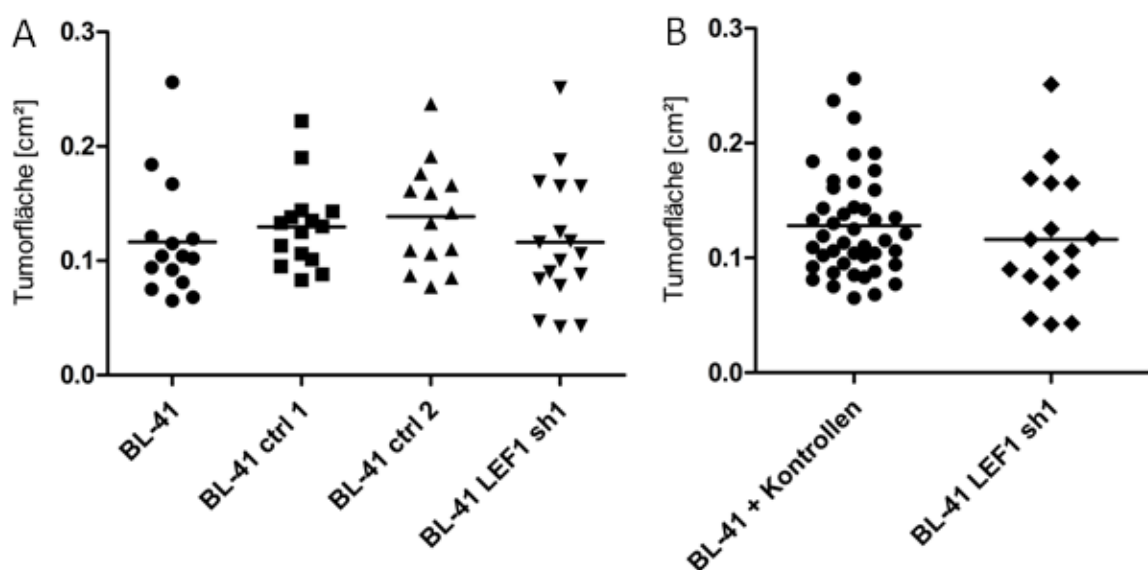
**Abbildung 3-12: Detektion der GFP-Expression in den BL-41-Zelllinien mittels Durchflusszytometrie und in CAM-Tumoren durch Fluoreszenzmikroskopie.** Die FACS-Analysen stellen die GFP-Fluoreszenz der viral transduzierten Zellen aufgetragen gegen die Zellzahl dar (A-D). Der Wildtyp BL-41 (A, E) ist genetisch unverändert und weist somit auch keine GFP-Fluoreszenz auf. Jeweils rechts der FACS-Analyse ist die Fluoreszenzaufnahme eines entsprechenden CAM-Tumors dargestellt (E-H).

Für den CAM-Assay mit BL-41-Subzelllinien wurden  $3 \times 10^6$  Zellen auf die Hühner-CAM aufgetragen. **Tabelle 3-3** gibt eine Zusammenfassung der in zwei identischen CAM-Assays beimpften und geernteten Lymphome und in einer dritten Spalte die durchschnittliche Größe der Tumoren an. Es finden sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den Zelllinien.

**Tabelle 3-3: Zusammenfassung der BL-41-Tumoren.** Gezeigt ist eine Übersicht aller geernteten BL-41-Präparate in zwei Replikaten und deren durchschnittliche Fläche. Angegeben ist die Anzahl der geernteten Tumoren, in Klammern die Zahl der initial beimpften Eier.  $1 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Zelllinie	Zahl der geernteten Tumoren an den initial beimpften Eiern		Mittelwert der Tumorflächen [cm <sup>2</sup> ]
	1. CAM-Assay	2. CAM-Assay	
BL-41	6 (8)	9 (9)	0,117
BL-41 ctrl 1	7 (8)	8 (8)	0,130
BL-41 ctrl 2	6 (8)	8 (8)	0,139
BL-41 LEF1 sh1	5 (9)	12 (12)	0,116

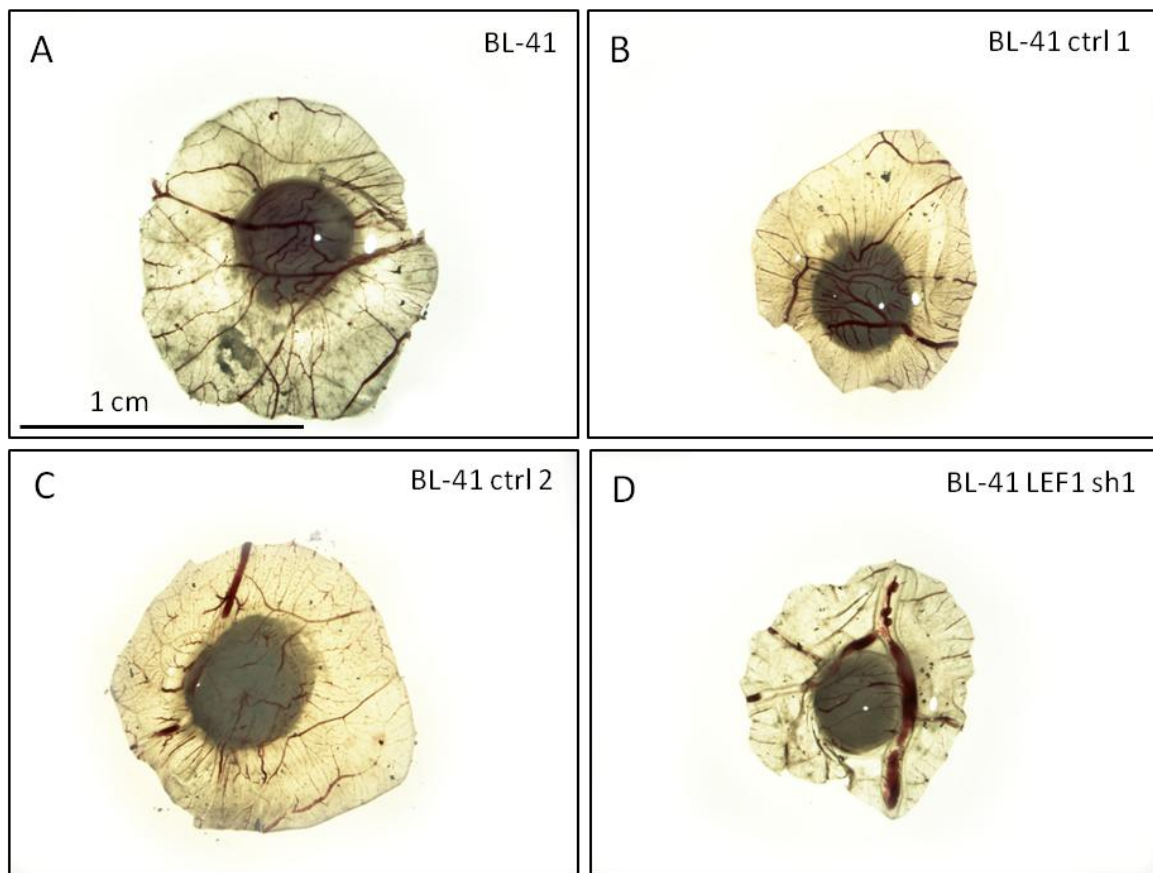
In **Abbildung 3-13** sind die einzelnen Tumorgößen graphisch aufgetragen. Zwischen den BL-41-Subzelllinien lassen sich *in ovo* keine signifikanten Unterschiede im Tumorwachstum feststellen.



**Abbildung 3-13: Größenvergleich der BL-41-CAM-Tumoren.** In Grafik A sind die Größen der Tumoren in Form ihrer Fläche der einzelnen Zelllinien mit Mittelwert dargestellt. In Grafik B sind die

aberrant LEF1-exprimierenden Zellen und die KD-Zelllinien zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst. Es ergeben sich für beide Grafiken keine signifikanten Größenunterschiede. A: *one-way* ANOVA;  $p < 0,05$ . B: T-Test;  $p < 0,05$ .  $3 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

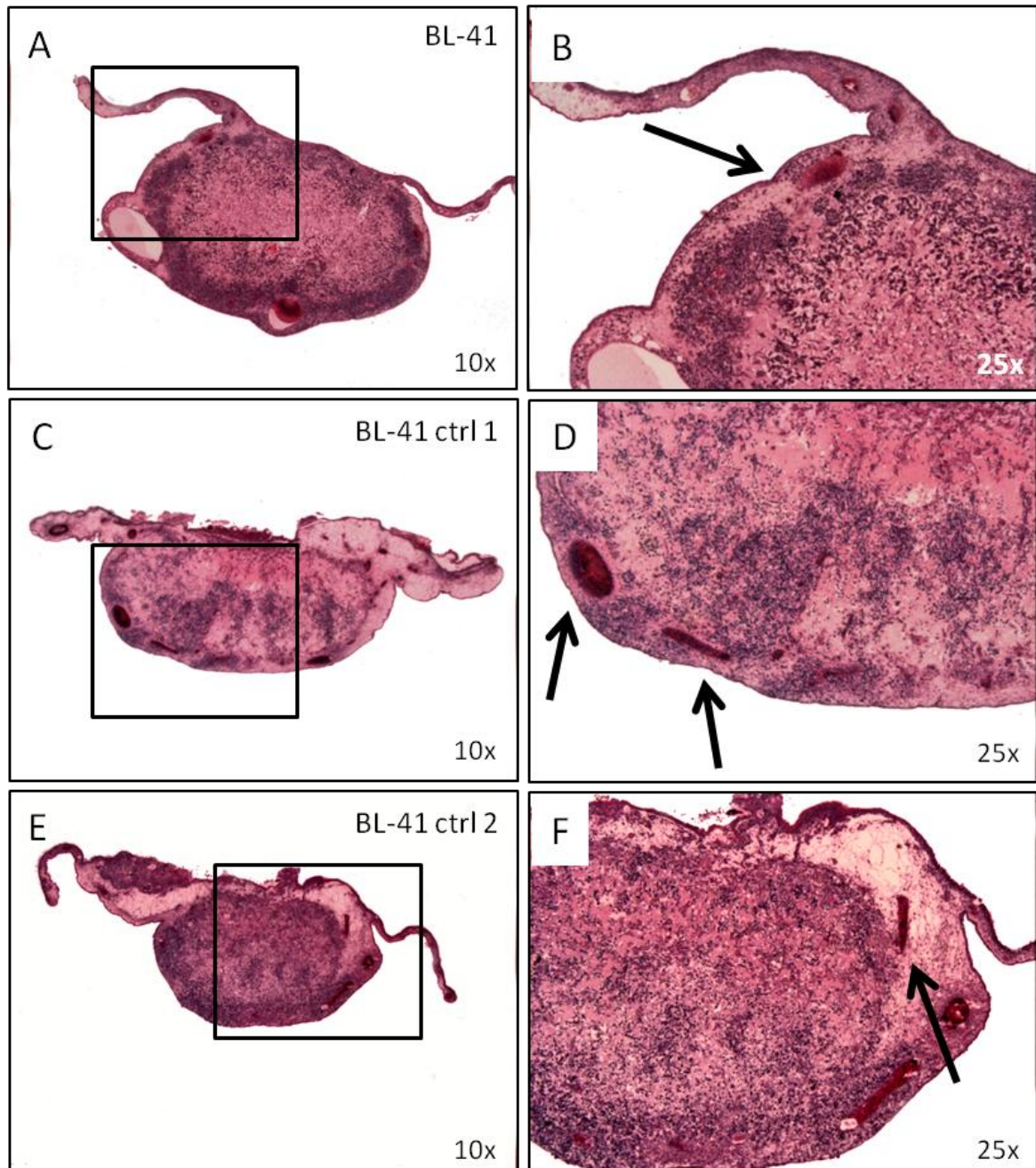
Trotz einer aufgetragenen Zellzahl von  $3 \times 10^6$  zeigten die 61 geernteten Tumoren kaum sichtbare hämorrhagische Nekrosen (insgesamt 5 von 61 Präparaten) und machten somit in diesem Aspekt auch keine LEF1-bezogene Auswertung möglich. Eine Übersicht der nativen Tumoren gibt **Abbildung 3-14**.



