

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

Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 im p53-Signalweg

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

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

vorgelegt von

Gruber, Lena-Christin

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger

Tag der Disputation: 11.11.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Bezeichnungserläuterung.....	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Thymozyten / T-Zellen.....	1
1.2 SLy1	6
1.2.1 SLy1-Struktur und zelluläre Lokalisation.....	6
1.2.2 Funktionen von SLy1 bzw. Phänotyp bei SLy1-Defizienz.....	7
1.3 p53-Signalweg.....	10
1.4 SOCS1 im IL-7-Signalweg und im p53-Signalweg.....	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Bezugsquellennachweis	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Kits und Verbrauchsmaterialien	17
2.2 Tierexperimente.....	18
2.2.1 Allgemeines.....	18
2.2.2 Mausmodelle.....	18
2.3 Organentnahme.....	20
2.4 Zellisolation.....	21
2.4.1 Zellisolation Lymphozyten.....	21
2.4.2 Zellisolation DN-Thymozyten und periphere T-Zellen.....	21
2.4.3 Zellisolation DP-Thymozyten	22
2.5 Nachweis auf mRNA-Ebene.....	22
2.5.1 RNA-Isolation aus Thymozyten und T-Zellen	22
2.5.2 Reverse Transkription der RNA	23
2.5.3 Quantitative PCR	23
2.6 Nachweis auf Proteinebene.....	24
2.6.1 Western Blot.....	24

2.6.1.1	Proteinlyse.....	24
2.6.1.2	Proteinbestimmung.....	25
2.6.1.3	Gelelektrophorese	25
2.7	Durchflusszytometrie	26
2.7.1	Analyse von Lymphozyten-Populationen.....	26
2.8	Statistische Auswertung	29
3	ERGEBNISSE.....	30
3.1	Analyse des p53-Signalwegs in Mäusen mit SLy1-Knockout.....	30
3.1.1	Nachweis der mRNA und Proteine des p53-Signalwegs in Thymozyten von Mäusen mit SLy1-Knockout	31
3.1.2	Expression der mRNA des p53-Signalwegs und SOCS1 in der T-Zell-Entwicklung.....	40
3.1.3	Nachweis der mRNA und Proteine des p53-Signalwegs in DN-Thymozyten von Mäusen mit SLy1-Knockout	43
3.1.4	Nachweis der mRNA des p53-Signalwegs in DP-Thymozyten von Mäusen mit SLy1-Knockout.....	47
3.1.5	Nachweis der mRNA des p53-Signalwegs in peripheren T-Zellen aus der Milz von Mäusen mit SLy1-Knockout.....	49
3.2	Analyse der T-Zellentwicklung in Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz.....	52
3.2.1	Analyse der Zellzahl lymphatischer Organe in Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz	54
3.2.2	Analyse der Thymozytenpopulationen von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz	59
3.2.3	Analyse der DN-Thymozytenentwicklung im Thymus von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz.....	65
3.2.4	Analyse der Lymphozytenpopulationen in sekundären lymphatischen Organen von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz.....	67
3.2.5	Mögliche Veränderungen im Thymus einer Maus mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz	74

4	DISKUSSION.....	78
4.1	Analyse des p53-Signalwegs in Mäusen mit SLy1-Knockout.....	78
4.1.1	Nachweis des p53-Signalwegs in DN- und DP-Thymozyten sowie in T-Zellen von Mäusen mit SLy1-Knockout.....	83
4.2	Analyse der T-Zellentwicklung in Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz.....	86
4.2.1	Das Mausmodell mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz	86
4.2.2	Analyse der Zellzahl im Thymus von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz	87
4.2.3	Analyse der Thymozytenpopulationen im Thymus von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz.....	88
4.2.4	CD4SP- vs. CD8SP-Thymozyten von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz	91
4.2.5	Mögliche Veränderungen im Thymus einer Maus mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz.....	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
7	ANHANG.....	103
8	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	105
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	106
9.1	Posterpräsentationen	106
9.2	Publikation in Vorbereitung.....	106
10	DANKSAGUNG.....	107

Abbildungsverzeichnis

1: Thymozytenentwicklung im Thymus.	2
2: Domänenstruktur von SLy1.	6
3: p53-Aktivierung nach Replikationsstress oder DNA-Schäden.	11
4: Funktion von SOCS1 im Zytoplasma und im Nukleus.	15
5: SLy1-p53-Mausmodell.	19
6: Expressionsanalyse von p53 in Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	32
7: Expressionsanalyse von ATR in Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	33
8: Expressionsanalyse von ATM in Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	34
9: Expressionsanalyse von CHK1 in Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	35
10: Expressionsanalyse von CHK2 in Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen. ..	36
11: Expressionsanalyse von CDC25c in Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen	37
12: Expressionsanalyse von p21 in Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	37
13: Expressionsanalyse von SOCS1 in Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	38
14: Relative Expression von p53 in der T-Zell-Entwicklung.	40
15: Relative Expression der Moleküle des p53-Signalwegs in der T-Zell- Entwicklung.	41
16: Relative Expression von CDC25c, p21 und SOCS1 in der T-Zell-Entwicklung.	42
17: Expressionsanalyse von p53 in DN-Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	44
18: Expressionsanalyse von ATR und ATM in DN-Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} - Mäusen.	45
19: Expressionsanalyse von CHK1 und CHK2 in DN-Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} - Mäusen.	46
20: Expressionsanalyse von CDC25c, SOCS1 und p21 in DN-Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	47
21: Expressionsanalyse des p53-Signalwegs in DP-Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	48
22: Expressionsanalyse von CDC25c, SOCS1 und p21 in DP-Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	49
23: Expressionsanalyse des p53-Signalwegs in peripheren T-Zellen aus der Milz von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	50

24: Expressionsanalyse von CDC25c, SOCS1 und p21 in peripheren T-Zellen aus der Milz von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	51
25: Zellzahl im Thymus von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	55
26: Zellzahl in Milz, Lymphknoten und Knochenmark von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	57
27: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen aus dem Thymus anhand von FSC-A und SSC-A von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	59
28: Durchflusszytometrische Bestimmung von FSC-A und SSC-A der Thymozyten von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	60
29: Thymozytenpopulationen DN, DP und SP von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	62
30: Thymozytensubpopulationen CD4SP und CD8SP von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	64
31: Thymozytensubpopulationen DN1 – DN4 von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	66
32: T- und B-Zellpopulation in der Milz von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	69
33: T- und B-Zellpopulation in den Lymphknoten von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	70
34: T-Zellsubpopulation CD4 ⁺ und CD8 ⁺ in der Milz und in den Lymphknoten von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	72
35: Veränderter Thymus einer SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Maus und Kontrollmaus.	74
36: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen aus dem Thymus anhand von FSC-A und SSC-A von einer SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Maus und Kontrollmaus.	76
37: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellpopulationen DN, DP und SP aus dem Thymus einer SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Maus und Kontrollmaus.	76

38: Durchflusszytometrische Bestimmung von FSC-A und SSC-A der Zellen aus der Milz und den Lymphknoten einer SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Maus und Kontrollmaus.	77
39: Zusammenhang einer SLy1-Defizienz und der Aktivierung des p53-Signalweg.	81
40: p53-mRNA-Expression in Thymozyten bzw. T-Zellen von SLy1 ^{WT/KO} -Mäusen.	84
41: Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten bzw. Thymozytenpopulationen aus dem Thymus einer SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Maus und Kontrollmaus aus Grundpopulation A.	103
42: Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten bzw. Thymozytenpopulationen aus dem Thymus einer SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Maus und Kontrollmaus aus Grundpopulation B.	104

Tabellenverzeichnis

1: SLy1 ^{WT/KO} -Mausmodell.	19
2: SLy1-p53-defizientes Mausmodell und Kontrollen.	20
3: MACS-Beads.	21
4: Durchflusszytometrische Bestimmung der DN-Reinheit.	22
5: RNA-Primer.	24
6: Programm Light Cycler.	24
7: Antikörper für Western Blot.	26
8: Thymus-Färbung der Thymozyten-Entwicklungsstadien.	28
9: Thymus-Färbung der DN-Entwicklungsstadien.	28
10: Milz- und LN-Färbung.	29
11: Durchschnittliche Zellzahl im Thymus von SLy1 ^{WT} - und SLy1 ^{KO} -Mäusen.	31
12: Relative Erhöhung der mRNA-Expression des p53-Signalwegs und von SOCS1 in Thymozyten von SLy1 ^{KO} -Mäusen.	39
13: Relative Erhöhung der Proteinexpression der Kinasen des p53-Signalwegs in Thymozyten von SLy1 ^{KO} -Mäusen.	39
14: Durchschnittliche Zellzahl in Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark von SLy1 ^{WT/KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Mäusen und Kontrollmäusen.	58
15: Zellzahl der lymphatischen Organe einer SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺ -Maus und Kontrollmaus	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATM	Kinase <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	Kinase <i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BM	Knochenmark (<i>bone marrow</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>cell division cycle</i>
Cdk	Zyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CHK	Checkpoint Kinase
DN	doppelt-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DP	doppelt-positiv
FCS	fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie (<i>forward scatter scale</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
ISP	<i>intermediate single positive</i>
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LN	Lymphknoten (<i>lymph node</i>)
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
Mdm2	Ligase <i>mouse double minute 2 homolog</i>
NK	natürliche Killerzellen
ns	nicht signifikant
nWT	normierter WT
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur

SSC	Seitwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie (<i>side scatter scale</i>)
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
SP	einfach-positiv (<i>single positive</i>)
Tab.	Tabelle
TZR	T-Zell-Rezeptor

Bezeichnungserläuterung

Thymozyten	alle Thymozyten ohne Isolierung, Synonym: Gesamthymozyten
DN-Thymozyten	doppelt-negative Thymozyten, stadienspezifisch isolierte Thymozyten
DP-Thymozyten	doppelt-positive Thymozyten, stadienspezifisch isolierte Thymozyten
SP-Thymozyten	einfach-positive Thymozyten, stadienspezifisch isolierte Thymozyten
CD4SP-Thymozyten	CD4-positive SP-Subpopulation im Thymus
CD8SP-Thymozyten	CD8-positive SP-Subpopulation im Thymus
CD4 ⁺ -T-Zelle	T-Helfer-Zellen
CD8 ⁺ -T-Zelle	zytotoxische T-Zelle
T-Zellen	T-Zellen aus der Peripherie (Milz, LN)
SLy1 ^{KO}	SLy1-defizient
SLy1 ^{WT}	Kontrolle zu SLy1-defizient
SLy1 ^{WT/KO}	SLy1 ^{KO} bzw. SLy1 ^{WT}
p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺	konditional p53-defizient (homozygot)
p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁻	p53-exprimierend, mit LoxP flankiertem p53, ohne Cre-Rekombinase
p53 ^{WT} /Lck-Cre ⁺	p53-exprimierend, mit Cre-Rekombinase, p53 nicht mit LoxP flankiert

1 EINLEITUNG

1.1 Thymozyten / T-Zellen

Thymozyten sind Lymphozyten, welche im Thymus differenzieren und als T-Zellen in die Peripherie wandern. Sie spielen eine entscheidende Rolle im Immunsystem. Über Antigenpräsentierende Zellen (APZ) werden ihnen endogene und exogene Antigene präsentiert, wobei die T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) zwischen körpereigenen und körperfremd unterscheiden können. Thymozyten lassen sich u.a. über die Oberflächenmarker CD4 und CD8 (*cluster of differentiation*) in Untergruppen einteilen. CD4 und CD8 fungieren dabei als Co-Rezeptoren am TZR. Sie verstärken sowohl die extrazelluläre Bindung an die APZ, als auch die intrazelluläre Bindung an Effektorproteine, wie die Kinase Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*). Dabei erkennen die CD8-positiven T-Zellen (CD8⁺-T-Zelle) v.a. körpereigene entartete Zellen mittels MHC I-Komplex (*major histocompatibility complex I*) und CD4-positive T-Zellen (CD4⁺-T-Zelle) exogene Antigene, welche durch APZ mittels eines MHC II-Komplexes an CD4⁺-T-Zellen präsentiert werden. Diese T-Zellen haben einen TZR $\alpha\beta$ und sind MHC-restriktiert. Es gibt noch eine weitere, kleinere T-Zell-Population mit einem TZR $\gamma\delta$. Diese Population kommt v.a. im Gewebe vor, ist nicht MHC-restriktiert, weist andere Funktionen auf und wird hier nicht weiter behandelt (Hayday & Pennington, 2007).

Bevor die T-Zellen als Teil des Immunsystems im Körper zirkulieren bzw. sich in lymphatischen Organen wie der Milz und dem Lymphknoten (*lymph node*; LN) aufhalten, durchlaufen sie im Thymus eine Entwicklung (Abb. 1): Dabei gelangen die frühen Progenitorzellen aus der fetalen Leber oder dem Knochenmark (*bone marrow*; BM) über das Blut zum Thymus und differenzieren zu reifen $\alpha\beta$ -T-Zellen wie T-Helfer-Zellen (CD4⁺), zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) oder regulatorischen T-Zellen und zu einem kleineren Anteil zu $\gamma\delta$ -T-Zellen (Hayday & Pennington, 2007). Dabei wandern sie im Thymus vom Kortex Richtung Medulla (Kyewski & Klein, 2006). Die Progenitorzellen im Thymus exprimieren den CD4-Marker schwach auf der Oberfläche (CD4^{low}) und sind im Gegensatz zu den

EINLEITUNG

Stammzellen im Knochenmark lymphoid, können sich also noch zu T-, B- und dendritischen Zellen im Thymus differenzieren (Godfrey & Zlotnik, 1993).