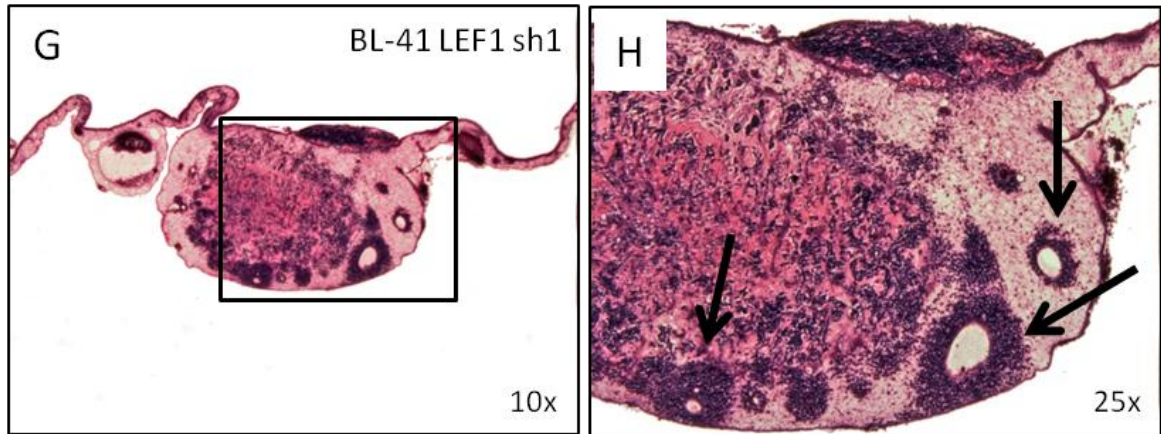
**Abbildung 3-14: Repräsentative Auswahl der nativen BL-41-CAM-Tumoren.** A-C zeigen die Zelllinien mit aberranter LEF1-Expression, D die LEF1-KD-Zelllinie BL-41 LEF1 sh1. Die Tumoren aller BL-41 Zelllinien verfügen nur in Ausnahmefällen über Einblutungen, die daher in diesen Fotos auch nicht zu sehen sind.  $3 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Auf mikroskopischer Ebene fanden sich jedoch systematische morphologische Besonderheiten: Im HE-Schnitt breiten sich die LEF1-exprimierenden Kontrollzellen und der BL-41-Wildtyp innerhalb des Tumors aus und zeigen keine besondere Affinität zu den Gefäßen (**Abbildung 3-15 A-F**). In **Abbildung 3-15 G** und **H** wird deutlich, dass sich die KD-Zellen im Gegensatz dazu meist am Tumorrand kon-

zentrieren und dort ebenso wie die BL-2-KD-Tumoren eine Inanspruchnahme präexistenter Blutgefäße zeigen.

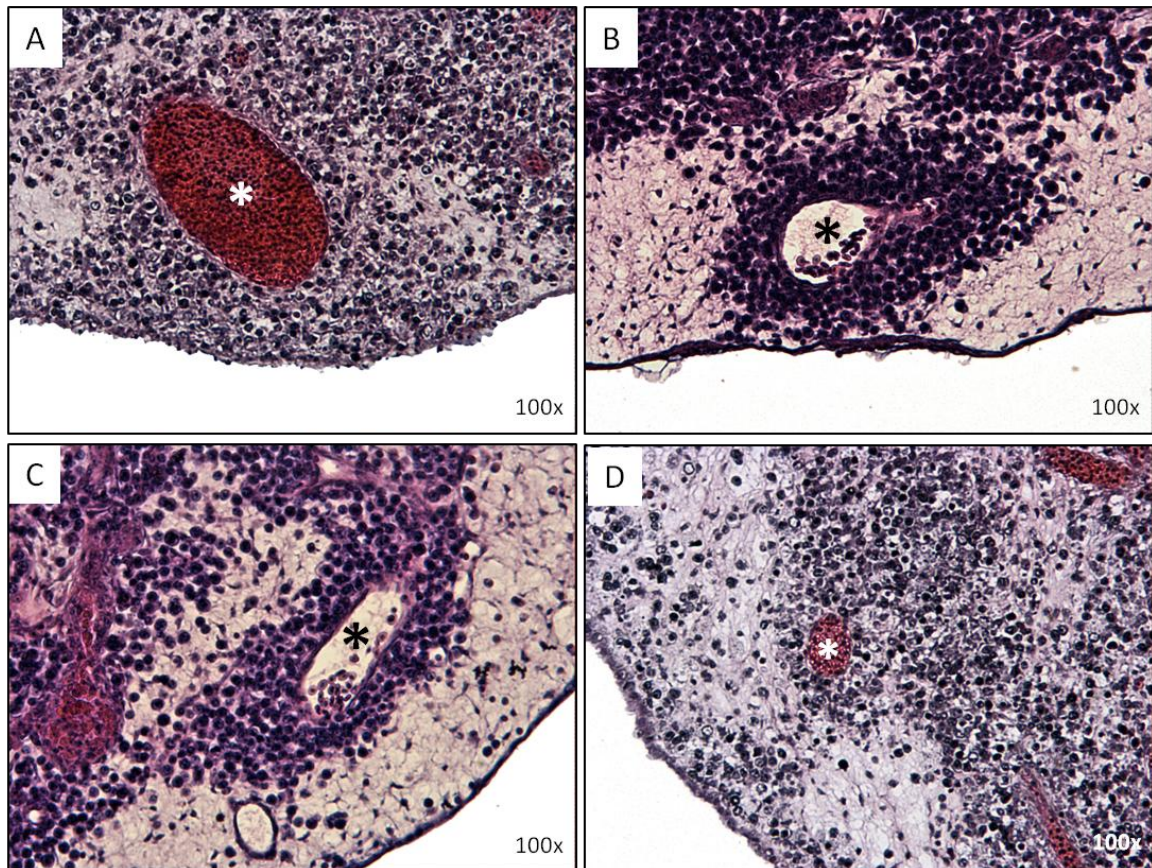






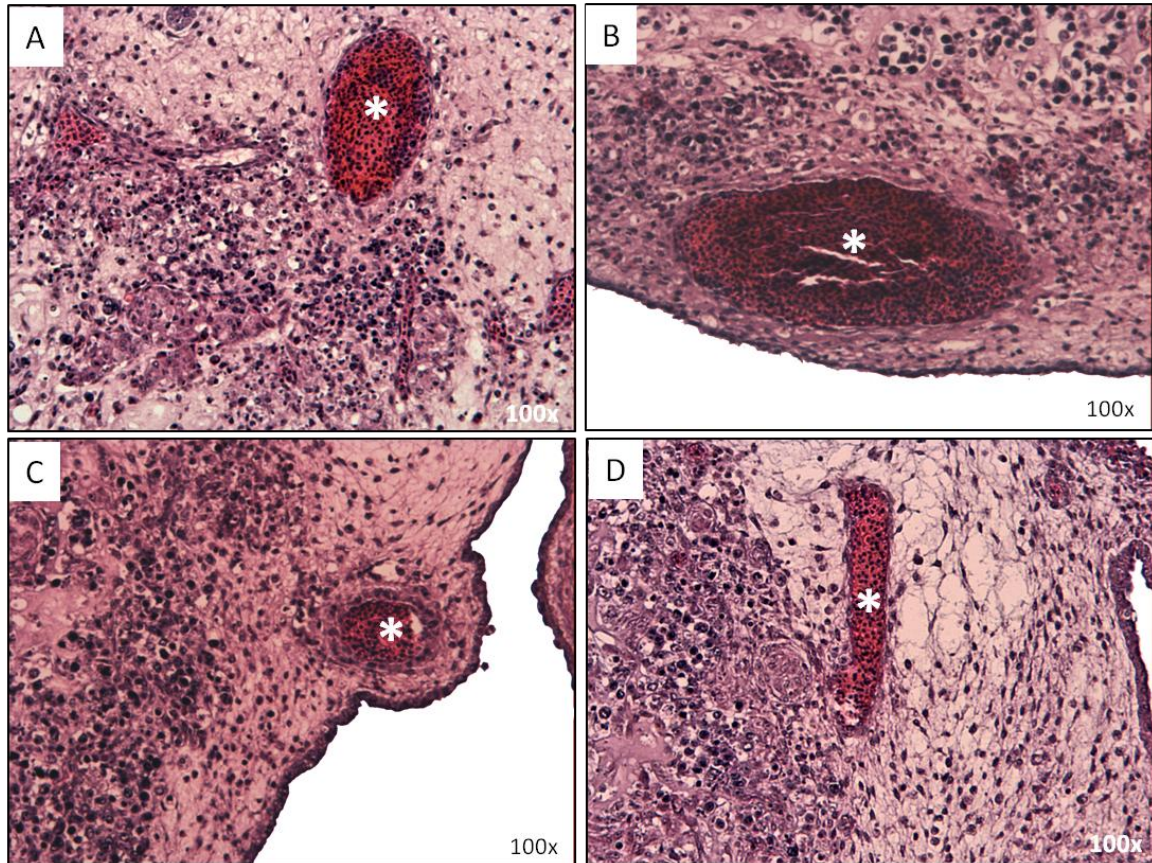
**Abbildung 3-15: Repräsentative Auswahl von Tumorschnitten der vier BL-41-Subzelllinien.** A und B zeigt einen Tumor der parenteralen BL-41, C und D die Kontrolle BL-41 ctrl 1, E und F BL-41 ctrl 2. In den Bildern G und H ist dazu im Vergleich ein Lymphom der KD-Zelllinie BL-41 LEF1 sh1 abgebildet. Rechts ist jeweils ein Ausschnitt aus der linken Übersichtsaufnahme dargestellt. Blutgefäße (Pfeile) werden bei aberranter LEF1-Expression nicht in besonderem Maße von Tumorzellen umrandet (B, D, F). LEF1-Defizienz führt dagegen zu *vessel co-option* und geringerer Tumorzell-dichte: LEF1-defiziente Tumoren zeigen eine besondere Affinität zu Blutgefäßen und okkupieren diese in außergewöhnlichem Maße (Pfeile in H).  $3 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke 3-4  $\mu$ m.

Die *vessel co-option* bei KD-Tumoren ist in der folgenden **Abbildung 3-16** genauer dargestellt. Die KD-Zellen migrieren auch aus dem Zellverband heraus zu weiter entfernten Gefäßen und umschließen diese vollständig (**Abbildung 3-16 B und C**). Dieses Phänomen konnte bei LEF1-exprimierenden CAM-Tumoren nicht beobachtet werden: **Abbildung 3-17** stellt Gefäße im Tumorrandbereich LEF1-positiver Neoplasien dar. Bei diesen werden die randständigen Gefäße nicht okkupiert.



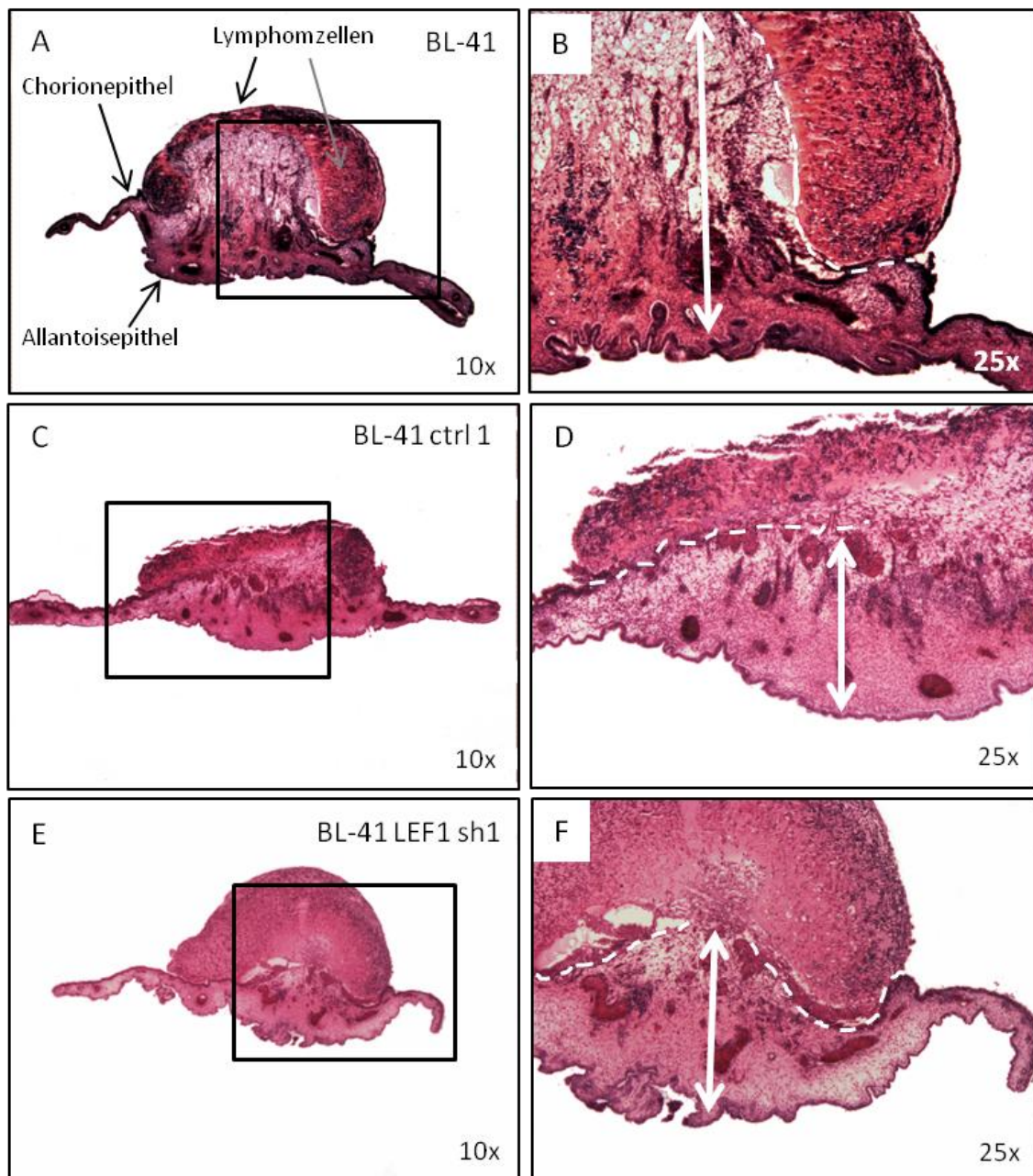
**Abbildung 3-16: Vessel co-option bei *In-ovo*-Lymphomen der BL-41 nach LEF1-KD.** In A-D sind exemplarisch Blutgefäße (Sterne) von Tumoren der Zelllinie BL-41 LEF1 sh1 abgebildet. Die Lymphomzellen vermehren sich in außergewöhnlichem Maße um die nährstoffspendenden Gefäße des Hühnerembryos und migrieren auch aus dem Zellverband zu entfernteren Gefäßen (B und C).  $3 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke 3-4  $\mu$ m.





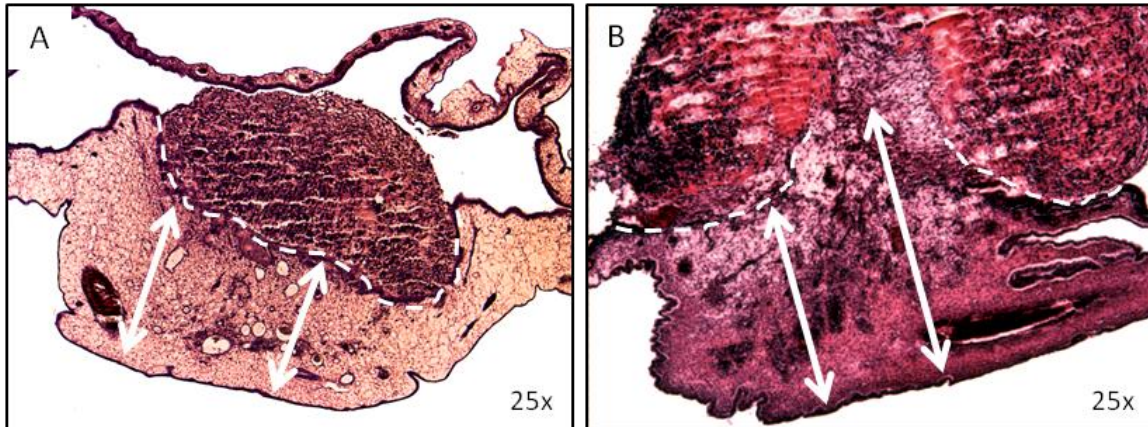
**Abbildung 3-17: LEF1-exprimierende BL-41-Tumoren zeigen keine besondere Affinität zu Blutgefäßen.** A: BL-41 ctrl 1, B-D: BL-41 ctrl 2. Stern: Blutgefäß.  $3 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke 3-4  $\mu$ m.

Außerdem konnte eine weitere histologische Besonderheit der BL-41-Tumoren festgestellt werden. Diese zeigten nicht systematisch, aber morphologisch auffällig in einigen histologisch aufgearbeiteten Präparaten eine außergewöhnliche, teilweise wulstartig verdickte CAM. In diesen Neoplasien lässt sich nur eine geringe CAM-Tumor-Interaktion beobachten, häufig liegt das Zell-Matrigel-Gemisch nur auf der CAM auf, ohne in sie einzudringen. In **Abbildung 3-18** wird deutlich, dass dieses Phänomen LEF1-unabhängig beobachtbar war. Teilweise wölbt sich die CAM von unten in den aufgetragenen Zelltropfen hinein (**Abbildung 3-18** A und B). Die LEF1-KD-Tumoren mit dieser Konfiguration zeigten deutlich seltener eine *vessel co-option*. Dieses Erscheinungsbild bietet sich auch bei einer applizierten Zellzahl von  $2 \times 10^6$ , welches in **Abbildung 3-19** an zwei parenteralen BL-41-Tumoren verdeutlicht wird.



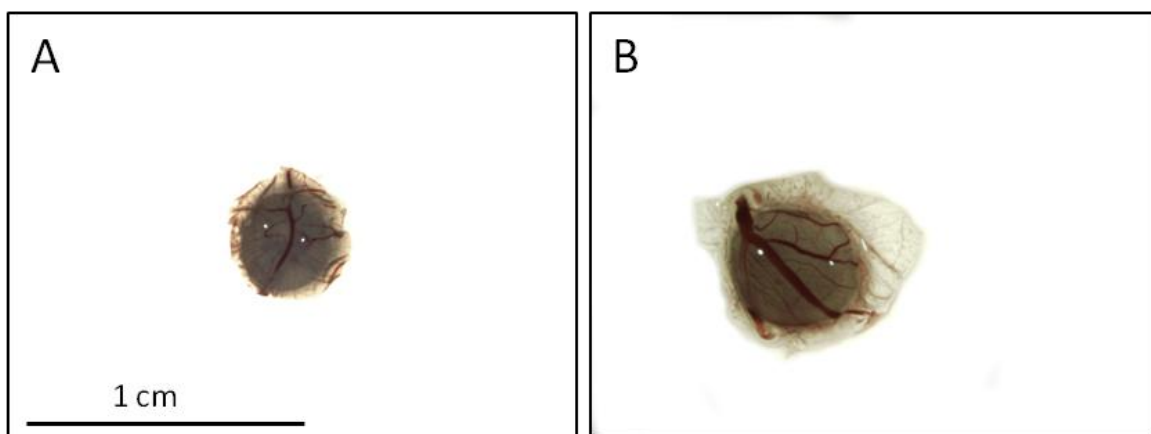
**Abbildung 3-18: BL-41-Tumoren weisen als morphologische Besonderheit regelmäßig eine verdickte CAM auf.** Nicht systematisch, jedoch morphologisch außergewöhnlich zeigen sich unabhängig vom LEF1-Status regelmäßig Neoplasien mit deutlich verdickter CAM (weißer Doppelpfeil). A-D stellen hier exemplarisch aberrant LEF1-exprimierende Tumoren und E-F einen Tumor mit reduzierter LEF1-Expression dar. In diesen Tumoren findet nur eine geringe Interaktion zwischen Tumorzellen und CAM-Gewebe statt, sodass sich hier nur selten kooptierte Gefäße finden. In A ist beispielhaft das Chorion- und Allantoisepithel beschriftet sowie das Lymphomzell-Matrigel-Gemisch bezeichnet, das in diesen Tumoren kaum in die CAM eindringt. Die Grenze zwischen Tumorzellen und CAM ist in den rechten Vergrößerungen B, D und F der linken Übersichtsaufnahme markiert (weiß gestrichelte Linie).  $3 \times 10^6$  Zellen in  $20 \mu\text{l}$  Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke  $3\text{-}4 \mu\text{m}$ .