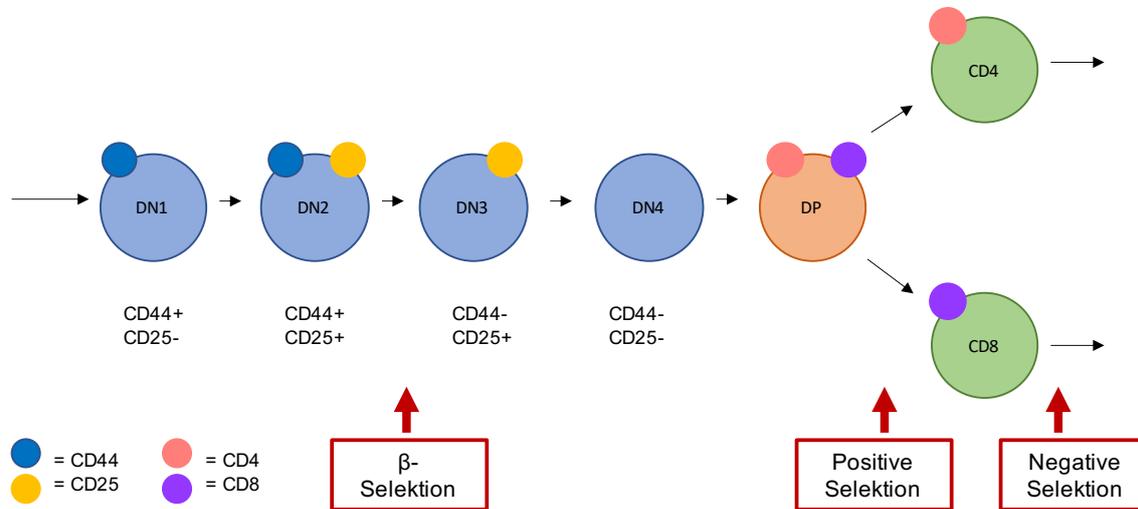


Abbildung 1: Thymozytenentwicklung im Thymus.

Übergang der Progenitorzelle aus dem Knochenmark bzw. der fetalen Leber in den Thymus. Im Thymus erfolgt die Entwicklung des Thymozyten von DN1-DN4 zu DP zu SP (CD4⁺ und CD8⁺) und die Transition über das periphere Blut in die sekundären lymphatischen Organe. Im Thymus durchlaufen die Thymozyten die β-, Positive und Negative Selektion. Anhand der Oberflächenmarker CD25 und CD44 sowie CD4 und CD8 lassen sich die Thymozyten in die einzelnen Entwicklungsstadien einteilen. Die CD4^{low} und ISP sind nicht in der Graphik aufgeführt. DN: doppelt negativ; DP: doppelt positiv; SP: einfach positiv. Pfeile geben die Entwicklung des einzelnen Thymozyten an.

Zu Beginn der Entwicklung der Thymozyten werden die Thymozyten als doppelt-negativ (DN) bezeichnet. Sie exprimieren weder einen CD4- noch einen CD8-Oberflächenmarker und machen 1 - 2% der Thymozyten im Thymus aus (Hayday & Pennington, 2007). Innerhalb dieser Population lassen sich vier weitere Entwicklungsschritte anhand der Oberflächenmarker CD44 und CD25 (IL-2-Rezeptor α) unterteilen (Godfrey & Zlotnik, 1993): DN1-Thymozyten (DN1) exprimieren CD44, aber nicht CD25. DN2-Thymozyten (pro-T-Zelle; DN2) exprimieren CD44 und CD25. Thymozyten, welche den CD44-Rezeptor herunterreguliert und nur noch CD25 exprimiert haben, differenzieren sich irreversibel zu T-Zellen und werden als DN3-Thymozyten (prä-T-Zelle; DN3) bezeichnet. Um eine möglichst große TZR-Variabilität und damit eine möglichst

EINLEITUNG

große Antigen-Erkennungs-Wahrscheinlichkeit zu haben, durchlaufen die Thymozyten in ihrer Entwicklung eine somatische Rekombination für die α - und die β -Kette des TZR. Im Differenzierungsstadium DN2 und DN3 durchlaufen die Thymozyten das TZR β -Rearrangement bzw. die V(D)J-Rekombination der leichten und schweren Kette des TZR β , wobei die erfolgreiche Genumlagerung des Tzrb (Genlocus für die β -Kette) Voraussetzung für den weiteren Reifungsprozess ist: Es bildet sich der prä-TZR aus dem rekombinierten TZR β -Arm und einem noch invarianten prä-TZR α (Hayday & Pennington, 2007). Thymozyten, welche keinen funktionierenden prä-TZR exprimieren, gehen in die Apoptose (β -Selektion). Der prä-TZR und weitere Zytokine fördern das Überleben, Proliferieren und Differenzieren der DN3-Thymozyten weiter zu DN4-Thymozyten, welche CD25 herunterregulieren und den prä-TZR exprimieren (DN4) (Hayday & Pennington, 2007). Die DN4-Zellen differenzieren sich zu doppelt-positiven Thymozyten, wobei sie zunächst zu einfach-positiven Thymozyten werden, indem sie kurzzeitig CD8 exprimieren (*intermediate single positive*, ISP). Sobald die Zellen dann CD4 und CD8 exprimieren, werden sie als doppelt-positiv (DP) bezeichnet. DP-Zellen sind bipotente Zellen, da sie sich sowohl in CD4SP- als auch in CD8SP-Zellen weiterentwickeln können. Im DP-Entwicklungsstadium findet die stärkste Proliferation statt, wodurch die DP-Thymozyten mit 75 - 88% die größte Population ausmachen (Hayday & Pennington, 2007). Im DP-Stadium findet das TZR α -Rearrangement (Genumlagerung des Tzra (Genlocus für den TZR α)) statt. Als Ergebnis wird nun der heterodimere TZR $\alpha\beta$ exprimiert und der Thymozyt kann eine MHC-Selektion und Differenzierung zum einfach-positiven Thymozyten durchlaufen (SP; CD4SP bzw. CD8SP), bevor er als reife $\alpha\beta$ -T-Zelle den Thymus in die Peripherie verlässt (Hayday & Pennington, 2007).

Thymozyten durchlaufen somit neben der β -Selektion im DN-Stadium bis zur Entwicklung einer reifen T-Zelle zwei weitere Selektionsschritte, wodurch von den bis zu 50×10^6 pro Tag generierten Thymozyten nur ein kleiner Teil von $1 - 2 \times 10^6$ reifen T-Zellen den Thymus tatsächlich täglich verlässt (Kyewski & Klein, 2006). Die größte Reduktion der Zellzahl erfolgt in der Positiven Selektion beim Übergang vom DP- zum SP-Stadium. Dabei erhalten nur jene Zellen

EINLEITUNG

Überlebenssignale, welche über einen funktionierenden TZR den MHC auf epithelilalen APZ erkennen. Die übrigen Zellen, welche kein TZR-Überlebenssignal erhalten, gehen in die Apoptose („*death by neglect*“), wobei dies über 90% der DP-Zellen betrifft (Klein, Kyewski, Allen & Hogquist, 2014; Kyewski & Klein, 2006). Die Expression von CD69 kann als Marker bzw. Nachweis derjenigen Thymozyten herangezogen werden, welche an der TZR-vermittelten Positiven Selektion beteiligt sind (Yamashita, Nagata, Tada & Nakayama, 1993). Des Weiteren durchlaufen die SP-Zellen die Negative Selektion, um eine zu starke Bindung zwischen TZR und einem körpereigenen Antigen auf den APZs und damit die Entstehung einer Autoimmunität zu verhindern. Nach der abgeschlossenen β -, Positiven und Negativen Selektion gelangen die Zellen entweder als CD4⁺- oder als CD8⁺-T-Zellen in die Peripherie. Für die T-Zell-Entwicklung sind verschiedene Signalmoleküle wichtig: Zum einen die Transmembranrezeptoren Notch (Notch 1 - 4). Notch1 ist ein Transmembranglykoprotein, welches als Transkriptionsfaktor, welcher durch einen Liganden aktiviert wird, fungiert (Belver & Ferrando, 2016). Über eine Rezeptor-Liganden-Interaktion führen extrazelluläre Signale über eine proteolytische Spaltung des Notch-Rezeptors zu einer Translokation einer intrazellulären Domäne des Rezeptors und zu einer Transkription von Notch-Zielgenen im Nukleus. Für die T-Zell-Entwicklung ist Notch schon vor dem Eintritt der Progenitorzelle in den Thymus als auch im DN-Stadium wichtig und entscheidend für die Differenzierung der Progenitorzelle zur T-Zelle (Chen, Thompson, Zúñiga-Pflücker, 2019). In Notch1-defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass eine stärkere B-Zell-Differenzierung als eine T-Zell-Differenzierung stattfindet, wohingegen eine Notch1-Überexpression zu einer stärkeren T-Zell-Differenzierung führt (Hayday & Pennington, 2007). Des Weiteren ist Notch zusammen mit dem prä-TZR wichtig für die Proliferation und Differenzierung zu DP-Thymozyten (Kelly *et al.*, 2007). Notch spielt auch eine Rolle bei der Entscheidung $\alpha\beta$ -T-Zelle vs. $\gamma\delta$ -T-Zelle und bei der Positiven Selektion (Chen *et al.*, 2019). Eine dauerhafte Aktivierung von Notch1 steht im Zusammenhang mit der Entstehung einer T-ALL (Belver & Ferrando, 2016).

EINLEITUNG

Ein weiterer wichtiger Signalweg in der Thymozytenentwicklung ist der IL-7-Rezeptor-Signalweg. Das Zytokin IL-7 ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor. Der IL-7-Rezeptor (IL-7R) wird auf allen Lymphozyten (T-, B- und NK-Zellen) exprimiert (Jiang *et al.*, 2004). Das IL-7R-Gen ist ein Zielgen des Notch1-Signalwegs. Mäuse mit einer IL-7-Defizienz oder ohne Notch-Signale weisen eine reduzierte DN-Zellzahl auf (Seddon, 2015). IL-7 fungiert allgemein als Überlebensmolekül, indem der IL-7-Signalweg u.a. das antiapoptotische Protein Bcl-2 aktiviert (Seddon, 2015). In den Thymozytenentwicklungsstadien hat es unterschiedliche Funktionen. Dabei ist eine Regulation des IL-7R-Signalwegs durch eine IL-7R-Expression sowie durch negativ regulierende Moleküle für die Thymozytenentwicklung wichtig: In den DN-Stadien DN1 bis DN4 wird der IL-7R exprimiert. Es wird dadurch Zellwachstum und Zellproliferation gefördert und gleichzeitig die Zelldifferenzierung gehemmt. Die Differenzierung zu DP erfolgt dann durch eine Herunterregulierung der IL-7R-Expression (Seddon, 2015). In den peripheren T-Zellen wird die IL-7R-Expression wiederum hochreguliert (Seddon, 2015). Der IL-7R-Signalweg führt zu Wachstum und Proliferation der DN-Thymozyten, indem es eine Isoform der Phosphoinositol-3-Kinase aktiviert und Nährstofftransportproteine induziert (z.B. CD71, CD98). Die Herunterregulierung des IL-7-Überlebenssignals ist Voraussetzung für die Positive Selektion und eine Hochregulation ist Voraussetzung bei der Differenzierung zu CD8-SP-Thymozyten (Singer, Adoro & Park, 2008). Die IL-7/IL-7R-Signalkaskade führt über den JAK/STAT-Signalweg (STAT5) (Ribeiro *et al.*, 2018). Eine negative Regulierung des IL-7R-Signalwegs erfolgt u.a. über den Zytokininhibitor SOCS1 aus der SOCS-Proteinfamilie (*suppression of cytokine signaling*) (Singer *et al.*, 2008).

1.2 SLy1

SLy1 (*SH3-domain protein expressed in lymphocytes 1*) ist ein lymphozytenspezifisches pleiotropes Molekül.

Das SLy1-Protein weist zwischen Maus und Mensch eine über 90-prozentige Aminosäurehomologie auf (Beer, Simins, Schuster & Holzmann, 2001). Das Protein besteht aus 381 Aminosäuren, hat ein Gewicht von 55 kDa und wird auf dem X-Chromosom codiert (Beer *et al.*, 2001). Das humane Gen für SLy1 befindet sich im Abschnitt Xq25-Xq26.3 (Beer *et al.*, 2001). Auf diesem X-Chromosomenabschnitt werden beim Menschen weitere Gene codiert, welche an zahlreichen Immunstörungen beteiligt sind – z.B. das Genprodukt CD40L und das Genprodukt SH2D1A: Eine CD40L-Defizienz findet sich bei einem Hyper-IgM-Syndrom und eine SH2D1A-Mutation bei lymphoproliferativen Erkrankungen (Beer *et al.*, 2001).

1.2.1 SLy1-Struktur und zelluläre Lokalisation

SLy1 weist typische Interaktionsdomänen auf und ist daher möglicherweise ein Adaptorprotein in der (Antigenrezeptor-) Signalkaskade von Lymphozyten (Beer *et al.*, 2001). Es trägt eine zweigeteilte, nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) mit polybasischen, positiv geladenen Regionen, eine Src-Homologie-3-Domäne (SH3) und ein steriles α -Motiv (SAM) (Beer *et al.*, 2001). Der Strukturaufbau ist als Schema in Abbildung 2 dargestellt. Die Proteinstruktur verweist auf eine Rolle von SLy1 als Signal- bzw. Adaptormolekül. Die NLS-Domäne ist für eine nukleäre Lokalisation des Proteins verantwortlich und die SH3-Domäne und die SAM-Domäne stehen u.a. im Zusammenhang mit einer Protein-Protein-Interaktion und ermöglichen zudem eine Homodimerisierung (Kukuk *et al.*, 2019; Brandt, 2010).