**Abbildung 3-19: Eine verdickte CAM zeigt sich bei BL-41-Tumoren unabhängig von der applizierten Zellzahl.** Abgebildet sind zwei exemplarische Tumoren der parenteralen Zelllinie BL-41. Auch nach Beimpfen mit  $2 \times 10^6$  Zellen bildet sich regelmäßig eine auffällig verdickte CAM. Die Grenze zwischen CAM und Tumorzell-Matrigel-Gemisch ist durch die weiß gestrichelte Linie angedeutet. Die Doppelpfeile stellen die Dicke der CAM dar. In B wölbt sich die CAM mittig in den Lymphomzelltropfen.  $2 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke 3-4  $\mu$ m.

In **Abbildung 3-20** ist links ein Foto des in **Abbildung 3-18** A und B dargestellten parenteralen BL-41-Tumors mit auffälliger CAM abgebildet, daneben der BL-41-Tumor aus **Abbildung 3-15** A und B. Hier wird deutlich, dass diese besondere CAM-Konfiguration in der Hellfeldaufnahme nicht zu erkennen ist. Die beiden Tumoren zeigen ein sehr ähnliches Erscheinungsbild.



**Abbildung 3-20: Vergleich zweier Hellfeldaufnahmen der BL-41-Tumoren.** Es handelt sich um zwei parenterale BL-41-Neoplasien. A zeigt den Tumor mit auffälliger CAM, aus dem die histologischen Schnitte in **Abbildung 3-18** A und B entstanden sind. In B ist der Tumor aus **Abbildung 3-15** A und B abgebildet, der eine reguläre CAM zeigt. In den Hellfeldaufnahmen unterscheiden

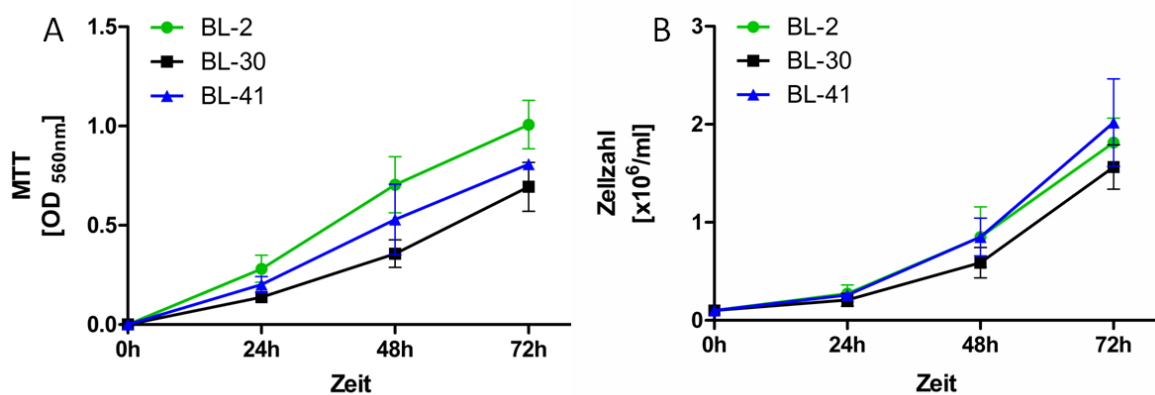
sich Tumoren mit verdickter CAM nicht wesentlich von den restlichen BL-41-Tumoren.  $3 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Bis hierhin konnte festgestellt werden, dass die einzelnen Burkitt-Lymphom-Zelllinien unterschiedlich stark auf den LEF1-KD reagieren. Bei LEF1-Defizienz konnte in BL-2- und BL-41-CAM-Tumoren die sog. *vessel co-option* beobachtet werden. BL-2 LEF1-KD-Tumoren zeigten zudem signifikant mehr hämorrhagische Nekrosen (Wilming 2017). Im BL-30-Modell lässt sich dagegen nach LEF1-KD keine *vessel co-option* feststellen und auch die Größenanalyse zeigt hier ein von den Zelllinien BL-2 und BL-41 abweichendes Ergebnis.

### 3.2 Vergleichende Analysen des Verhaltens der Burkitt-Lymphom-Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 im CAM-Xenograft-Modell

Die Gruppe der für die CAM-Studien verwendeten Burkitt-Lymphom-Zelllinien zeigte sich in den *In-ovo*-LEF1-Experimenten deutlich heterogener, als dies das *In-vitro*-Verhalten vermuten ließ. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Analysen die parenteralen Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 miteinander verglichen und dann das Wachstumsverhalten auf der CAM näher betrachtet.

Zunächst wurde die Proliferation der Zelllinien *in vitro* gemessen. **Abbildung 3-21** verdeutlicht, dass sich die Proliferationsraten der BL-2, BL-30 und BL-41 unter Laborbedingungen nicht signifikant voneinander unterscheiden.



**Abbildung 3-21: Die Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 unterschieden sich *in vitro* nicht signifikant in ihrer Proliferation.** Sowohl im MTT-Assay (A) als auch in der Bestimmung der Zellzahl

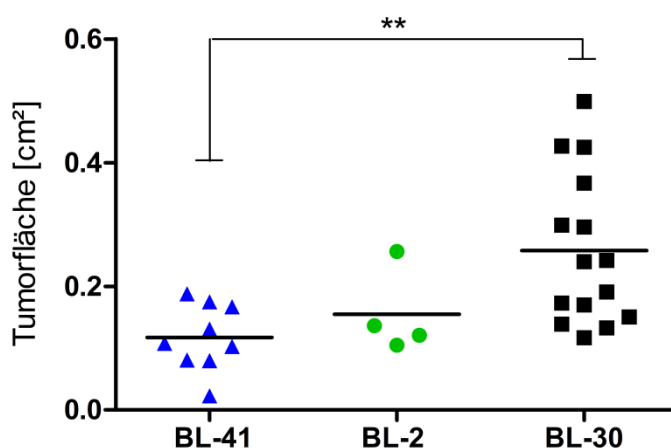
(B) finden sich keine signifikanten Wachstumsdifferenzen. Begonnen wurde in beiden Fällen mit einer Zellkonzentration von  $10^5$  /ml. MTT: n=3; Zellzahlbestimmung: n=5. +/- SD. One-way ANOVA: nicht signifikant bei  $p < 0,05$ .

Im Gegensatz dazu zeigte sich auf der CAM ein völlig anderes Bild. **Tabelle 3-4** gibt einen Überblick über die für diese Auswertung herangezogenen CAM-Assays und die Durchschnittsgröße der Tumoren. In diesem Kapitel wurden nur Tumoren von Eiern mit einer Anzahl von  $2 \times 10^6$  beimpften Zellen ausgewertet.

**Tabelle 3-4: Zusammenfassung der geernteten Tumoren.** Gezeigt ist eine Übersicht über die Anzahl der geernteten BL-41-, BL-2- und BL-30-Präparate in bis zu vier Replikaten und deren durchschnittliche Größe. In Klammern ist die initial beimpfte Anzahl der Eier angegeben.  $2 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Zelllinie	Zahl der geernteten Tumoren an den initial beimpften Eiern				Mittelwert der Tumorflächen [cm <sup>2</sup> ]
	1. CAM-Assay	2. CAM-Assay	3. CAM-Assay	4. CAM-Assay	
BL-41	-	1 (2)	3 (3)	5 (5)	0,117
BL-2	-	-	-	4 (5)	0,155
BL-30	5 (8)	5 (7)	-	5 (5)	0,258

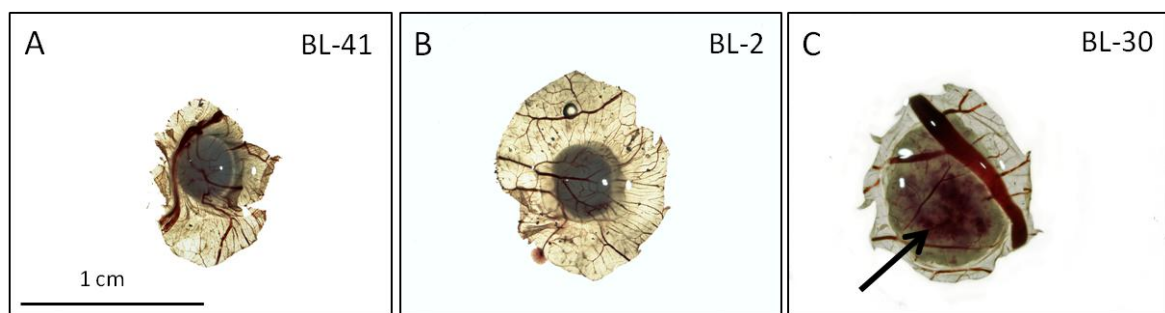
In **Abbildung 3-22** sind die Größen der einzelnen Tumoren mit ihrem Mittelwert dargestellt.



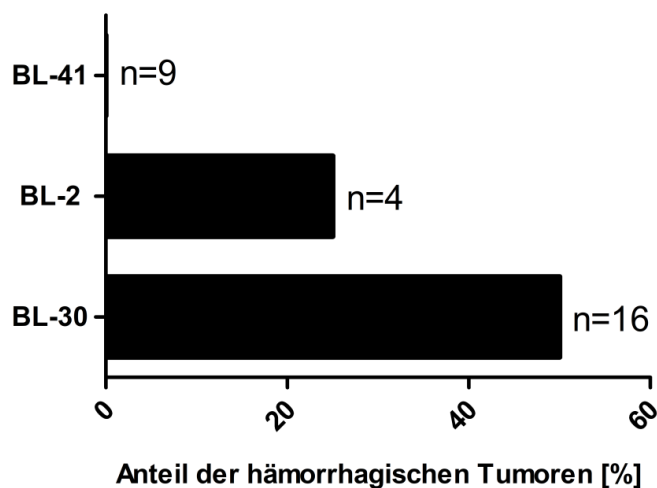
**Abbildung 3-22: Größenunterschiede der BL-41-, BL-2- und BL-30-CAM-Tumoren.** BL-41-Neoplasien sind durchschnittlich am kleinsten, BL-30-Tumoren am größten. One-way ANOVA, \*\* $p < 0,01$ ;  $2 \times 10^6$  Zellen in 20  $\mu$ l Matrigel, 4 d Inkubation.

Es wird deutlich, dass die BL-30 signifikant größere Tumoren auf der CAM bildet, als die Zelllinie BL-41. Der Mittelwert der Tumorfläche der BL-2-Neoplasien liegt zwischen den beiden anderen Zelllinien.

Darüber hinaus waren bei einigen Tumoren am noch nicht fixierten, frischen Präparat dunkle Einblutungen sichtbar (**Abbildung 3-23**). Bei der BL-30 fanden sich in 50 % der Fälle solche hämorrhagischen Bereiche, bei BL-2-Tumoren in 25 % und bei BL-41-Tumoren in keinem einzigen Präparat; die Unterschiede sind damit signifikant (**Abbildung 3-24**).



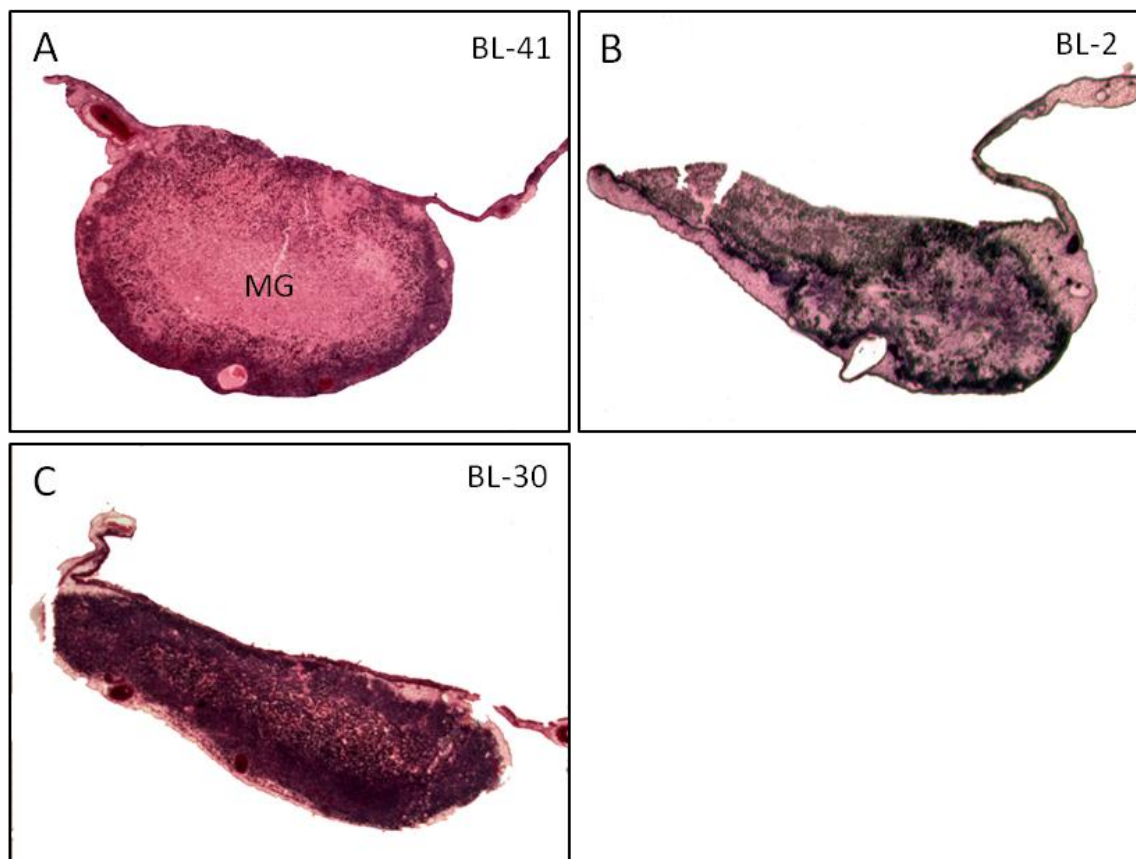
**Abbildung 3-23: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der extrahierten CAM-Tumor-Präparate.** BL-41 (A) und BL-2 (B) sind sichtbar kleiner und zeigen nur selten Einblutungen. In C zeigt der Pfeil dagegen auf Hämorrhagien eines BL-30-Lymphoms.  $2 \times 10^6$  Zellen in  $20 \mu\text{l}$  Matrigel, 4 d Inkubation.



**Abbildung 3-24: Anteil der hämorrhagischen Tumoren an der Tumorgesamtzahl (n).** Bei gleicher applizierter Zellzahl wiesen unter den Tumoren der BL-30 50 %, der BL-2 25 % und der BL-41 0 % der Präparate Einblutungen auf. Die Zahl der Einblutungen ist damit signifikant abhängig von der Zelllinie. Exakter Test nach Fisher bei  $p < 0,05$ .  $2 \times 10^6$  Zellen in  $20 \mu\text{l}$  Matrigel, 4 d Inkubation.



Tumorgröße und Hämorrhagien differieren demnach deutlich zwischen den Zelllinien. Analog zum Flächenunterschied verhielt es sich mit der im HE-Schnitt erkennbaren Tumorzelldichte bzw. dem noch sichtbaren Anteil an nicht verstoffwechseltem Matrigel. In **Abbildung 3-25** wird deutlich, dass im BL-30-Modell der Tumor gänzlich mit dicht gepackten Zellen ausgefüllt ist (C). Bei der Zelllinie BL-41 dagegen dominiert das noch sichtbare homogene eosinophile Matrigel in der mikroskopischen Aufnahme (A). Die Zelllinie BL-2 (B) liegt in Matrigelanteil und Zelldichte zwischen den beiden anderen Zelllinien (**Abbildung 3-25**).



**Abbildung 3-25: BL-41-, BL-2- und BL-30-CAM-Tumoren unterscheiden sich in ihrer mikroskopisch sichtbaren Zelldichte.** Im Inneren des repräsentativen BL-41-Tumors (A) ist hauptsächlich unverdautes Matrigel (MG) zu erkennen, wohingegen der BL-30-Tumor (C) komplett mit Zellen ausgefüllt ist. MG: Matrigel;  $2 \times 10^6$  Zellen in  $20 \mu\text{l}$  Matrigel, 4 d Inkubation, Bouin-fixiert, HE-gefärbt, Schnittdicke  $3\text{-}4 \mu\text{m}$ , 10-fache Vergrößerung.

Die Analysen zeigen, dass die Zelllinie BL-30 auf dem Ei das aggressivste Wachstum entwickelt. Woran könnte das liegen? In Kapitel 3.1.2 wurde bereits die wie-

derkehrend sichtbare CAM-Verdickung der BL-41-Tumoren erwähnt. Während nach dem Auftragen von BL-2- und BL-30-Zellen die CAM ihren gewöhnlichen dreischichtigen Aufbau mit einer innen liegenden dünnen Schicht aus lockerem mesenchymalen Bindegewebe aufweist, war diese Schicht bei den BL-41-Lymphomen häufig, aber nicht systematisch stark vergrößert (vgl. Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Bei diesen Tumoren infiltrierte der die Lymphomzellen enthaltende Matrigel-Tropfen die CAM meist nur geringfügig. Bei den anderen beiden Zelllinien hingegen ist der applizierte Zell-Matrigel-Tropfen in annähernd 100 % der ausgewerteten Proben vollständig in die CAM eingedrungen. Die CAM selbst zeigte sich dort als dünne dreischichtige Membran.

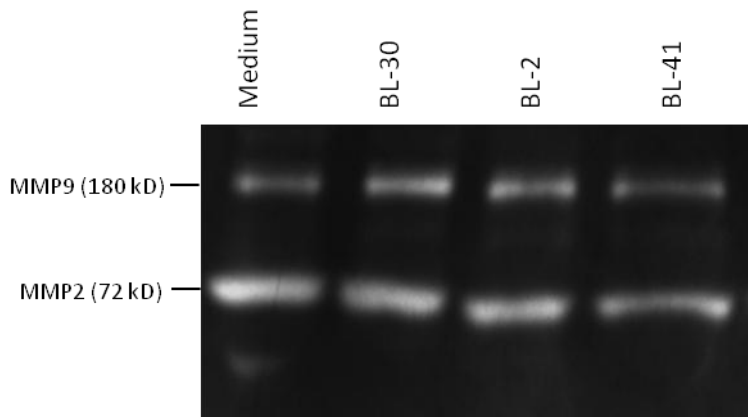
Zusammenfassend betrachtet scheinen sich die verwendeten BL-Zelllinien auf der CAM in Bezug auf Größe, Zelldichte, Einblutungen, Reaktion der CAM und das Vermögen, in sie einzudringen, sehr unterschiedlich zu verhalten. Aus BL-30-Zellen entstehen dabei die größten, dichtesten und am häufigsten über hämorrhagische Nekrosen verfügenden Tumoren. Die CAM-Neoplasien der BL-41 sind am kleinsten, die Zellen am lockersten verteilt und verfügen in der Regel über keine Einblutungen. Der Matrigel-Zelltropfen hat gelegentlich Schwierigkeiten, überhaupt in die CAM einzudringen. Die sonst dünne CAM zeichnet sich bei den BL-41-Neoplasien durch eine wiederkehrende wulstartige Verdickung aus. Die Tumoren der BL-2 befinden sich stets im Mittelbereich.

#### **3.2.1 MMP2 und MMP9 als mögliche Effektoren der Burkitt-Lymphom-Heterogenität im CAM-Modell**

Die bis hierhin festgestellte Heterogenität der getesteten Burkitt-Lymphom-Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 muss sich in der differentiellen Ausstattung mit bestimmten Proteinen widerspiegeln. Aufgrund der unterschiedlich starken Ausbreitung auf der CAM, der Diversität der Endothelpermeabilität und nicht zuletzt wegen des unterschiedlichen Potentials der Lymphomzellen, in die CAM einzudringen, lag hier die Vermutung nahe, dass für diese Prozesse Metalloproteasen eine Rolle spielen könnten.