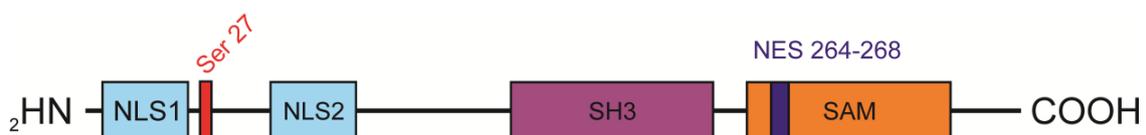


Abbildung 2: Domänenstruktur von SLy1.

Schematische Darstellung der zweigeteilten NLS, SH3- und SAM-Domäne sowie der Phosphorylierungsstelle Ser27 (Beer *et al.*, 2001).

SLy1 hat zwei Lokalisationen (Zytoplasma und Nukleus), wobei die Funktionalität von SLy1 maßgeblich von der subzellulären bzw. nukleo-zytoplasmatischen Lokalisation bzw. der regulierenden Phosphorylierung an Serin27 abhängt: Das SLy1-Protein lässt sich in ruhenden Zellen v.a. im Nukleus (Beer *et al.*, 2005) und durch TZR-Stimulation im Zytoplasma von Thymozyten und von peripheren T-Zellen nachweisen (Schäll, Schmitt, Reis, Brandt & Beer-Hammer, 2015; Reis, 2007). Eine TZR-Stimulation führt zu einer Arretierung von SLy1 im Zytoplasma, indem SLy1 spezifisch am Serin27 phosphoryliert wird (Astoul *et al.*, 2003). Diese Phosphorylierung ermöglicht die Bindung an 14-3-3-Proteine, welche zu einer Maskierung der NLS von SLy1 führt und damit SLy1 im Zytoplasma hält (Brandt, 2010). Die entscheidende Rolle der NLS und von Serin27 konnte mit einem Mausmodell bewiesen werden, in welchem dem SLy1-Protein die NLS und das Serin27 (SLy1^Δ) fehlen. Hierbei war SLy1 unabhängig von einer Stimulation nur im Zytoplasma nachweisbar (Beer *et al.*, 2005). Des Weiteren zeigten das SLy1^Δ-Mausmodell und das Mausmodell mit einer vollständigen SLy1-Defizienz (SLy1^{KO}) vergleichbare Phänotypen (Reis, Pfeffer & Beer-Hammer, 2009), was auf eine entscheidende Rolle von SLy1 im Nukleus schließen lässt.

1.2.2 Funktionen von SLy1 bzw. Phänotyp bei SLy1-Defizienz

Das Protein SLy1 wird in allen Thymozytenentwicklungsstufen (DN, DP, SP) und in den peripheren T-Zellen exprimiert (Reis *et al.*, 2009). SLy1 ist ein elementarer Bestandteil für die Lymphozytenentwicklung und für die vollständige Aktivierung des adaptiven Immunsystems, wobei eine direkte Rolle in den Lymphozyten nachgewiesen werden konnte (Beer *et al.*, 2005).

SLy1-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Zellzahl der lymphatischen Organe (Thymus, Milz und periphere Lymphknoten) (Reis *et al.*, 2009). Zudem weisen die Mäuse ein stark beeinträchtigtes Immunsystem auf und zeigen phänotypisch eine Anfälligkeit bei Infektionsversuchen (Schäll *et al.*, 2015). Die Funktion von SLy1 scheint hierbei je nach lymphatischer Subpopulation unterschiedlich zu sein. In Thymozyten und T-Zellen konnte eine Funktion bei der Entwicklung, Proliferation und vollständigen Aktivierung festgestellt werden (Schäll *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2009). In NK-Zellen konnte eine Rolle von SLy1

EINLEITUNG

für die ribosomale Stabilität und Signaltransduktion nachgewiesen werden (Arefanian *et al.*, 2016).

Die Entwicklung von Thymozyten ist bei SLy1-defizienten Mäusen beeinflusst. So zeigt sich eine verlangsamte Entwicklung beim Übergang vom DN- zum DP-Thymozytenstadium, wobei im Thymus von SLy1-defizienten Mäusen die DN-Population (Anteil an Gesamthymozyten sowie absolute DN-Zellzahl) vergrößert und die DP-Population (absolute DP-Zellzahl) reduziert vorliegt (Reis *et al.*, 2009; Reis, 2007). Die vergrößerte DN-Thymozytenpopulation bei verkleinerter DP-Population gibt einen Hinweis darauf, dass eine SLy1-Defizienz zu einer Blockade der Thymozytenentwicklung im DN-Stadium führt (Reis *et al.*, 2009; Reis, 2007). Tatsächlich liegen *in vivo* bei einer SLy1-Defizienz relativ mehr DN-Thymozyten im DN3-Stadium und weniger im DN4-Stadium vor (Reis *et al.*, 2009). Zudem konnte eine signifikant erhöhte Apoptoserate in SLy1^{KO}-DN-Thymozyten bzw. in DN3-Thymozyten *in vitro* (OP9-DL1-Kultur) nachgewiesen werden, wodurch auf eine antiapoptotische bzw. protektive Funktion von SLy1 in der Thymozytenentwicklung bzw. in DN3-Thymozyten bei der β -Selektion geschlossen wurde (Reis *et al.*, 2009). Weiter konnte als Ursache für die reduzierte Thymozytenentwicklung bei einer SLy1-Defizienz eine fehlerhafte Generierung des TZR ausgeschlossen werden, da sich in DP-Thymozyten kein Unterschied in der TZR β -Expression fand (Reis *et al.*, 2009).

Die absolut erhöhte DN-Zellzahl bei gleichzeitig erhöhter Apoptoserate könnte durch einen Feedbackmechanismus bei reduzierter DP-Thymozytenzahl erklärt werden.

SLy1 scheint in der Thymozytenentwicklung in verschiedenen Signalwegen eine Funktion zu haben. Bereits nachgewiesen werden konnte eine Rolle von SLy1 im IL-7-R-Signalweg, wobei IL-7 wiederum eine wichtige Rolle in der Thymozytenentwicklung spielt (Seddon, 2015). In SLy1-defizienten Thymozyten konnte eine erhöhte Expression des IL-7-Rezeptors α (sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene) (Kloos, 2021; Schäll, 2015) sowie eine erhöhte Phosphorylierung von STAT5A festgestellt werden (Kloos, 2021). Zum anderen

EINLEITUNG

wird SLy1 im DN-Stadium eine Rolle im Notch- sowie prä-TZR-Signalweg zugeschrieben bzw. bei der Integration beider Signalwege (Reis *et al.*, 2009).

Des Weiteren ist die Aktivierbarkeit bzw. Proliferation von T-Zellen bei SLy1-Defizienz reduziert. So zeigt sich nach TZR-Stimulation (antigenvermittelt) von SLy1^{KO}-T-Zellen der Milz eine deutlich reduzierte Proliferation (Reis, 2007). Reis (2007) postuliert hierbei eine Funktion von SLy1 in der TZR-Signaltransduktion bzw. in der Antigen-Rezeptor-Signaltransduktion. Für eine Rolle von SLy1 in der TZR-Signaltransduktion spricht zudem die spezifische Phosphorylierung von SLy1 an Serin27 nach TZR-Stimulation (Astoul *et al.*, 2003). Beer *et al.* (2005) postulieren hierbei, dass die reduzierte Proliferation in Teilen auf eine reduzierte IL-2-Produktion im TZR-Signalweg zurückzuführen ist, da in SLy1^Δ-T-Zellen aus der Milz nach Stimulation mit anti-CD3 (Antigen-Rezeptor-Ligation) eine reduzierte Proliferation und durch Zugabe von IL-2 *in vitro* eine Normalisierung der Proliferation beobachtet werden konnte.

Eine reduzierte Proliferation von T-Zellen bei SLy1-Defizienz findet sich zudem nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* (Schäll *et al.*, 2015). Dies führt in SLy1-defizienten Mäusen zu einer reduzierten Infektabwehr, wobei CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in gleichem Maße betroffen sind (Schäll *et al.*, 2015).

Zusammenfassend findet sich bei einer SLy1-Defizienz eine Beeinträchtigung sowohl in der Lymphozytenentwicklung als auch in den peripheren lymphatischen Organen, wobei verschiedene Signalwege von der Defizienz betroffen zu sein scheinen.

1.3 p53-Signalweg

Das Protein p53 ist ein Transkriptionsfaktor und wichtiger Tumorsuppressor. Bei der Entstehung von Tumoren spielt p53 eine wichtige Rolle. Eine p53-Mutation ist in 50% aller humanen Tumoren nachweisbar. Eine Keimbahnmutation im Gen für p53 (TP53) führt zum sogenannten Li-Fraumeni-Syndrom, einem Tumorprädispositionssyndrom, bei welchem die betroffenen Patienten ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung verschiedenster Tumore haben (Dudgeon *et al.*, 2014). Auch eine p53-Defizienz in Mäusen führt gehäuft zur spontanen Tumorgenese, wobei v.a. Thymozyten anfällig sind und T-Zell-Lymphome die am häufigsten gefundene Tumorspezies in p53-defizienten Mäusen sind (Klusmann, Rodewald, Li, Schulz-Heddergott & Dobbstein, 2016; Dudgeon *et al.*, 2014; Donehower *et al.*, 1995; Donehower *et al.*, 1992).

Der Tumorsuppressor p53 spielt unter anderem eine Schlüsselrolle bei der Antwort auf Replikationsstress sowie bei DNA-Schäden (*DNA damage response*; DDR) (Abb. 3) (Hubackova *et al.*, 2020; Klusmann *et al.*, 2016). Dabei reguliert dieser Tumorsuppressor eine Vielzahl verschiedener Zielgene und Signalwege. Zum einen fungiert p53 als Schutz vor der Entstehung von Replikationsstress und von DNA-Schäden, indem es direkt an der Replikationsgabel wirkt und die Prozessivität bei der DNA-Synthese erhöht (Klusmann *et al.*, 2016). Zum anderen fungiert p53 als Zellzyklusregulator bei geschädigten Zellen, wobei p53 u.a. zum Zellzyklusstopp und zur Reparatur oder zum permanenten Zellzyklusarrest (zelluläre Seneszenz) über die Aktivierung des Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p21/*Cdk*-Inhibitor1 oder zur Apoptose über die Aktivierung des proapoptotischen Proteins PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) führt (Klusmann *et al.*, 2016).

Seneszenz beschreibt den Zustand, dass eine eigentlich proliferierende Zelle nicht mehr in den Zellzyklus eintritt. Man unterscheidet dabei zwischen replizierender Seneszenz, onkogener Seneszenz und Seneszenz induziert durch DNA-Schäden, wobei eine Seneszenz durch eine anhaltende DDR ausgelöst werden kann (Strzeszewska, Alster, Mosieniak, Ciolko & Sikora, 2018).

Um diese Funktionen auszuüben, bedarf es zunächst einer Induktion bzw. Aktivierung von p53 (Abb. 3).

EINLEITUNG

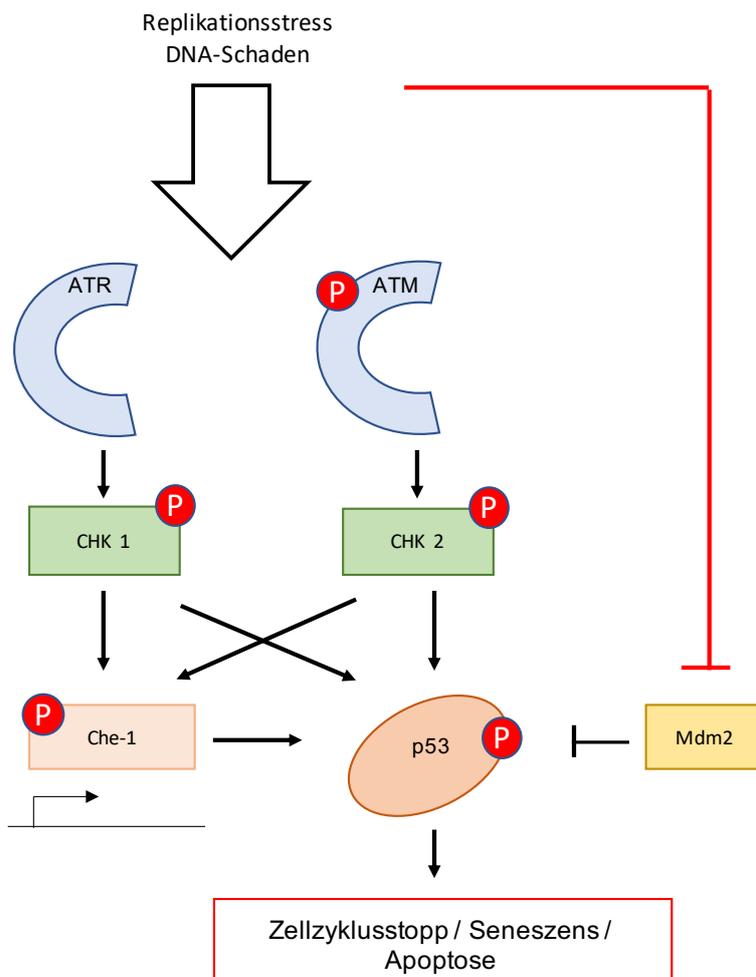


Abbildung 3: p53-Aktivierung nach Replikationsstress oder DNA-Schäden.