Im Folgenden wurden Überstände der drei Zelllinien auf die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 hin mittels Zymographie untersucht. Es stellte sich dabei

heraus, dass die Aktivität der durch die BL-Zellen sezernierten MMPs nicht wesentlich über die Aktivität des durch das FCS in dem Medium ohnehin enthaltenen MMPs hinaus geht (**Abbildung 3-26**). Eine Kultivierung der BL-Zellen ist serumfrei leider nicht möglich (Zander und Bemark 2008).



**Abbildung 3-26: Repräsentatives Zymogramm konditionierter Medien von BL-30, BL-2 und BL-41.** Die konditionierten Medien zeigen keine sichtbar höhere Aktivität an MMP2 und MMP9 als die Eigenaktivität des Serum-enthaltenden Mediums.

Zumindest die beiden hier untersuchten MMPs sind demnach mithilfe der Zymographie nicht eindeutig als Ursache für die Unterschiede der BL-Zelllinien im CAM-Assay zu identifizieren.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die pathophysiologische Bedeutung des Transkriptionsfaktors LEF1 in verschiedenen Burkitt-Lymphom-Zelllinien näher zu charakterisieren, um LEF1 in Zukunft als möglichen diagnostischen und prognostischen Marker zu nutzen oder spezifische Therapien zu entwickeln, die auf dem Verständnis der molekularen Ursache des Burkitt-Lymphoms basieren.

In der medizinischen Dissertation von Pia Wilming (2017) konnte bereits ein Einfluss von LEF1 auf die Angiogenese im BL-2-CAM-Xenograft-Modell festgestellt werden. Darauf aufbauend sollte in dieser Arbeit geklärt werden, inwieweit sich dieser Effekt auch in anderen Burkitt-Lymphom-Zelllinien findet, oder ob es sich lediglich um eine BL-2-spezifische Auswirkung handelt.

In einem weiteren Schwerpunkt wurde die Vergleichbarkeit einiger BL-Zelllinien an sich beleuchtet. Hierbei sollte insbesondere deren Wachstumsverhalten auf der CAM charakterisiert und die Zelllinien auf eventuelle Unterschiede in der MMP-Aktivität hin untersucht werden.

Es konnten zwei wichtige Ergebnisse herausgestellt werden:

- I. Während sich die Zelllinien BL-2, BL-30 und BL-41 *in vitro* vergleichbar verhalten, unterscheiden sie sich *in ovo* in Bezug auf Tumorgroße, Hämorrhagien, Zelldichte und Tumormorphologie erheblich.
- II. In CAM-Tumoren der Zelllinie BL-41 und BL-2 kann nach LEF1-KD eine vermehrte Inanspruchnahme präexistenter Blutgefäße beobachtet werden, die als *vessel co-option* angesehen werden kann.

Im ersten Punkt wird deutlich, dass die Gruppe der Burkitt-Lymphome heterogener zu sein scheint, als bisher angenommen. Besonders die Zelllinie BL-30 fällt durch ein aggressives Wachstumsverhalten auf. Sie bildet im Vergleich zur BL-41 und BL-2 die größten, dichtesten und am häufigsten eingebluteten Tumoren. Die zahlreichen Hämorrhagien könnten als Hinweis auf eine gesteigerte Gefäßpermeabilität in Tumoren dieser Zelllinie gesehen werden. Im Gegensatz dazu zeigen sich in den signifikant kleineren Tumoren der Zelllinie BL-41 nur in Ausnahmefällen Ein-

blutungen. Hier haben die Lymphomzellen sogar regelmäßig Schwierigkeiten, überhaupt durch das Chorionepithel in die CAM einzudringen.

Einen Hinweis auf Ursachen der unterschiedlichen Tumorentwicklung auf dem Ei könnte die Beobachtung der speziellen CAM-Konfiguration bei BL-41-Tumoren bieten. Die mitunter sichtbar verdickte CAM könnte eine Reaktion des sich entwickelnden Immunsystems des Hühnerembryos auf die wirtsfremden Zellen darstellen. In BL-2-CAM-Tumoren sind bereits Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen als Zeichen einer aktiven Immunantwort des Hühnerembryos nachgewiesen worden (Klingenberg et al. 2014). Daraus ergibt sich als möglicher Erklärungsansatz, dass BL-41-Zellen im Gegensatz zu BL-2- und BL-30-Zellen eine stärkere Abwehrreaktion des Hühnerembryos hervorrufen könnten und sich daher kleinere Tumoren ohne Einblutungen, dafür aber mit reaktiv verdickter CAM entwickeln. In diesem Zusammenhang könnten immunhistochemische Färbungen näheren Aufschluss bringen. Eine alternative Hypothese ist, dass die BL-41-Zellen das Chorionepithel weniger effektiv durchdringen können als BL-30 und BL-2.

Neben der seit über 30 Jahren bekannten *Ig/MYC*-Translokation sind weitere genetische Besonderheiten vonnöten, damit ein hoch aggressives BL entsteht. Verschiedene Gensequenzierungen an BL-Proben zeigten bis zu 70 regelmäßig mutierte Gene, darunter *ID3*, *GNAI3*, *RET*, *PIK3RI* und *ARIDIA* (Love et al. 2012). Aber auch Mutationen im Transkriptionsfaktor TCF-3 sind möglich, der ein weiterer zentraler Schlüsselmediator in der Pathogenese des BL zu sein scheint (Schmitz et al. 2012). *ID3* stellt physiologischerweise einen negativen Regulator von TCF-3 dar, welcher wiederum über die Aktivierung von Zyklin D3 den Übergang der G1- zu S-Phase im Zellzyklus vermittelt und damit proliferationsfördernd wirkt (Schmitz et al. 2014). *Loss-of-function*-Mutationen im *ID3*-Gen finden sich in 34-68 % der BL, Mutationen, die zu einer Aktivitätssteigerung von TCF-3 und Zyklin D3 führen, in 11 % und 38 % der Fälle (Love et al. 2012; Richter et al. 2012; Schmitz et al. 2012). Diese Beispiele an möglichen Mutationen sollen zeigen, dass sich die Pathogenese des BL nicht auf einzelne Faktoren beschränken lässt, die in jedem BL zu finden sind. Vielmehr gibt es eine große Anzahl an genetischen Veränderungen, die mit einer unterschiedlichen Wahrscheinlichkeit in den einzelnen BL gefunden werden können. Dementsprechend können die Größenunterschiede zwi-

schen BL-30 und BL-41 *in ovo* auch in einem differierenden Mutationsstatus begründet sein, dessen Auswirkungen sich *in vitro* nicht bemerkbar machen. Der Mutationsstatus der Zelllinien müsste in Zukunft durch entsprechende *next-generation-sequencing*-Analysen aufgeklärt werden. Aktuell sind in öffentlichen Datenbanken keine Daten für alle Zelllinien verfügbar. Für die BL-2 sind entsprechende Analysen von Richter *et al.* 2012 publiziert worden.

Durch dieses nicht einheitliche Wachstumsverhalten auf der Hühner-CAM ist auch die Beurteilung der *In-ovo*-Versuche mit LEF1-KD-Zelllinien erschwert. In zwei von drei BL-Zelllinien zeigten sich aber nach LEF1-KD eindeutig reproduzierbare morphologische Besonderheiten und deckten sich damit mit den bisherigen Beobachtungen: In wiederholten CAM-Versuchen mit aberrant LEF1-exprimierenden und LEF1-KD-Subklonen der Zelllinie BL-2 sowie analog dazu mit der Zelllinie BL-41, ließen sich im HE-Schnitt der LEF1-KD-Tumoren eine geringere Tumorzelldichte und *vessel co-option* erkennen. Die *vessel co-option* legt die Vermutung nahe, dass LEF1-reduzierte BL-2- und BL-41-Zellen stärker auf die Versorgung mit Nährstoffen aus dem Blutkreislauf des Hühnerembryos angewiesen sind, da das *microenvironment* hierzu nicht ausreicht. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer geringeren Hypoxietoleranz der LEF1-defizienten Lymphomzellen. Dadurch könnte gleichzeitig die besonders im gefäßarmen Tumorrinneren auffallende geringere Zelldichte mit begünstigt werden. Auch ein unterschiedliches Vermögen, Neoangiogenese zu betreiben, stellt hier einen schlüssigen Interpretationsansatz dar: Weniger nährstoff- und sauerstofftransportierende Gefäße bei LEF1-Defizienz könnten zu geringerer Proliferation und Konzentration der Lymphomzellen um präexistente Blutgefäße führen. Diese These wird durch Untersuchungen mit der Endothelzelllinie HUVEC gestützt, die zeigten, dass die Endothelzellen durch den Anreiz der konditionierten Medien LEF1-exprimierender BL-2-Zelllinien stärker migrieren als mit konditionierten Medien der KD-Zelllinien (Wilming 2017).

Aberrant LEF1-exprimierende BL-2- (Wilming 2017) und BL-41-CAM-Tumoren unterscheiden sich in ihrer Größe in Form der Fläche nicht von den KD-Tumoren. Aus dieser Beobachtung könnte man schließen, dass es keinen Nachteil für die KD-Tumoren gibt. In der Zelllinie BL-30 entwickelten sich unter LEF1-KD sogar signifikant größere Tumoren. Einschränkend muss aber angemerkt werden, dass

dieser Unterschied insbesondere durch die im Vergleich zur parenteralen BL-30 kleineren Kontrollen bedingt ist. Zwischen parenteraler BL-30 und den KD-Tumoren ergab sich kein signifikanter Größenunterschied, weshalb hier keine abschließende Beurteilung möglich ist. Die *vessel co-option* und die zumindest in der Zelllinie BL-2 seltener auftretenden Einblutungen sprechen insgesamt aber eindeutig für einen Vorteil bei LEF1-Expression. Es ist aber auch denkbar, dass eventuelle Größenunterschiede durch die individuelle Form des jeweiligen Tumors maskiert werden: Die Größe der Tumoren wurde in Form ihrer einnehmenden Fläche von lichtmikroskopischen Aufsichtsaufnahmen berechnet. Genauer, aber aufwendiger wäre es, das Volumen zu ermitteln, um rundere Tumoren nicht fälschlicherweise als kleiner zu betrachten. Mit den untersuchten Parametern konnten letztendlich keine eindeutigen Größenunterschiede ermittelt werden.

Die geringere Zelldichte in Tumoren mit LEF1-KD, die in dieser Arbeit in den Zelllinien BL-2 und BL-41 beobachtet wurde, lässt dennoch die Vermutung zu, dass LEF1 an Prozessen der Zellteilung beteiligt ist. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kube konnten im *In-vitro*-<sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporations-Assay keine signifikanten Proliferationsunterschiede zwischen den einzelnen Subklonen der verschiedenen verwendeten Zelllinien festgestellt werden. Auch die Proliferationsanalysen, die in dieser Arbeit zu den parenteralen Zelllinien durchgeführt wurden, ergaben keine signifikanten Diskrepanzen. Um einen direkten Proliferationsvorteil *in ovo* durch die LEF1-Expression zu validieren, wären weitere Versuche sinnvoll, wie beispielsweise die Quantifizierung der in einem Tumorschnitt tatsächlich erhaltenen Zellzahl.

Ein positiver Einfluss von LEF1 auf die Zellproliferation ist bereits beim Nierenzellkarzinom bekannt: Zellen mit hoher LEF1-Expression zeigten hier signifikant höhere Proliferationsraten als solche mit einem niedrigen LEF1-Expressionslevel (Shang et al. 2014). Shang et al. (2014) fanden ferner, dass dies im Nierenzellkarzinom durch die Unterdrückung des G2/M-Zellzyklusarrestes geschieht. Auch Ergebnisse von Wang et al. (2013b) im Maus-Xenograft-Modell mit Kolonkarzinomzellen belegen eine Hemmung des Tumorwachstums bei LEF1-KD. Ein weiteres Beispiel ist die Überexpression von LEF1 im Prostatakarzinom, die über eine ver-

mehrte Androgenrezeptor-Expression ebenfalls zu einem gesteigerten Tumorzellwachstum und erhöhter Invasivität führt (Li et al. 2009).

Der Effekt des LEF1-KD im CAM-Modell war nicht konsistent in allen BL-Zelllinien nachweisbar. Die Subklone mit LEF1-KD der Zelllinie BL-30 zeigten weder eine klassische *vessel co-option*, noch waren Unterschiede in Hämorrhagien oder Zelldichte erkennbar. Die BL-30-Tumoren waren unabhängig vom LEF1-Status durch eine hohe Zelldichte und ausgeprägte Einblutungen gekennzeichnet. Auch nach Reduktion der aufgetragenen Zellzahl um 50 % änderte sich dieses Ergebnis nur geringfügig. Es besteht die Möglichkeit, dass durch den LEF1-KD bedingte morphologische Unterschiede trotz der Zellreduktion noch immer durch das ausgeprägte Wachstum maskiert werden. Die BL-30-Zellen könnten auch von vorneherein durch einen sich unterscheidenden Mutationsstatus ein weitaus aggressiveres Wachstumsmuster aufweisen, das hier weniger stark als bei den anderen beiden Zelllinien LEF1-abhängig ist. Um eventuelle doch maskierte Effekte aufzudecken, könnte in zukünftigen Experimenten die applizierte Zellzahl der BL-30-Subklone weiter reduziert werden.

Insgesamt ließ sich nur in zwei von drei getesteten BL-Zelllinien im CAM-Modell ein Einfluss des LEF1-KD auf Tumorzelldichte und eine von Blutgefäßen abhängige Organisation der Lymphomzellen nachweisen. Um diesen Einfluss eindeutig zu verifizieren, sollte in zukünftigen Studien die Testung weiterer BL-Zelllinien mit LEF1-KD erfolgen.

Das unterschiedliche Vermögen, das Matrigel abzubauen, in die CAM einzudringen und zu Einblutungen zu führen, lässt die Hypothese zu, dass die Zellreihen LEF1-unabhängig über unterschiedliche Fähigkeiten verfügen, Proteine der extrazellulären Matrix zu degradieren. Bereits in zahlreichen Arbeiten sind von den über 25 bekannten Metalloproteasen MMP2 und MMP9 als entscheidende Mediatoren verschiedenster Aspekte des Tumorzellwachstums und der Metastasierung beschrieben worden (Chambers und Matrisian 1997; Egeblad und Werb 2002; Polette et al. 2004; Patel et al. 2009). Speziell im BL ist eine Überexpression von MMP9 beispielsweise durch das EBV *latent membrane protein-1* (LMP-1) über den NFκB Signalweg induzierbar (Yoshizaki et al. 1998). Auch Becker et al. (2012) publizier-



ten eine durch EBV induzierbare Tumor-Stroma-Interaktion zwischen BL und CAM, die schließlich zur Progression des BL beiträgt. Leider war es durch die hohe Eigenaktivität des Serums nicht möglich, die MMPs mittels Zymographie nachzuweisen. Aufgrund der hohen Proliferationsrate der BL-Zellen ist es nicht möglich, serumfreie konditionierte Medien zu gewinnen (Zander und Bemark 2008). Auch innerhalb der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kube wurden serumfreie Versuchsansätze mit BL-Zellen getestet, jedoch war die Anzahl der toten Zellen zu hoch. Zukünftig könnte man die Anregungen aus der Arbeit von *Yoshizaki et al.* (1998) berücksichtigen, in der mögliche Alternativen beschrieben sind.

Über 12 weitere MMPs sind in Tumorentwicklung und -progression beschrieben (Köhrmann et al. 2009). Daher wäre es auch möglich, dass andere MMPs oder deren Inhibitoren an der Heterogenität der CAM-Lymphome beteiligt sind.

## 5. Zusammenfassung

Beim Burkitt-Lymphom (BL) handelt es sich um ein hochmalignes, aggressives Non-Hodgkin-Lymphom. Als Kennzeichen dieses Lymphoms gilt die charakteristische *MYC*-Translokation, die zusammen mit weiteren Mutationen zur Entwicklung eines BL führen kann. Viele Faktoren der BL-Pathogenese sind allerdings bis heute unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss eines *knockdowns* des aberrant im BL exprimierten Transkriptionsfaktors LEF1 *in ovo* untersucht werden. Dafür wurden viral transduzierte BL-Zellen mit LEF1-KD und entsprechende Kontrollen auf die Chorion-Allantois-Membran des Hühnerembryos appliziert und die daraus hervorgegangenen Tumoren auf morphologische Unterschiede hin analysiert. Parallel wurde das Wachstumsverhalten der parenteralen unveränderten Zelllinien charakterisiert und miteinander verglichen.

In den CAM-Tumoren konnte dabei in zwei von drei BL-Zelllinien nach LEF1-KD eine *vessel co-option* nachgewiesen werden, die sich in den aberrant LEF1-exprimierenden Subklonen nicht findet. Um die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten, okkupieren die KD-Zellen präexistente Blutgefäße. Die spezielle Orientierung nach Gefäßen kann aber auch in einer geringeren Hypoxietoleranz der KD-Zellen begründet sein. Dementsprechend könnten LEF1-Inhibitoren in der zukünftigen Behandlung des BL die Wirksamkeit der bisherigen Polychemotherapie weiter verbessern.

Erschwert wird die einheitliche Bewertung der Daten für BL durch eine von den *In-vitro*-Ergebnissen klar differierende Entwicklung der Zelllinien auf der Chorion-Allantois-Membran. Während sich *in vitro* keine Proliferationsabweichungen erkennen ließen, unterscheiden sie sich *in ovo* in Bezug auf Tumorgröße, Hämorrhagien, Zelldichte und Tumormorphologie erheblich. Aktuelle Studien stützen hierbei die Vermutung, dass BL z. B. durch verschiedene Mutationsstatus deutlich heterogener sind als bisher angenommen. Gerade in therapierefraktären Situationen sollte daher die individualisierte Therapie des BL an Bedeutung gewinnen.

## 6. Referenzen

- Ackermann H (Hrsg.): Innere Medizin. AllEx - Alles fürs Examen: Das Kompendium für die 2. ÄP. 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 2014
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molekularbiologie der Zelle. 5. Auflage; John Wiley & Sons, Weinheim 2011
- Ammon J, Karstens J-H, Rathert P: Urologische Onkologie: Radiologische Diagnostik und Strahlentherapie. 2. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013
- Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006): Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 25, 7492–7504
- Armelin HA, Armelin MCS, Kelly K, Stewart T, Leder P, Cochran BH, Stiles CD (1984): Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* 310, 655–660
- Barker N, Morin PJ, Clevers H (2000): The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv Cancer Res* 77, 1–24
- Baumgärtel F, Al-Abtah J (Hrsg.): I care-Pflege. (I care Anatomie, Physiologie, Krankheitslehre, Pflege ; [Bd. 3]); Thieme, Stuttgart 2015
- Becker J, Covelo-Fernandez A, Bonin F von, Kube D, Wilting J (2012): Specific tumor-stroma interactions of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells in the chick chorioallantoic membrane. *Vasc Cell* 4, 3
- Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996): Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638–642
- Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R: Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie. 5. Auflage; Hüthig Jehle Rehm, Heidelberg 2013
- Bertrand P, Bastard C, Maingonnat C, Jardin F, Maisonneuve C, Courel M-N, Rummy P, Picquenot J-M, Tilly H (2007): Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia* 21, 515–523
- Bertrand S, Berger R, Philip T, Bernheim A, Bryon P-A, Bertoglio J, Doré J-F, Brunat-Mentigny M, Lenoir GM (1981): Variant translocation in a non endemic case of Burkitt's lymphoma: t (8;22) in an Epstein-Barr virus negative tumour and in a derived cell line. *Eur J Cancer* 1965 17, 577–581
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254

- Brunner E, Peter O, Schweizer L, Basler K (1997): Pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* 385, 829–833
- Buddecke E: *Molekulare Medizin: eine systematische Einführung*. Hüthig Jehle Rehm, Landsberg 2002
- Burkitt D (1958): A sarcoma involving the jaws in african children. *Br J Surg* 46, 218–223
- Calender A, Billaud M, Aubry JP, Banchereau J, Vuillaume M, Lenoir GM (1987): Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8060–8064
- Chambers AF, Matrisian LM (1997): Changing Views of the Role of Matrix Metalloproteinases in Metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89, 1260–1270
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982): Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824–7827
- Damodharan U, Ganesan R, Radhakrishnan UC (2011): Expression of MMP2 and MMP9 (Gelatinases A and B) in Human Colon Cancer Cells. *Appl Biochem Biotechnol* 165, 1245–1252
- Dang CV (2012): MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149, 22–35
- Diviné M, Casassus P, Koscielny S, Bosq J, Sebban C, Maignan CL, Stamattoulas A, Dupriez B, Raphaël M, Pico J-L, Ribrag V (2005): Burkitt lymphoma in adults: a prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. *Ann Oncol* 16, 1928–1935
- Donnem T, Hu J, Ferguson M, Adighibe O, Snell C, Harris AL, Gatter KC, Pezzella F (2013): Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Med* 2, 427–436
- Dürkop H, Foss H-D, Stein H (2011): 2008-WHO-Klassifikation der malignen Lymphome im Jahr 2011. *Onkologe* 17, 769–788
- Egeblad M, Werb Z (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161–174
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964): Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 283, 702–703
- Fingleton B (2006): Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci* 11, 479–491