Schematische Darstellung der p53-Aktivierung durch Replikationsstress oder DNA-Schäden über die Aktivierung der Kinasen ATR und ATM, welche wiederum die Kinasen CHK1 und CHK2 aktivieren. Dies führt u.a. zur Phosphorylierung (roter Punkt) bzw. Aktivierung von p53 sowie vom Transkriptionsfaktor Che-1 für p53 (Bruno *et al.*, 2006). Dies kann damit u.a. zum Zellzyklusarrest, zur Seneszenz sowie zur Apoptose führen (Klusmann *et al.*, 2016). p53 wird hierbei negativ durch Mdm2 reguliert (Hubackova *et al.*, 2020). Roter Punkt: Phosphorylierung, schwarze Pfeile: Aktivierung, schwarzer/roter Balken: Hemmung.

Inaktives p53 wird konstitutiv in geringen Mengen exprimiert, wobei gleichzeitig eine negative Regulation von p53 durch die E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*) erfolgt, indem p53 ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird (Hubackova *et al.*, 2020). Somit kann eine Inhibierung der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 zu einer Aktivierung von p53 führen (Hubackova *et al.*, 2020; Klusmann *et al.*, 2016).

EINLEITUNG

Eine Aktivierung von p53 kann zudem über Kinasen erfolgen. Dies kann zum einen *posttranslational* durch eine Phosphorylierung von p53 zu einer Stabilisierung, Akkumulation und Aktivierung führen (Abb. 3) (Hubackova *et al.*, 2020; Calabrese *et al.*, 2009; Bruno *et al.*, 2006). Zum anderen kann es *transkriptional* über die Kinasen ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related*), ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*), CHK1 (*checkpoint-kinase1*) und CHK2 (*checkpoint kinase2*) und das RNA-Polymerase-II-Bindungsprotein Che-1 zu einer gesteigerten p53-Transkription und somit zu erhöhten p53-mRNA-Level kommen (Bruno *et al.*, 2006).

Eine Aktivierung der Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 erfolgt im Zusammenhang mit Replikationsstress oder DNA-Schäden. Unter Replikationsstress versteht man eine Verlangsamung oder Blockierung der Replikationsgabelprogression bzw. der DNA-Synthese (Zeman & Cimprich, 2014). Eine Induktion von Replikationsstress ist in der Literatur u.a. mit der Gabe von Zytostatika wie Leflunomid (Pyrimidinsyntheseinhibition über eine DHODH-Hemmung) (Hubackova *et al.*, 2020) oder Gemcitabin (Pyrimidinantimetabolit) (Klusmann *et al.*, 2016) beschrieben. Ein Marker für Replikationsstress in der Zelle ist die Akkumulation von einzelsträngiger DNA (*single-stranded DNA*; ssDNA). Diese liegt vermehrt vor, wenn trotz Stopp der Polymerase die Helikase weiter die doppelsträngige DNA (*dopple-stranded DNA*; dsDNA) entwindet. An dieser ssDNA akkumulieren Replikationsproteine A (RPA), welche während der Replikation die ssDNA vor Abbau bzw. Modifikation schützen. Diese RPA-Akkumulation an der ssDNA ist ein Signal für die Replikationsstressantwort mit der Aktivierung der Replikationsstressproteine wie ATR und ATM, welche wiederum die Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2 aktivieren (Hubackova *et al.*, 2020; Zeman & Cimprich, 2014). Die Kinasen ATR und ATM gehören zur Gruppe der PIKKs (*phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*) (Awasthi, Foiani & Kumar, 2015). ATR als zentrale Antwort auf Replikationsstress wird durch die blockierte Replikationsgabel an weitere Signalmoleküle gebunden und aktiviert (Zeman & Cimprich, 2014). ATM wird durch Autophosphorylierung aktiviert, wobei inaktives ATM als Multimer und aktives ATM als Monomer vorliegt (Awasthi *et al.*, 2015). Die Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2 können durch

EINLEITUNG

die Kinasen ATR bzw. ATM phosphoryliert und aktiviert werden (Awasthi *et al.*, 2015). Eine Aktivierung von p53 erfolgt entweder direkt durch die Kinasen ATR/ATM oder durch eine Phosphorylierung von CHK1/CHK2, welche wiederum p53 phosphorylieren (Awasthi *et al.*, 2015). Des Weiteren wird bei DNA-Schäden durch jene Kinasen das RNA-Polymerase-II-Bindungsprotein Che-1 phosphoryliert und aktiviert, was wiederum als Transkriptionsfaktor für p53 fungiert (Bruno *et al.*, 2006). Eine Aktivierung von p53 kann somit sowohl über eine Hemmung von Mdm2, eine Stabilisierung durch Phosphorylierung als auch durch eine erhöhte Transkription erfolgen.

Aktiviertes p53 akkumuliert und wandert als Transkriptionsfaktor für u.a. den CdK-Inhibitor p21 in den Nukleus, wobei der p53-p21-Signalweg eine Seneszenz bedingt (Klusmann *et al.*, 2016). Des Weiteren kann p53 über die Inhibierung der Phosphatase CDC25c (*cell division cycle*) zum Zellzyklusarrest führen. CDC25c spielt eine Rolle bei der Induktion der Mitose (Bruno *et al.*, 2006). CDC25c wird u.a. durch p53 oder durch die Checkpoint-Kinase CHK1 durch 14-3-3 Proteine aus dem Nukleus exportiert und im Zytosol proteasomal abgebaut. Zyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*; Cdk), die das Fortschreiten des Zellzyklus vorantreiben, können in der Folge am Zellzykluskontrollpunkt nicht mehr dephosphoryliert werden und es kommt zum Zellzyklusarrest am Kontrollpunkt G2/M (Hubackova *et al.*, 2020; Awasthi *et al.*, 2015).

p53 hat aber nicht nur eine Rolle nach der Entstehung von Replikationsstress, sondern schützt die Zelle auch vor dem Entstehen von neuem Replikationsstress, wobei ein Fehlen von p53 selbst zu Replikationsstress in der Zelle führt (Klusmann *et al.*, 2016). Klusmann *et al.* (2016) konnten nachweisen, dass p53 entscheidend für die Prozessivität der DNA-Synthese ist und dass p53 ein ungestörtes Fortschreiten der DNA-Replikationsgabel gewährleistet. Dabei wird der Großteil der p53-Zielgene in der S-Phase induziert (Klusmann *et al.*, 2016). Für Mdm2 wird hierbei eine Rolle als Mediator von p53 an Histonen und Chromatin beim Schutz der DNA-Replikation diskutiert (Klusmann *et al.*, 2016).

1.4 SOCS1 im IL-7-Signalweg und im p53-Signalweg

SOCS1 aus der SOCS-Proteinfamilie (*suppression of cytokine signaling*) ist ein Zytokininhibitor. Diesem Protein wird zum einen die Rolle eines Tumorsuppressors zugeschrieben, zum anderen verbindet SOCS1 den p53-Seneszenz-Signalweg mit dem IL-7-STAT5A-Signalweg (Calabrese *et al.*, 2009). Im Zytoplasma hemmt SOCS1 als Zytokininhibitor den JAK/STAT-Signalweg und reguliert die Zellproliferation und Zelldifferenzierung durch eine Inhibierung von JAK-Kinasen und Ubiquitinierung von Onkogenen (Abb. 4A) (Calabrese *et al.*, 2009). Dabei wird die Transkription von SOCS1 selbst durch den JAK/STAT-Signalweg aktiviert (Lessard, Saint-Germain, Mignacca & Ferbeyre, 2019). Im Nukleus reguliert SOCS1 im Zusammenhang mit DNA-Schäden den p53-Signalweg. Es wirkt direkt bei der Interaktion von p53 mit den Kinasen ATR/ATM und CHK2, indem es die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von p53 verstärkt (Abb. 4B) (Calabrese *et al.*, 2009). Der p53-Signalweg kann dann eine Seneszenz induzieren. Weiter konnten Calabrese *et al.* (2009) beobachten, dass eine erhöhte STAT5A-Aktivität eine Seneszenz in IMR90-Zellen induzieren konnte und gleichzeitig mit erhöhten SOCS1-mRNA-Leveln einherging. Hingegen konnte in SOCS1-defizienten Zellen bei einer erhöhten STAT5A-Aktivität keine Seneszenz induziert werden. Somit scheint SOCS1 eine Rolle als Signalmolekül zwischen STAT5A und p53 bzw. der Induktion einer Seneszenz zu haben.

EINLEITUNG

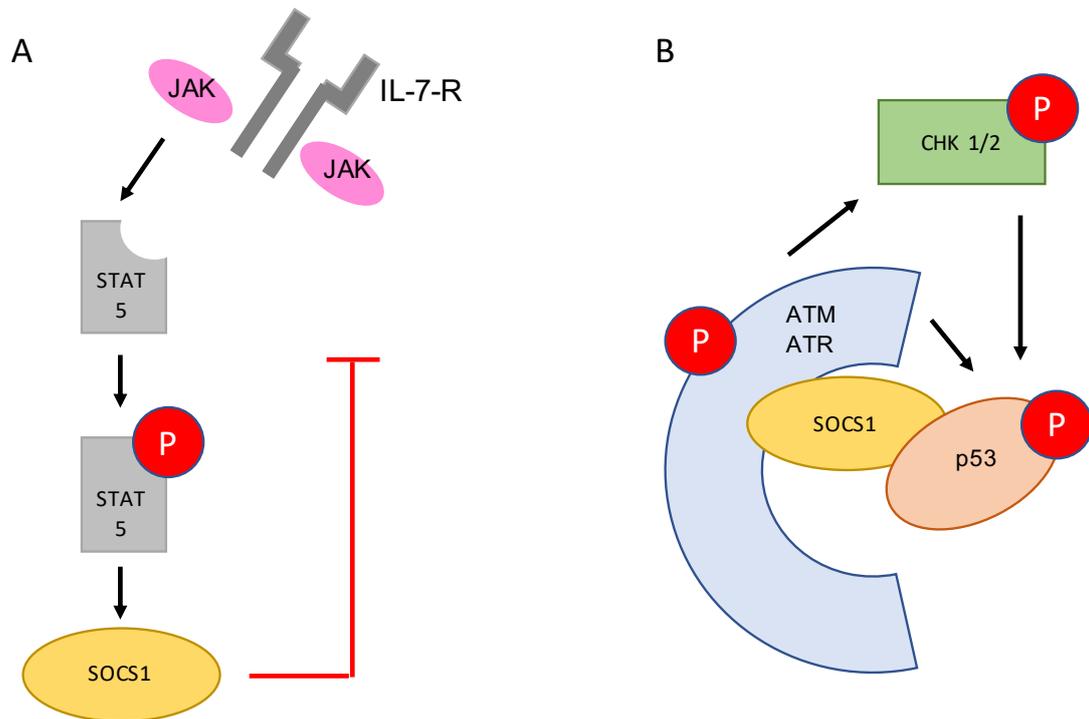


Abbildung 4: Funktion von SOCS1 im Zytoplasma und im Nucleus.

Schematische Darstellung der Funktion von SOCS1. **A.** Im Zytoplasma reguliert SOCS1 die intrazelluläre IL-7-Signalantwort negativ, indem es die Aktivierung von STAT5 hemmt. Die Transkription von SOCS1 wird durch den JAK/STAT-Signalweg aktiviert (Lessard *et al.*, 2019). **B.** Im Nucleus verstärkt SOCS1 die Bindung der Kinasen ATR bzw. ATM an p53 und damit die Aktivierung des p53-Signalwegs. In der Literatur wird zudem eine Rolle von SOCS1 als Signalmolekül zwischen STAT5A und p53 beschrieben (nicht dargestellt). Roter Punkt: Phosphorylierung, roter Balken: Hemmung, schwarze Pfeile: Aktivierung. Modifiziert nach Calabrese *et al.*, 2009.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei SLy1-defizienten Mäusen konnte u.a. eine reduzierte Zellularität lymphatischer Organe, eine erhöhte Apoptoserate im DN-Stadium (Reis *et al.*, 2009) sowie eine beeinflusste Expression einiger zellzyklusregulierender Moleküle (Schäll, 2015) und eine Hochregulierung der mRNA des Tumorsuppressors p53 (Kloos, 2021) festgestellt werden.

Daher soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob in SLy1^{KO}-Thymozyten bzw. SLy1^{KO}-T-Zellen der p53-Signalweg verändert vorliegt und die p53-Erhöhung im Zusammenhang mit den Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 steht, welche bei Replikationsstress sowie DNA-Schäden hochreguliert sein können (Hubackova *et al.*, 2020). Hierfür sollen p53 sowie die zellzyklusregulierenden Kinasen ATR, ATM, CHK1, CHK2 und der Zytokininhibitor SOCS1 in SLy1^{KO}-Thymozyten sowie in SLy1^{KO}-DN, -DP, -SP und peripheren SLy1^{KO}-T-Zellen im Vergleich zu den jeweiligen WT-Kontrollen mittels quantitativer PCR (qPCR) untersucht werden. In Thymozyten und DN-Thymozyten sollen p53, ATR, ATM, CHK1 und CHK2 zusätzlich auf Proteinebene analysiert werden, um Rückschlüsse auf eventuelle Unterschiede bei der Transkription und Translation bzw. Proteinakkumulation ziehen zu können.

Weiter soll geklärt werden, welchen Signalweg die p53-Akkumulation bei einer SLy1-Defizienz aktiviert und inwieweit ein Zellzyklusstopp die Ursache für die reduzierte Thymozytenzahl in SLy1^{KO}-Mäusen sein kann. Hierfür soll die mRNA der Phosphatase CDC25c und des CdK-Inhibitors p21 in Thymozyten, DN, DP, SP und peripheren T-Zellen untersucht werden.

Da eine SLy1-Defizienz zu einer reduzierten Zellzahl in lymphatischen Organen führt und p53 in SLy1-defizienten Mäusen hochreguliert ist und als Tumorsuppressor zu einem Zellzyklusstopp führt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine spezifische Deletion von p53 in Thymozyten die reduzierte Zellzahl regulieren kann. Es soll die Thymozytenentwicklung und -differenzierung bei SLy1-Defizienz vor dem Hintergrund einer p53-Defizienz mittels Durchflusszytometrie analysiert und ein mögliches Tumorgeschehen bei einer p53- und SLy1-Defizienz untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Geräte

Geräte:	Hersteller:
Absorptions-Mikroplatten-Reader	Tecan
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences
Geldokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories
LightCycler 480 II	Roche
Nano Photometer	Implem
Zentrifugen	Eppendorf

2.1.2 Kits und Verbrauchsmaterialien

Beschreibung:	Kit/Material:	Hersteller:
RNA Isolation	Nucleo Spin RNA Micro-Kit, Mini-Kit	Macherey-Nagel Qiagen
cDNA-Synthese	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem
qPCR Primer	siehe Tabelle 5	Biomers
DN-Thymozyten- Isolation	CD4-, CD8a-, Ter119-, Non-T-cell- Depletion-MicroBeads	Miltenyi Biotec
Periphere Thymozyten-Isolation	CD90.2 MicroBeads	Miltenyi Biotec
Proteinbestimmung	Bio-Rad DC™ Protein Assay	Bio Rad
Proteinpuffer (reduzierend)	Roti-Load 1 (4xfach konzentriert)	Roth
Western Blot Detection	Amersham ECL prime Detection Kit SignalFire™ ECL Reagent	GE Healthcare Cell Signaling
Western Blot Gradientengele	4-15% Mini-Protean ^R TGX™ Precast Protein Gels 4-20% Mini-Protean ^R TGX™ Precast Protein Gels	Bio Rad
Western Blot Stripping	ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution	Merck (Millipore)
Western Blot primäre Antikörper	ATM, ATR, CHK1, CHK2, p53, SOCS1 β-Aktin	Cell Signaling Abcam

MATERIAL UND METHODEN

	p21	Santa Cruz
Western Blot sekundäre Antikörper	Anti-rabbit IgG - HRP-linked Antibody Anti-mouse IgG - HRP-linked Antibody	Cell Signaling Dako
Fluoreszenzgekoppelte Antikörper	siehe Tabelle 4 und Tabelle 8 - 10	BD Biosciences

2.2 Tierexperimente

2.2.1 Allgemeines

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien Bereich in der Tierversuchsanlage Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Einhaltung eines zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gezüchtet. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Inzucht erfolgte mit 8 - 10 Wochen alten Mäusen. Die Jungtiere wurden mit 3 - 4 Wochen von den Eltern getrennt. Die verwendeten Mauslinien wurden auf einen C57BL/6N-Hintergrund gekreuzt. Die für die Rückkreuzung verwendeten C57BL/6N-Mäuse wurden von Charles River Laboratories erworben. Die Jungtiere wurden mit Ohrlochung markiert. Dieses Material wurde zur Gewinnung von genomischer DNA verwendet und mittels PCR genotypisiert. Eine Nachgenotypisierung erfolgte anhand einer Schwanzspitzenprobe. Zur Kontrolle dienten in jedem Versuch gleichaltrige Wurfgeschwister.

Sämtliche Tierexperimente erfolgten laut den Tierversuchsangaben und wurden durch das zuständige Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (AZ 26.04.2018).

2.2.2 Mausmodelle

Um die Rolle von SLy1 zu untersuchen, wurden zwei Mausmodelle verwendet: Zum einen das SLy1^{WT/KO}-Mausmodell mit einer Defizienz für das Gen für SLy1, welches bereits beschrieben wurde (Beer *et al.*, 2005) (Tab. 1). Alle Experimente mit diesem Mausmodell wurden mit 8 - 12 Wochen alten männlichen und weiblichen Mäusen durchgeführt.

Tabelle 1: SLy1^{WT/KO}-Mausmodell.

SLy1^{WT/KO}-Mausmodell mit jeweiligem Genotyp, entsprechender genotypischen Charakteristik und im Weiteren verwendete Bezeichnung.

Genotyp	Charakteristik	Verwendete Bezeichnung
SLy1 ^{WT}	Expression von SLy1	SLy1 ^{WT}
SLy1 ^{KO}	Deletion von SLy1	SLy1 ^{KO}

Zum anderen wurde das SLy1-p53-Mausmodell verwendet, in welchem das SLy1^{WT/KO}-Mausmodell mit einem konditionalen Knockout für das Gen TP53 spezifisch in T-Lymphozyten mittels Expression der Cre-Rekombinase durch den Promotor der Tyrosin-Kinase „Lck“ (Lck-Cre^{+/-} = Lck-Cre⁺) und einer flankierenden LoxP-Insertion an beiden p53-Allelelen gekreuzt (p53^{fl/fl}) wurde (Abb. 5, Tab. 2).

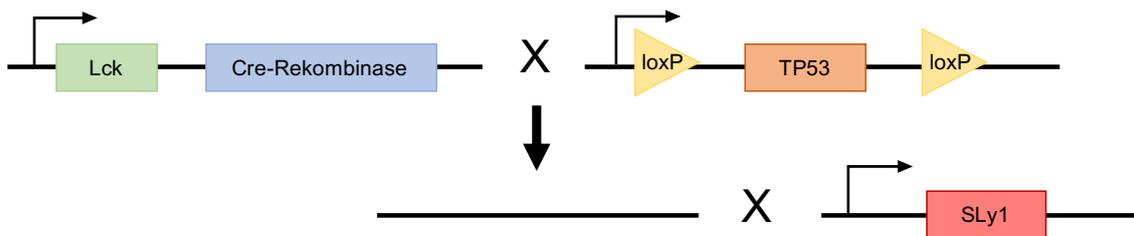


Abbildung 5: SLy1-p53-Mausmodell.

Schematische Darstellung des SLy1-p53-Mausmodell, bei welchem die Cre-Rekombinase an den Promotor von Lck gekoppelt wurde und die entsprechenden Schnittstellen (loxP) vor und nach TP53 (Gen für das Protein p53) eingebracht wurden. Dieser Genotyp wurde mit dem SLy1^{WT/KO}-Mausmodell gekreuzt.

Alle Experimente wurden hierbei mit 25 Wochen alten männlichen und weiblichen Mäusen durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Als Kontrollgruppen dienten jene Genotypen, bei welchen p53 weiterhin in Thymozyten und T-Zellen exprimiert wurde, da entweder die entsprechende Cre-Rekombinase (Lck-Cre) oder loxP-Stelle fehlte (SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺) (Tab. 2).

Tabelle 2: SLy1-p53-defizientes Mausmodell und Kontrollen.

SLy1-p53-defizientes Mausmodell mit jeweiligem Genotyp, entsprechender genotypischen Charakteristik und im Weiteren verwendete Bezeichnung.

Genotyp	Charakteristik	Verwendete Bezeichnungen
SLy1 ^{WT} p53 ^{fl/fl} Lck-Cre ^{TG}	SLy1 ^{WT} und deletiertes p53 in Thymozyten/T-Zellen (durch Thymozyten-spezifische Cre-Rekombinase-Expression und entsprechende loxP-Stelle)	SLy1 ^{WT} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺
SLy1 ^{KO} p53 ^{fl/fl} Lck-Cre ^{TG}	SLy1 ^{KO} und deletiertes p53 in Thymozyten/T-Zellen (durch Thymozyten-spezifische Cre-Rekombinase-Expression und entsprechende loxP-Stelle)	SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺
SLy1 ^{WT} p53 ^{fl/fl} Lck-Cre ^{WT}	Vergleichbar mit SLy1 ^{WT} , aber mit modifiziertem TP53-Gen	SLy1 ^{WT} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁻
SLy1 ^{KO} p53 ^{fl/fl} Lck-Cre ^{WT}	Vergleichbar mit SLy1 ^{KO} , aber mit modifiziertem TP53-Gen	SLy1 ^{KO} /p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁻
SLy1 ^{WT} p53 ^{WT} Lck-Cre ^{TG}	Vergleichbar mit SLy1 ^{WT} , aber mit Thymozyten-spezifischer Cre-Rekombinase	SLy1 ^{WT} /p53 ^{WT} /Lck-Cre ⁺
SLy1 ^{KO} p53 ^{WT} Lck-Cre ^{TG}	Vergleichbar mit SLy1 ^{KO} , aber mit Thymozyten-spezifischer Cre-Rekombinase	SLy1 ^{KO} /p53 ^{WT} /Lck-Cre ⁺

2.3 Organentnahme

Die Betäubung der Mäuse erfolgte mittels Isofluran und die Tötung mittels zervikaler Dislokation.

Es wurden je nach Versuch Thymus, Milz, inguinale Lymphknoten, sowie Knochenmark aus dem Femur entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS auf Eis gestellt.

2.4 Zellisolation

2.4.1 Zellisolation Lymphozyten

Zur Zellisolation wurden die Organe durch ein 70 µm Zellsieb homogenisiert. Das Knochenmark wurde gewonnen, indem der Femur mit Hilfe einer 22 G Mikrolanzette mit 5 ml PBS durchgespült wurde. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte das Waschen der Zellen bei 500 x g.

Die Zellen der Milz, des Knochenmarks und Teile des Thymus wurden in 3 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert (0,155 M NH₄Cl; 0,01 M KHCO₃; 0,1 mM EDTA) und für 3 Minuten inkubiert, um die Erythrozyten zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und unter dem Mikroskop gezählt (1:10 in Trypanblau).

2.4.2 Zellisolation DN-Thymozyten und periphere T-Zellen

DN-Thymozyten machen 1 - 2% der Thymozyten-Population aus (Hayday & Pennington, 2007). Aufgrund des geringen DN-Anteils wurden hierfür v.a. junge Tiere im Alter von 8 Wochen gewählt. Um die DN-Thymozyten zu isolieren, wurden die Thymozyten wie oben beschrieben isoliert, die Erythrozyten mit Erythrozyten-Lyse entfernt und weiter durch MACS-Verfahren (*magnetic activated cell sorting*) isoliert. Die Zellen wurden in MACS-Puffer (500 ml PBS; 0,5% (w/v) BSA; 2,5 mM EDTA) mit entsprechenden MicroBeads markiert (Tab. 3) und über LD-Säulen nach Angaben des Herstellers isoliert.

Tabelle 3: MACS-Beads.

1. Aufreinigung	Anti-Ter-119 Beads
	Anti-Non-T-cell-Depletion Beads
2. Aufreinigung	Anti-Biotin Beads (gegen Anti-Non-T-cell-Depletion Beads)
	Anti-CD4 Beads
	Anti-CD8 Beads

Es wurden zwei Reinigungsschritte durchgeführt, wobei jeweils die positive Fraktion verworfen und mit der negativen Fraktion weitergearbeitet wurde. In der ersten Isolierung wurden alle Erythrozyten sowie deren Vorläufer zusätzlich zur Erythrozyten-Lyse durch anti-Ter119 herausgefiltert. In der zweiten Isolierung

wurden alle Zellen, welche keine Thymozyten waren, sowie alle DP- und SP-Thymozyten herausgefiltert. Die Reinheit der isolierten Fraktion wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Dabei wurde eine Reinheit über 93% erreicht. Zur Gegenkontrolle wurde die positive Fraktion ebenfalls bestimmt. Für die Reinheitsbestimmung wurden die Zellen entsprechend der Tabelle 4 gefärbt.

Tabelle 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der DN-Reinheit.

DN-Färbung von Thymozyten (mit jeweils Marker, Fluorochrom und Verdünnung)	
CD90 APC	1:1000
CD4 Pacific Blue	1:800
CD8a PE	1:200
γδTZR FITC	1:100

Periphere T-Zellen wurden aus der Milz isoliert. Es wurde hierbei mit 300 x g bei 4°C zentrifugiert und ohne Erylyse gearbeitet, um einen größeren Anteil an lebenden T-Zellen zu erhalten. Die Zellen wurden in MACS-Puffer mit CD90.2 MicroBeads markiert und über LS-Säulen nach Angaben des Herstellers isoliert. Mittels eines CD90.2-APC-Antikörpers wurde im Durchflusszytometer eine Reinheit zwischen 60 - 90% bestimmt.

2.4.3 Zellisolation DP-Thymozyten

Die Zellen wurden von der Doktorandin der Arbeitsgruppe Isabel Kloos mittels *Flow Sorter* der *Core Facility* der Medizinischen Fakultät sortiert und für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.5 Nachweis auf mRNA-Ebene

2.5.1 RNA-Isolation aus Thymozyten und T-Zellen

Die RNA-Isolation erfolgte bei Thymozyten mit dem Kit „Nucleo Spin RNA“ von Macherey-Nagel, bei DN-Thymozyten mit dem „Micro-Kit“, bei DP-Thymozyten und peripheren T-Zellen mit dem „Mini-Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung. Dabei wurden die Zellen mit einer chaotropen Lösung lysiert, die RNase

inaktiviert und mit einer DNase-Lösung wurde genomische DNA verdaut. Die RNA der Thymozyten wurde in 60 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Dabei wurden Konzentrationen von 100 - 200 ng/µl erreicht. Die RNA der DN-Thymozyten wurde in 14 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Dabei wurden Konzentrationen von 25 - 90 ng/µl erreicht. Die RNA der peripheren Thymozyten wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Dabei wurden Konzentrationen von 63 - 147 ng/µl erreicht. Die Konzentration und Reinheit wurden bei jeder Probe photometrisch durch Absorptionsmessung bei $\lambda = 260$ nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, und $\lambda = 280$ nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, bestimmt. Dabei wurde der Quotient A260 nm zu A280 nm zur Bestimmung der Reinheit R herangezogen. Es wurden nur Proben mit einer Reinheit R größer 1,7 bzw. bei peripheren T-Zellen R größer 1,6 eingesetzt. Die RNA von Gesamthymozyten und DN-Thymozyten wurde pro Genotyp von jeweils 2 Mäusen, bei peripheren T-Zellen von jeweils 4 Mäusen und bei DP-Zellen von jeweils 8 Mäusen freundlicherweise vom ehemaligen Doktoranden der Arbeitsgruppe Daniel Schäll bzw. von der Doktorandin Isabel Kloos zur Verfügung gestellt.