- Folkman J (1971): Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med* 285, 1182–1186
- Folkman J (1990): What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82, 4–6
- He T-C, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Costa LT da, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998): Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512
- Holash J, Wiegand S, Yancopoulos G (1999): New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18(38), 5356–62
- Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W (2013): Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 25, 254–264
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R (1996): Nuclear localization of  $\beta$ -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3–10
- Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, Bernd H-W, Cogliatti SB, Dierlamm J, Feller AC, others (2006): A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 354, 2419–2430
- Jacob A, Prekeris R (2015): The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Front Cell Dev Biol* 3, 1–9
- Jacob A, Jing J, Lee J, Schedin P, Gilbert SM, Peden AA, Junutula JR, Prekeris R (2013): Rab40b regulates trafficking of MMP2 and MMP9 during invadopodia formation and invasion of breast cancer cells. *J Cell Sci* 126, 4647–4658
- Jaffe ES (2009): The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 523–531
- Jamieson C, Sharma M, Henderson BR (2014): Targeting the  $\beta$ -catenin nuclear transport pathway in cancer. *Semin Cancer Biol* 27, 20–29
- Kaiser U, Neubauer A: Maligne Lymphome; in: *Lymphknotenerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich: Onkologie und Differenzialdiagnostik*; hrsg. v. Werner JA; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013, 309–323
- Kappes JC, Wu X (2001): Safety Considerations in Vector Development. *Somat Cell Mol Genet* 26, 147–158
- Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P (1983): Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35, 603–610

- Kersten MJ, Van Gorp J, Pals ST, Boon F, Van Oers MH (1998): Expression of Epstein-Barr virus latent genes and adhesion molecules in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: correlation with histology and CD4-cell number. *Leuk Lymphoma* 30, 515–524
- Klingenberg M, Becker J, Eberth S, Kube D, Wilting J (2014): The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC Cancer* 14, 339
- Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J (2009): Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer* 9, 188
- Lennert K: Lymphknoten; in: *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie*, 30. Auflage; hrsg. v. Eder M, Gedigk P; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1977, 392–412
- Lennert K, Feller AC: *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*. 2. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1992
- Lennert K, Stein H, Kaiserling E (1975): Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer Suppl* 2, 29–43
- Lenoir G, Vuillaume M, Bonnardel C (1985): The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *Int Agency Res Cancer Sci Publ* 60, 309–318
- Li L, Chen B (2012): Therapeutics of Burkitt lymphoma in adults - review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 20, 1289–92
- Li Y, Wang L, Zhang M, Melamed J, Liu X, Reiter R, Wei J, Peng Y, Zou X, Pelliger A, et al. (2009): LEF1 in Androgen-Independent Prostate Cancer: Regulation of Androgen Receptor Expression, Prostate Cancer Growth, and Invasion. *Cancer Res* 69, 3332–3338
- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S (1980): Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284, 67–68
- Love C, Sun Z, Jima D, Li G, Zhang J, Miles R, Richards KL, Dunphy CH, Choi WWL, Srivastava G, et al. (2012): The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet* 44, 1321–1325
- Martin MD, Matrisian LM (2007): The other side of MMPs: Protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 26, 717–724
- Matzdorff A, Fritze: Hämatologie; in: *Duale Reihe Innere Medizin*, 3. überarbeitete Auflage; Thieme, Stuttgart 2012, 1143–1270

- Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, Harrison CJ, Israels T, Bailey S (2012): Burkitt's lymphoma. *Lancet* 379, 1234–1244
- Mosse C, Weck K: The Molekular Pathology of Burkitt Lymphoma; in: *Molecular Pathology of Hematolymphoid Diseases*; hrsg. v. Dunphy CH; Springer Science & Business Media, New York 2010, 277–286
- Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, Wang R, Green DR, Tessarollo L, Casellas R, et al. (2012): c-Myc Is a Universal Amplifier of Expressed Genes in Lymphocytes and Embryonic Stem Cells. *Cell* 151, 68–79
- Passalidou E, Stewart M, Trivella M, Steers G, Pillai G, Dogan A, Leigh I, Hatton C, Harris A, Gatter K, Pezzella F (2003): Vascular patterns in reactive lymphoid tissue and in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 88, 553–559
- Patel P, Shah F, Shukla S, Shah P, Shukla H (2009): Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. *Indian J Cancer* 46, 194
- Piper W: *Innere Medizin*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007
- Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P (2004): Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 179–186
- Prinz C: *Basiswissen Innere Medizin*. Springer Science & Business Media, Luxemburg 2012
- Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R (2000): Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13, 15–24
- Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, Kreuz M, Leich E, Burkhardt B, Rosolowski M, Ammerpohl O, Wagner R, Bernhart S, et al. (2012): Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 44, 1316–1320
- Riese J, Yu X, Munneryn A, Eresh S, Hsu S-C, Grosschedl R, Bienz M (1997): LEF-1, a Nuclear Factor Coordinating Signaling Inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell* 88, 777–787
- Robert Koch-Institut: *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe; Robert Koch-Institut, Berlin 2013
- Roskelley CD, Bissell MJ (1995): Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem Cell Biol* 73, 391–397
- Roskelley CD, Srebrow A, Bissell MJ (1995): A hierarchy of ECM-mediated signaling regulates tissue-specific gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 7, 736–747

- Scarpa E-S, Ninfali P (2015): Phytochemicals as Innovative Therapeutic Tools against Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* 16, 15727–15742
- Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, Wright G, Shaffer AL, Hodson DJ, Buras E, et al. (2012): Burkitt Lymphoma Pathogenesis and Therapeutic Targets from Structural and Functional Genomics. *Nature* 490, 116
- Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, Wright G, Staudt LM (2014): Oncogenic Mechanisms in Burkitt Lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a014282
- Sedlacek H-H: *Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen: Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten*. Walter de Gruyter, Berlin 2013
- Shang D, Bi R, Han T, Wang D, Tian Y, Liu Y (2014): Expression and Proliferation-Promoting Role of Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1 in Human Clear Cell Renal Carcinoma. *Cancer Invest* 32, 368–374
- Shelton DN, Fornalik H, Neff T, Park SY, Bender D, DeGeest K, Liu X, Xie W, Meyerholz DK, Engelhardt JF, Goodheart MJ (2012): The Role of LEF1 in Endometrial Gland Formation and Carcinogenesis. *PLoS ONE* 7, e40312
- Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E (1995): Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 768
- Stein H: WHO-Klassifikation hämatologischer Neoplasien mit Schwerpunkt indolente Lymphome; in: *Indolente Lymphome: Pathophysiologie, Prognosefaktoren und aktuelle Therapieempfehlungen*; hrsg. v. Buske C, Mahlmann S; Deutscher Ärzteverlag, Köln 2011, 1–22
- Steinke FC, Xue H-H (2014): From inception to output, Tcf1 and Lef1 safeguard development of T cells and innate immune cells. *Immunol Res* 59, 45–55
- Sternlicht MD, Werb Z (2001): How Matrix Metalloproteinases regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463–516
- Thermo Fisher Scientific Inc (2013): *Thermo Scientific GIPZ Lentiviral shRNA Technical Manual*.
- Tiemann M, Trümper L (2001): *Pathologie, Biologie und Klassifikation maligner Non-Hodgkin-Lymphome*. *Onkologe* 7, 940–959
- Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R (1991): LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev* 5, 880–894



- Vockerodt M, Tesch H, Kube D (2001): Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 activates CD25 expression in lymphoma cells involving the NF $\kappa$ B pathway. *Genes Immun* 2, 433–441
- Walther N, Ulrich A, Vockerodt M, von Bonin F, Klapper W, Meyer K, Eberth S, Pukrop T, Spang R, Trümper L, Kube D (2013): Aberrant lymphocyte enhancer-binding factor 1 expression is characteristic for sporadic Burkitt's lymphoma. *Am J Pathol* 182, 1092–1098
- Wang W-J, Yao Y, Jiang L-L, Hu T-H, Ma J-Q, Liao Z-J, Yao J-T, Li D-F, Wang S-H, Nan K-J (2013): Knockdown of lymphoid enhancer factor 1 inhibits colon cancer progression in vitro and in vivo. *PloS One* 8, e76596
- Waterman ML (2004): Lymphoid Enhancer Factor/T Cell Factor Expression in Colorectal Cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 41–52
- Wilming P: Untersuchungen zur Angiogenese des Burkitt-Lymphoms unter besonderer Berücksichtigung des Lymphocyte Enhancer-Binding Factor-1. Med. Diss. Göttingen 2017
- Woessner JF (1991): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5, 2145–2154
- Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M, Pagano JS (1998): The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein–Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3621–3626
- Zander L, Bemark M (2008): Identification of genes deregulated during serum-free medium adaptation of a Burkitt's lymphoma cell line. *Cell Prolif* 41, 136–155
- Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G (1976): Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with burkitt and non-burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 17, 47–56

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe diese Dissertation niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dieter Kube, für die Möglichkeit und das Vertrauen, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Insbesondere der konstruktive Austausch in zahlreichen Gesprächen und das mühevollen Korrekturlesen waren eine große Hilfe für mich.

Bei Prof. Dr. Trümper möchte ich mich dafür bedanken, dass ich in seiner Abteilung promovieren durfte.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Dr. Sonja Ebert, die mich täglich bei der Versuchsplanung und -durchführung unterstützte, stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte, mich immer ermutigte und mir insgesamt beim Verfassen dieser Arbeit eine große Hilfe war.

Frau Dr. Franziska Linke danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung und den humorvollen Umgang. Herzlichen Dank auch an Pia Wilming für die tolle Einarbeitung und auch spätere Hilfe in vielen Belangen. Frederike von Bonin möchte ich für die freundliche Mithilfe an den zahlreichen CAM-Assays danken, ebenso Susanne Hengst für Hilfestellungen im Labor.

Zuletzt geht mein Dank an die Mitarbeiter des Zentrums für Anatomie Göttingen, insbesondere an Prof. Dr. Wilting, Berti Manshausen und Sonja Schwach für die freundliche technische Unterstützung in der Durchführung meiner Experimente.