2.5.2 Reverse Transkription der RNA

Die cDNA-Umschreibung erfolgte mit dem „*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*“ und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Sowohl bei Thymozyten als auch bei peripheren T-Zellen wurden 2 µg umgeschrieben und damit eine cDNA-Konzentration von 20 ng/µl erreicht. Bei DN- und DP-Thymozyten konnten aufgrund von kleinen RNA-Mengen nur 500 ng umgeschrieben und mit einer cDNA-Konzentration von 2 ng/µl weitergearbeitet werden.

2.5.3 Quantitative PCR

Zur Amplifizierung der cDNA bzw. der zu untersuchenden Gene wurde zu den Proben ein Mastermix mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green und den jeweiligen Primern (Tab. 5) hinzugegeben (pro Probe: 1,5 µl RNase freies H₂O; 5 µl 2x SYBR Green; je 0,4 µl Primer; 2,5 µl cDNA). SYBR-Green wurde zur

Detektion der amplifizierten Genprodukte eingesetzt. Als Referenzgen wurde β -Aktin verwendet. Als Kalibrator wurde ein internes cDNA-Gemisch verwendet, welches auf jede qPCR-Platte aufgetragen wurde und damit den Vergleich der Platten untereinander ermöglichte. Als Negativkontrolle wurde jeder Primer mit H₂O getestet. In diesen Proben war keine Amplifikation nachweisbar. Pro Probe wurden 2,5 μ l cDNA (entspricht bei Thymozyten und periphere T-Zellen 50 ng cDNA bzw. bei DN und DP 5 ng) eingesetzt. Die Amplifizierung der cDNA erfolgte in 45 Zyklen mittels Light Cyclers (Tab. 6).

Tabelle 5: RNA-Primer.

	Right bzw. forward	Left bzw. reverse
p53	5'- tta ttg agg gga gga gag tac g -3'	5'- gca act atg gct tcc acc tg -3'
CHK1	5'- ttg ttc agg cat ccc tat gtc -3'	5'- gag gga agg cca tat cca gt -3'
CHK2	5'- cta aca gtt tct tga caa ggt cca -3'	5'- tta ttc ctg aag tct gga cag atg -3'
ATR	5'- aac aat aag cgc ctg gtg aa -3'	5'- tgg aga gtc acg act tgc tg -3'
ATM	5'- ttt cat gga ttc ata agc acct t -3'	5'- tgc aga ttt ata tcc atc atc cac -3'
CDC25c	5'- gga aac acc cgg atc tga a -3'	5'- act ttc cag aca gca aag cag -3'
SOCS1	5'- cga aga cga gga cga gga -3'	5'- cag ccg aca atg cga tct -3'
p21	5'-gga cat cac cag gat tgg ac-3'	5'-tcc aca gcg ata tcc aga ca-3'
β - Aktin	5'- aag gcc aac cgt gaa aag at -3'	5'- gtg gta cga cca gag gca tac -3'

Tabelle 6: Programm Light Cyclers.

Temperatur	Zeit
98°C	5 min
98°C / 60°C / 72°C	45 Zyklen; je 10 sek
72°C	5 min

2.6 Nachweis auf Proteinebene

2.6.1 Western Blot

2.6.1.1 Proteinlyse

Nach Organpräparation wurden die Zellen gezählt und in 10 μ l NP40-Lysepuffer (50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% (v/v) NP40; 10%

Proteaseinhibitor Stocklösung) pro 1×10^6 Zellen resuspendiert. Bei DN-Thymozyten wurden Zellen von 2 Mäusen des gleichen Genotyps und Alters gepoolt. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4°C und $15000 \times g$ abzentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand wurde nach der Proteinbestimmung mit H_2O auf eine Konzentration von $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ gebracht. Durch Erhitzen bei 95°C für 10 Minuten und Zugabe eines reduzierenden Puffers (modifiziert nach Lämmli) wurden die Proteine denaturiert und stabilisiert.

2.6.1.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte bei Thymozyten mittels Lowry-Test entsprechend der Herstelleranleitung. Es wurden Konzentrationen von ca. $0,7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ erreicht. Bei DN-Thymozyten wurde aufgrund von sehr geringen Lysatmengen auf eine Proteinbestimmung verzichtet.

2.6.1.3 Gelelektrophorese

Um sowohl kleine Proteine mit 23 kDa als auch große Proteine mit 350 kDa auf einer Membran detektieren zu können, wurden für die Elektrophorese der Proteine aus Thymozyten 4-15%-ige Gradientengele genutzt. Die Taschen wurden mit ca. $35 \mu\text{l}$ Lysat befüllt. Dies entspricht $16 \mu\text{g}$ Protein bzw. $2,6 \times 10^6$ Zellen pro Tasche. Für die Elektrophorese der Proteine aus DN-Thymozyten wurden 4-20%-ige-Gradientengele genutzt, wobei $10 \mu\text{l}$ in die Taschen pipettiert wurden. Dies entspricht $0,75 \times 10^6$ Zellen pro Tasche. Es wurden immer gleich viele Proben pro Genotyp auf ein Gel aufgetragen, um eine bessere Vergleichbarkeit der SLy1^{KO} - und SLy1^{WT} -Proben zu erhalten.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 60 Minuten bei 200 V in 1xTris-Glycin-SDS-Laufpuffer (10fach: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (v/v) SDS; pH 8,3). Anschließend wurde das Gel für 25 Minuten in Transferpuffer bei 4°C äquilibriert und mittels Nass-Blot bei 100 V für 60 Minuten mit Transferpuffer (800 ml ddH₂O; 100 ml Methanol absolut; 100 ml 10fach Tris-Glycin-Transferpuffer (Tris-Glycin-Transferpuffer: 26 mM Tris; 192 mM Glycin; pH 8,3)) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zur Kontrolle wurde nach diesem Transfer das Gel mit

Coomassie-Brillant-Blau und die Membran mit Ponceau S gefärbt. Die Membran wurde in 5%-iger Milchlösung mit TBS/T (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween20) für 1 Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungen der AK zu verhindern. Dann wurde die Membran für 5 Minuten in TBS/T gewaschen und in der jeweiligen Antikörperlösung (Tab. 7) entsprechend den Herstellerangaben über Nacht bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 1 Stunde im entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären AK bei RT inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde jeweils dreimal 10 Minuten mit TBS/T gewaschen. Die Proteine wurden mittels ECL-Reagenz detektiert. Anschließend wurde die Membran für 15 Minuten bei RT mittels *ReBlot Stripping Solution* der Firma Merck gestriipt und erneut für 1 Stunde in 5%-iger Milchlösung inkubiert, um weitere Proteine mit derselben Membran zu detektieren. Der Antikörper Anti-CHK2 konnte nach dem Strippen der Membran nicht mehr binden, weshalb für den Nachweis ein separater Blot durchgeführt wurde.

Tabelle 7: Antikörper für Western Blot.

Antikörper	Größe	Verdünnung	Sekundärer AK	Verdünnung
Anti-β-Aktin	42 kDa	1:10000	Anti-rabbit HRP-linked	1:2000
Anti-ATM	350 kDa	1:1000	Anti-rabbit HRP-linked	1:2000
Anti-ATR	300 kDa	1:1000	Anti-rabbit HRP-linked	1:2000
Anti-CHK1	56 kDa	1:1000	Anti-mouse HRP-linked	1:2000
Anti-CHK2	62 kDa	1:1000	Anti-rabbit HRP-linked	1:2000
Anti-p21 HRP linked	21 kDa	1:500-1:2000		
Anti-p53	53 kDa	1:1000	Anti-mouse HRP-linked	1:2000
Anti-SOCS1	23 kDa	1:1000	Anti-rabbit HRP-linked	1:2000

2.7 Durchflusszytometrie

2.7.1 Analyse von Lymphozyten-Populationen

Die Zellen aus SLy1-p53-Lck-Cre Mäusen wurden wie oben beschrieben aus dem Thymus, der Milz und den Lymphknoten sowie aus dem Knochenmark isoliert, gewaschen und gezählt (Kapitel 2.3). Es wurden pro Färbung 2×10^6

MATERIAL UND METHODEN

Zellen eingesetzt. Vor der eigentlichen Färbung wurden die Zellen aus Milz und Lymphknoten zunächst in einem F_c-Block (CD16/CD32) 1:50 resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungen an den F_c-Rezeptor zu verhindern. Bei Zellen aus dem Thymus wurden die Thymozyten direkt ohne F_c-Block gefärbt (Tab. 8), wobei die Thymozyten mit der Biotin-Färbung vor der eigentlichen Färbung auf Eis inkubiert wurden und nach 30 Minuten gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen aus dem Thymus (Tab. 8, Tab. 9) sowie die Zellen aus Milz und Lymphknoten (Tab. 10) mit dem entsprechenden Oberflächen-Färbemix 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen, bei 500 x g und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 200 µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen. Zudem wurden die Lichtstreuungseigenschaften der Zellen bestimmt, wobei die Lichtstreuung der Zellen *nach vorne* proportional zur Zellgröße (*forward light scatter*, FSC) und die Lichtstreuung *nach seitlich* abhängig von der intrazellulären Granularität (*side-light scatter*, SSC) ist, so dass Zellen mit einem komplexen Zytoplasma höhere SSC-Werte zeigen (Stetler-Stevenson, 2003).

Vorgehen bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten zur Analyse der DN-, DP- und SP-Populationen: Im ersten Schritt wurde jene Population bestimmt, welche nach FSC-A- und der SSC-A-Werten eine klar abzugrenzende Population bildete (u.a. exklusiv des Zelldebris). Im zweiten Schritt wurde anhand von FSC-A und FSC-H alles ausgeschlossen, was sich größer als eine Einzelzelle darstellte. Im dritten Schritt wurde anhand der Oberflächenmarker CD90.2 und TZRγδ die αβ-Thymozytenpopulation bestimmt (CD90.2⁺, TZRγδ⁻). Aus dieser Thymozytenpopulation wurden FSC-A- und SSC-A-Werte ermittelt sowie die Populationen DN (CD4⁻, CD8⁻), DP (CD4⁺, CD8⁺), CD4SP (CD4⁺, CD8⁻) und CD8SP (CD4⁻, CD8⁺) bestimmt. FSC-A und SSC-A wurden aus dieser vorselektionierten Population bestimmt, um eine vergleichbare Population zu allen weiteren Daten aus diesem Versuch vorliegen zu haben.

Tabelle 8: Thymus-Färbung der Thymozyten-Entwicklungsstadien

Nachweis der relativen Verteilung der Thymozyten innerhalb der Entwicklungsstadien DN – DP – SP (mit jeweils Marker, Fluorochrom und Verdünnung)	
CD90.2 APC	1:2500
CD4 Pacific Blue	1:2500
CD8a PerCp-Cy5.5	1:500
TZRγδ PE	1:100

Vorgehen zur Analyse der DN-Subpopulationen DN1 – DN4: Schritte eins und zwei erfolgten wie oben beschrieben. Im dritten Schritt wurde die DN-Population bestimmt, indem jene Zellen ausgeschlossen wurden, welche die Oberflächenmarker CD4, CD8 oder TZRγδ exprimierten. Bei dieser Population wurden dann mittels den Oberflächenmarkern CD44 und CD25 die Subpopulationen DN1 (CD44⁺, CD25⁻), DN2 (CD44⁺, CD25⁺), DN3 (CD44⁻, CD25⁺) und DN4 (CD44⁻, CD25⁻) bestimmt.

Tabelle 9: Thymus-Färbung der DN-Entwicklungsstadien

Nachweis der relativen Verteilung der Thymozyten innerhalb der Entwicklungsstadien DN1 – DN2 – DN3 – DN4 (mit jeweils Marker, Fluorochrom und Verdünnung)	
CD90.2 APC	1:2500
CD44 V450	1:200
CD25 PE	1:200
SA PerCP-Cy5.5. mit	1:200
Bio CD4	1:1000
Bio CD8a	1:800
Bio TZRγδ	1:400

Vorgehen zur Analyse der Lymphozytenpopulationen in der Milz und im Lymphknoten: Die Schritte eins und zwei erfolgten wie oben beschrieben. Im dritten Schritt wurde mittels des Oberflächenmarkers CD19 die B-Zellpopulation und mittels CD90.2 die T-Zellpopulation bestimmt. Die T-Zellpopulation wurde weiter auf die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 untersucht.

Tabelle 10: Milz- und LN-Färbung.

Nachweis der Verteilung von B- und T-Lymphozyten sowie von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen (mit jeweils Marker, Fluorochrom und Verdünnung)	
CD90.2 APC	1:1000
CD19 V450	1:300
CD4 PE	1:200
CD8a PerCP-Cy5.5	1:100

2.8 Statistische Auswertung

Die Statistik wurde mithilfe ungepaarter zweiseitiger t-Tests, sowie einfaktorieller Varianzanalysen mit *Tukey's post-hoc* Test bzw. mit *Dunnetts post hoc* Test durchgeführt. Die jeweils angewandten Analysen sind in den entsprechenden Abbildungsbeschriftungen aufgeführt. Die Auswertung und deren graphische Darstellung erfolgte mithilfe von GraphPad Prism8. Weitere Abbildungen wurden mit Image Lab Version2, FlowJo und Power Point angefertigt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Analyse des p53-Signalwegs in Mäusen mit SLy1-Knockout

Arbeiten unserer Arbeitsgruppe mit SLy1-defizienten NK-Zellen hatten gezeigt, dass eine SLy1-Defizienz zu einer ribosomalen Instabilität in den NK-Zellen führt (Arefanian *et al.*, 2016). Diese ist ursächlich für höhere p53-Spiegel, die in diesen Zellen einen Zellzyklusstopp verursachen. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Expression von p53 die Folge einer Dysregulation in der Zelle ist, ausgelöst durch Replikationsstress oder DNA-Schäden (Hubackova *et al.*, 2020; Klusmann *et al.*, 2016). Es werden Signalkaskaden aktiviert, welche p53 auf Proteinebene akkumulieren lassen (Hubackova *et al.*, 2020; Awasthi *et al.*, 2015; Calabrese *et al.*, 2009) und die Transkription von p53 verstärken können (Bruno *et al.*, 2006). Die Kinasen ATR und ATM aktivieren die Kinasen CHK1 und CHK2 oder direkt p53. CHK1 und CHK2 können wiederum p53 phosphorylieren (Awasthi *et al.*, 2015). Beides führt zu einem Stopp im Zellzyklus und verhindert das Replizieren von dysregulierten Zellen. Das Molekül SOCS1 kann den p53-Signalweg verstärken (Calabrese *et al.*, 2009). Akkumuliertes p53 induziert die Transkription von Zielproteinen wie z.B. des CdK-Inhibitors p21 als typisches p53-Zielprotein für eine Seneszenz (Klusmann *et al.*, 2016). Dabei kann der Nachweis von erhöhten p21-mRNA-Leveln gleichzeitig als Hinweis für einen aktiven p53-Signalweg herangezogen werden (Calabrese *et al.*, 2009). Zum anderen kann die Phosphatase CDC25c bei aktiviertem p53 oder direkt bei aktiviertem CHK1 aus dem Nukleus in das Zytosol transportiert werden, wobei es in der Folge zum Zellzyklusstopp am Checkpoint G2/M kommt (Awasthi *et al.*, 2015).

Aus Voruntersuchungen mit SLy1-defizienten Mäusen war bereits bekannt gewesen, dass diese Mäuse eine reduzierte Thymozytenzahl aufweisen und p53 auf mRNA-Ebene in SLy1-defizienten Thymozyten vermehrt exprimiert wird (Isabel Kloos, 2021; Reis *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde daher im SLy1^{WT/KO}-Mausmodell der p53-Signalweg analysiert. Es wurden pro Versuch und Genotyp zwischen 3 und 10 Mäuse untersucht. Die genaue Anzahl ist jeweils in der entsprechenden Abbildungsbeschriftung angegeben.

3.1.1 Nachweis der mRNA und Proteine des p53-Signalwegs in Thymozyten von Mäusen mit SLy1-Knockout

Die mRNA-Expression von p53, ATR, ATM, CHK1, CHK2, CDC25c, SOCS1 und p21 wurden mittels qPCR analysiert. Hierfür wurden Thymozyten aus SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Mäusen gewonnen, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Vergleichbarkeit der jeweiligen qPCR-Durchläufe wurde bei jeder qPCR-Messung dieselbe Kontroll-cDNA-Probe mitgemessen sowie bei jeder Probe die β -Aktin-cDNA-Menge als Referenz mitbestimmt. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige β -Aktin-cDNA-Menge normalisiert.

Ebenfalls wurden die Proteine p53, ATR, ATM, CHK1, CHK2 und SOCS1 mittels Western Blot untersucht. Die Thymozyten wurden mit einem NP-40-Lysepuffer lysiert, um Proteine aus allen Zellkompartimenten zu isolieren. Durch Erhitzen und Zugabe von einem reduzierenden Puffer wurden die Proteine denaturiert und stabilisiert. Die Proteine wurden in einem SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt und im Nass-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mittels primärer und sekundärer Antikörper wurden die jeweiligen Proteine detektiert. Als Ladekontrolle diente jeweils β -Aktin. Zur Vergleichbarkeit unter den jeweiligen Blots wurden die Proben auf einen Blot-internen WT normalisiert, wobei der Mittelwert der entsprechenden WT-Mäuse herangezogen wurde.

Zunächst konnte die bereits beschriebene reduzierte Zellzahl im Thymus SLy1-defizienter Mäuse bestätigt werden. Im Alter von 8 – 12 Wochen betrug die durchschnittliche Zellzahl des Thymus bei SLy1^{WT}-Mäusen $184,9 \times 10^6$ Zellen und beim Thymus von SLy1^{KO}-Mäusen $119,8 \times 10^6$ Zellen (Tab. 11). Die Zellzahl war demnach bei SLy1^{KO} signifikant um 35,6 % reduziert.

Tabelle 11: Durchschnittliche Zellzahl im Thymus von SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Mäusen.

Die Daten geben die Zellzahl von SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Mäusen im Alter von 8 – 12 Wochen an. Es sind die Mittelwerte der Zellzahl in $\times 10^6$ nach Genotyp mit SEM und n-Anzahl angegeben. Signifikanz mit p-Wert und ***p $\leq 0,001$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

SLy1 ^{WT} \pm SEM (n)	SLy1 ^{KO} \pm SEM (n)	p-Wert	Signifikanz
184,9 \pm 13,29 (n = 22)	119,8 \pm 10,39 (n = 25)	0,0003	***

ERGEBNISSE

Des Weiteren konnte die erhöhte Expression von p53 auf mRNA-Ebene in Thymozyten bestätigt werden. In Thymozyten von SLy1^{KO}-Mäusen war die mRNA von p53 signifikant um den Faktor 1,3 im Vergleich zu Thymozyten von SLy1^{WT}-Mäusen erhöht (Abb. 6A, Tab. 12). Diese Erhöhung fand sich auch auf Proteinebene wieder. Hier lag p53 um den Faktor 1,4 signifikant erhöht vor (Abb. 6B/C, Tab. 13).

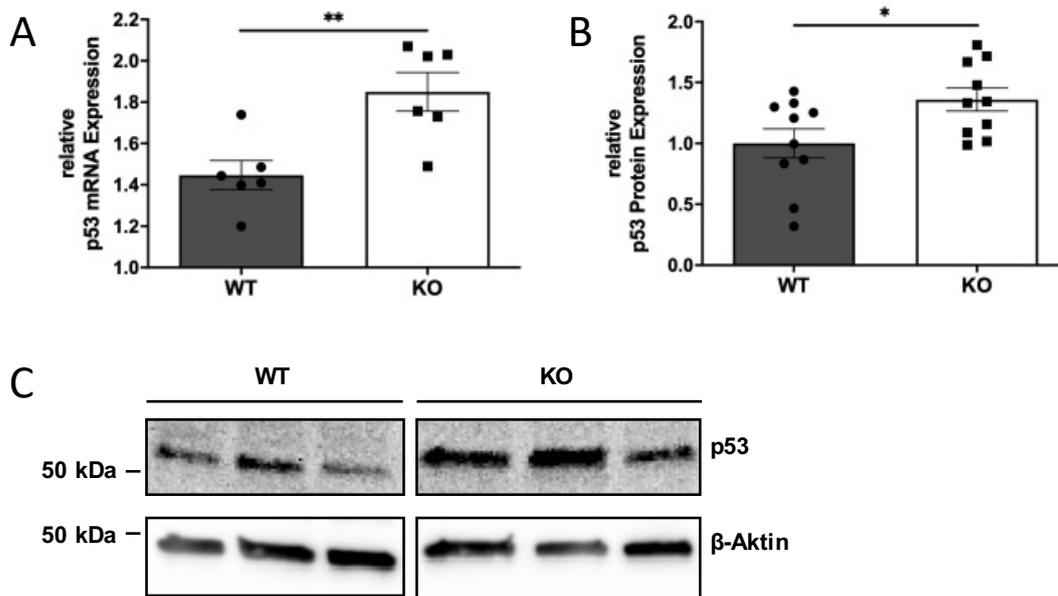


Abbildung 6: Expressionsanalyse von p53 in Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

A. Relative p53 mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Mäusen. $**p \leq 0,01$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. **B.** Quantitative Western Blot Auswertung von p53 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Werte sind auf β -Aktin normalisiert und auf einen Blot-internen WT normiert. Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM von $n = 10$ Mäusen. $*p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. **C.** Repräsentativer Western Blot von p53. β -Aktin diene als Ladekontrolle. Belichtungszeit für p53 120 sek, für β -Aktin 10 sek. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

ERGEBNISSE

Die Kinasen ATR und ATM stehen zu Beginn der Signalkaskaden, welche durch eine Dysregulation der Zelle bzw. Zellstress angestoßen werden. Durch Phosphorylierung der Kinasen CHK1 und CHK2 können sie das Signal für einen Zellschaden weitergeben oder direkt p53 phosphorylieren (Hubackova *et al.*, 2020; Awasthi *et al.*, 2015). Die mRNA von ATR in SLy1^{KO}-Thymozyten war um 1,4 signifikant erhöht (Abb. 7A, Tab. 12). Das Protein ATR war um den Faktor 1,6 signifikant erhöht (Abb. 7B/C, Tab. 13).

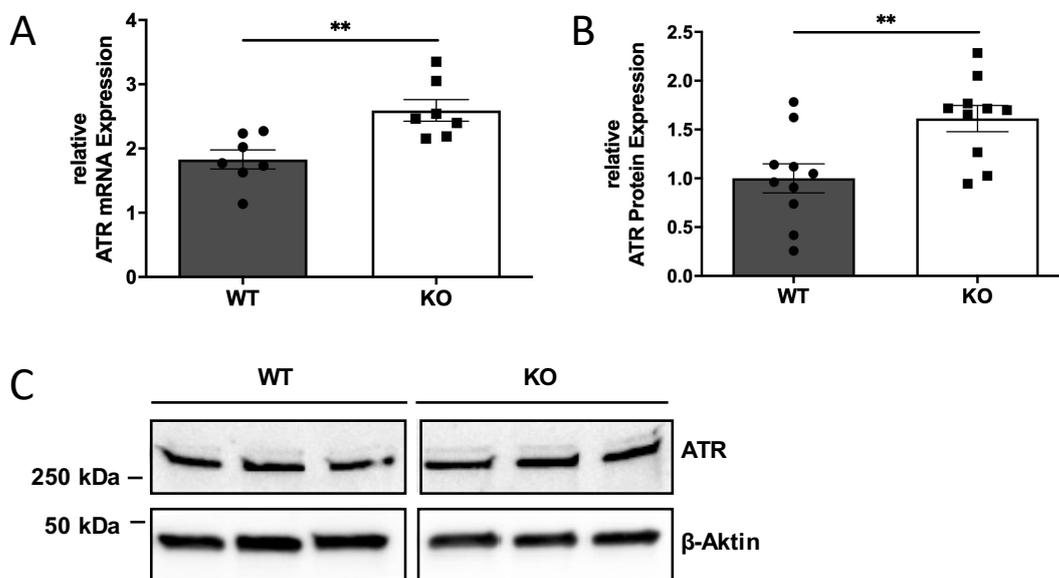


Abbildung 7: Expressionsanalyse von ATR in Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

A. Relative ATR mRNA-Expression von SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β-Aktin und Mittelwerte ± SEM von n = 7 Mäusen. **p ≤ 0,01 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. **B.** Quantitative Western Blot Auswertung von ATR in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Werte sind auf β-Aktin normalisiert und auf einen Blot-internen WT normiert. Graph zeigt Mittelwerte ± SEM von n = 10 Mäusen. **p ≤ 0,01 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. **C.** Repräsentativer Western Blot von ATR. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Belichtungszeit für ATR 60 sek, für β-Aktin 10 sek. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

ERGEBNISSE

Die Analyse der mRNA von ATM zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung um den Faktor 1,6 in SLy1^{KO}-Thymozyten (Abb. 8A, Tab. 12) sowie eine signifikante Erhöhung des Proteins um den Faktor 1,4 (Abb. 8B/C, Tab. 13).

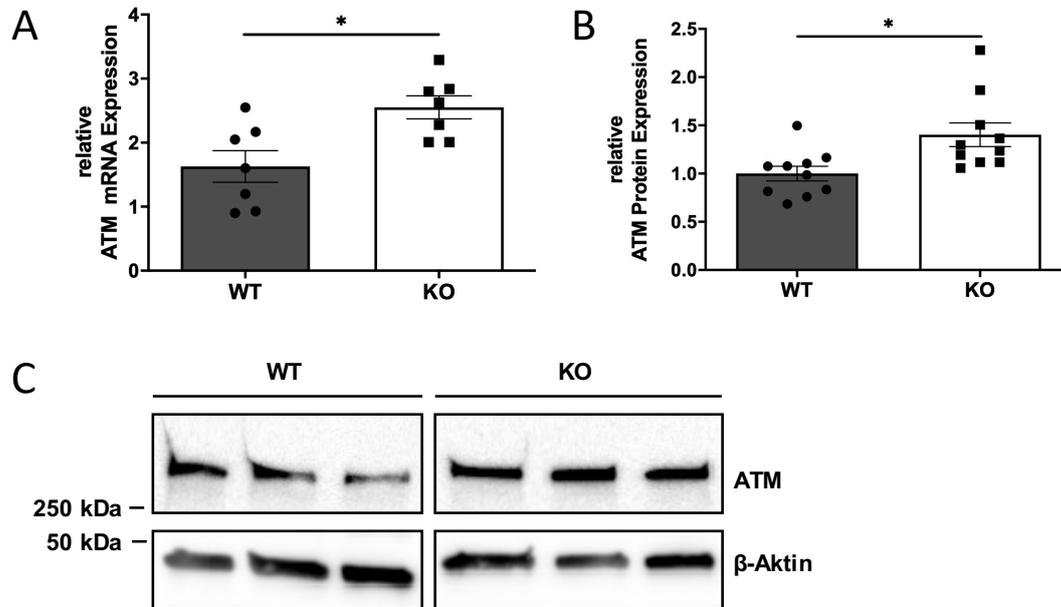


Abbildung 8: Expressionsanalyse von ATM in Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

A. Relative ATM mRNA-Expression von SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 7$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. **B.** Quantitative Western Blot Auswertung von ATM in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Werte sind auf β -Aktin normalisiert und auf einen Blot-internen WT normiert. Graph zeigt Mittelwerte \pm SEM von $n = 10$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. **C.** Repräsentativer Western Blot von ATM. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Belichtungszeit für ATM 10 sek, für β -Aktin 10 sek. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

ERGEBNISSE

Die Kinasen CHK1 und CHK2 können über zwei Wege zu einem Zellzyklusstopp führen. Zum einen phosphorylieren und stabilisieren sie p53. Zum anderen kann CHK1 u.a. auch die Phosphatase CDC25c phosphorylieren und damit eine Aktivierung von CdKs und das Fortschreiten des Zellzyklus verhindern (Hubackova *et al.*, 2020; Awasthi *et al.*, 2015). Die mRNA von CHK1 war in SLy1^{KO}-Thymozyten signifikant um 1,4 erhöht (Abb. 9A, Tab. 12). Das Protein CHK1 war um den Faktor 1,8 im Vergleich zu SLy1^{WT}-Thymozyten signifikant erhöht (Abb. 9B/C, Tab. 13).

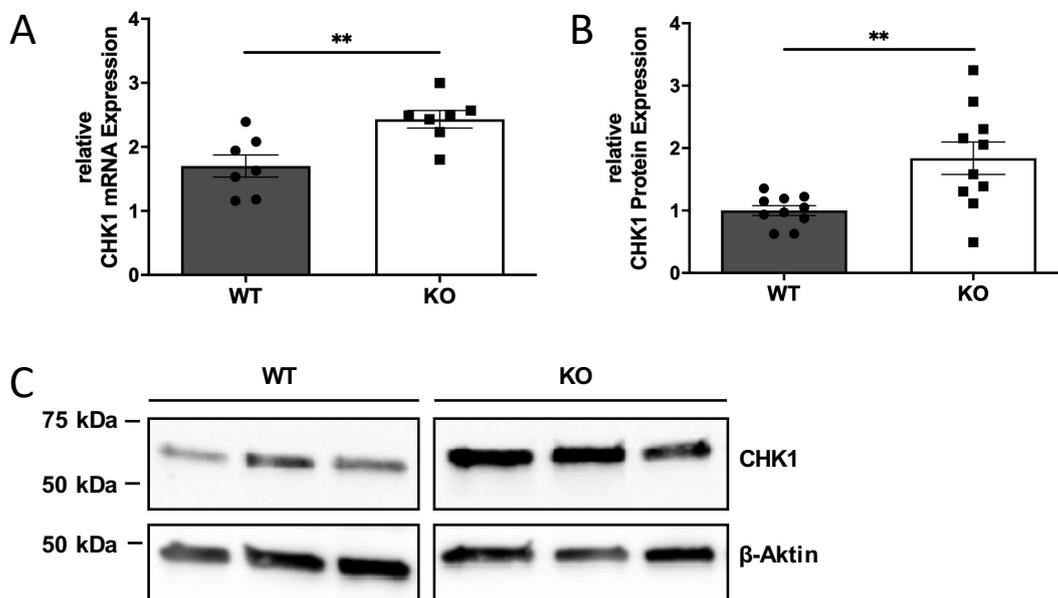


Abbildung 9: Expressionsanalyse von CHK1 in Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

A. Relative CHK1 mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β-Aktin und Mittelwerte ± SEM von n = 7 Mäusen. **p ≤ 0,01 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. **B.** Quantitative Western Blot Auswertung von CHK1 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Werte auf β-Aktin normalisiert und auf einen Blot-internen WT normiert. Graph zeigt Mittelwerte ± SEM von n = 10 Mäusen. **p ≤ 0,01 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. **C.** Repräsentativer Western Blot von CHK1. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Belichtungszeit für CHK1 120 sek, für β-Aktin 10 sek. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

ERGEBNISSE

Bei der Kinase CHK2 war keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression zu erkennen (Abb. 10A, Tab. 12). Auf Proteinebene fand sich eine durchschnittliche Erhöhung der CHK2-Level in SLy1^{KO}-Thymozyten um den Faktor 1,58. Diese war jedoch nicht signifikant (Abb. 10B/C, Tab. 13).

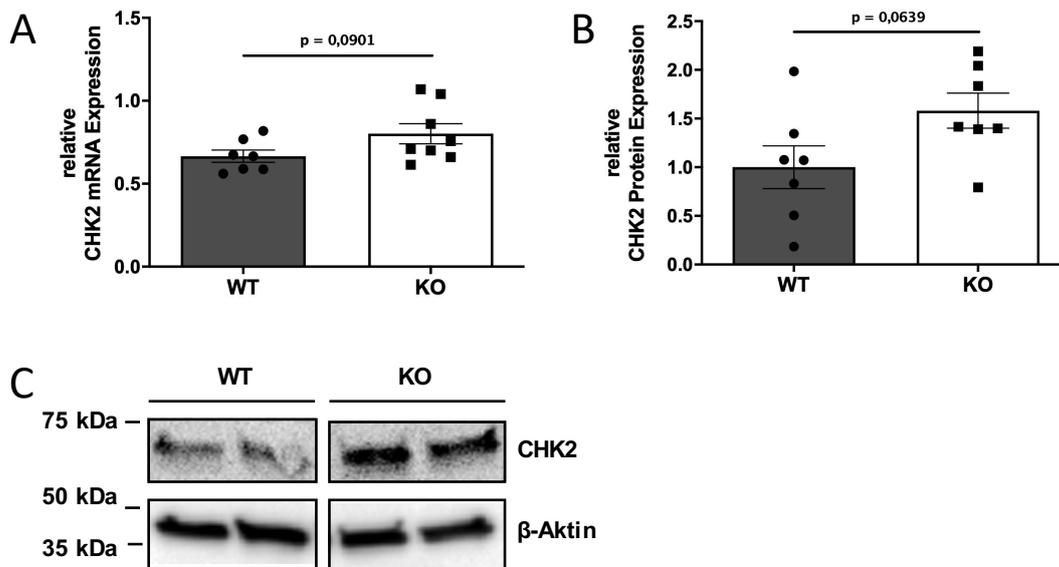


Abbildung 10: Expressionsanalyse von CHK2 in Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

A. Relative CHK2 mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 7$ WT- und 8 KO-Mäusen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test. **B.** Quantitative Western Blot Auswertung von CHK2 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Werte auf β -Aktin normalisiert und auf einen Blot-internen WT normiert. Graph zeigt Mittelwerte \pm SEM von $n = 7$ Mäusen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test. **C.** Repräsentativer Western Blot von CHK2. β -Aktin diene als Ladekontrolle. Belichtungszeit für CHK2 30 sek (Berechnung) bzw. 120 sek (Darstellung), für β -Aktin 10 sek. Die Abbildung ist repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

ERGEBNISSE

Für CDC25c konnte bei einer SLy1-Defizienz keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression festgestellt werden (Abb. 11, Tab. 12).

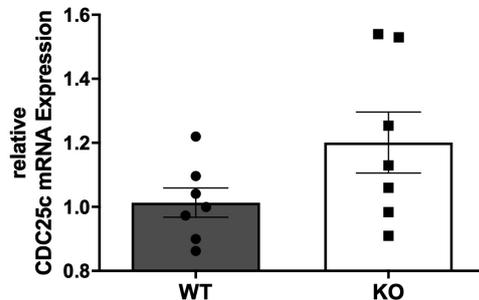


Abbildung 11: Expressionsanalyse von CDC25c in Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative CDC25c mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von n = 7 Mäusen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test.

Weiter stellte sich die Frage, ob der p53-Signalweg bei einer SLy1-Defizienz aktiv ist, wobei erhöhte Transkriptionslevel von p53-Zielgenen als Nachweis herangezogen werden können (Klusmann *et al.*, 2016). Daher wurde die Transkription des CdK-Inhibitors p21 untersucht. p21 initiiert nach Aktivierung durch p53 als Transkriptionsfaktor einen Zellzyklusarrest bzw. Seneszenz (Klusmann *et al.*, 2016). Dieses Molekül zeigte in SLy1^{KO}-Thymozyten eine signifikante Verdopplung der mRNA (Abb. 12, Tab. 12). Da mit dem eingesetzten Antikörper keine spezifischen Banden detektiert werden konnten, musste von einer Proteinanalyse von p21 abgesehen werden.

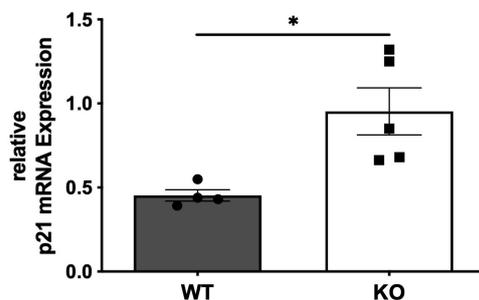


Abbildung 12: Expressionsanalyse von p21 in Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative p21 mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Graph zeigt Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von n = 4 WT- und n = 5 KO-Mäusen. *p \leq 0,05 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

ERGEBNISSE

Der Zytokininhibitor SOCS1 kann im Nukleus die Wirkung der Kinasen ATM und ATR im p53-Signalweg verstärken (Calabrese *et al.*, 2009). Es konnte eine Erhöhung von SOCS1 auf mRNA-Ebene um den Faktor 1,5 festgestellt werden (Abb. 13, Tab. 12). Da die Proteinmengen so gering waren, dass aussagekräftige Banden weder bei SLy1^{WT}- noch bei SLy1^{KO}-Thymozyten detektiert werden konnten, musste auch hier von einer Auswertung der Proteinexpression abgesehen werden.

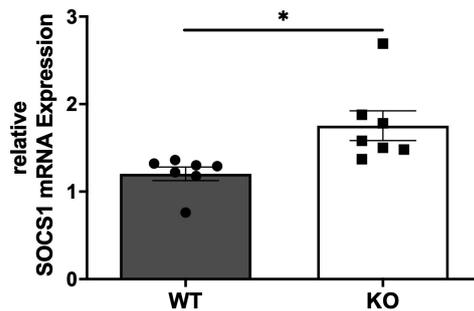


Abbildung 13: Expressionsanalyse von SOCS1 in Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative SOCS1 mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten. Graph zeigt Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 7$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

ERGEBNISSE

Tabelle 12: Relative Erhöhung der mRNA-Expression des p53-Signalwegs und von SOCS1 in Thymozyten von SLy1^{KO}-Mäusen.

Die Tabelle zeigt die durchschnittliche relative Erhöhung der jeweiligen mRNA-Expression in SLy1^{KO}-Thymozyten im Vergleich zu SLy1^{WT}-Thymozyten, berechnet als Quotient aus den jeweiligen Mittelwerten der relativen mRNA-Expressionen in SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten. Die Mittelwerte der relativen mRNA-Expressionen (relativ zu β -Aktin) sind mit SEM und n-Anzahl angegeben. Signifikanz mit einzelnen p-Werten und *p \leq 0,05 bzw. **p \leq 0,01 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

mRNA	relative Erhöhung	SLy1 ^{WT} \pm SEM (n)	SLy1 ^{KO} \pm SEM (n)	p-Wert	Signifikanz
p53	1,28	1,446 \pm 0,07 (n = 6)	1,850 \pm 0,09 (n = 6)	0,0064	**
ATR	1,42	1,829 \pm 0,15 (n = 7)	2,593 \pm 0,17 (n = 7)	0,0053	**
ATM	1,57	1,628 \pm 0,25 (n = 7)	2,551 \pm 0,18 (n = 7)	0,0104	*
CHK1	1,43	1,701 \pm 0,17 (n = 7)	2,431 \pm 0,14 (n = 7)	0,0064	**
CHK2	1,20	0,666 \pm 0,04 (n = 7)	0,801 \pm 0,06 (n = 8)	0,0901	ns
CDC25c	1,19	1,013 \pm 0,05 (n = 7)	1,201 \pm 0,10 (n = 7)	0,1012	ns
p21	2,10	0,453 \pm 0,03 (n = 4)	0,953 \pm 0,14 (n = 5)	0,0175	*
SOCS1	1,46	1,204 \pm 0,08 (n = 7)	1,754 \pm 0,17 (n = 7)	0,0122	*

Tabelle 13: Relative Erhöhung der Proteinexpression der Kinasen des p53-Signalwegs in Thymozyten von SLy1^{KO}-Mäusen.

Die Tabelle zeigt die relative Proteinexpression in SLy1^{KO}-Thymozyten im Vergleich zu SLy1^{WT}-Thymozyten. Die einzelnen Werte wurden auf β -Aktin normalisiert. Zur Vergleichbarkeit unter den jeweiligen Blots wurden die Proben dann auf einen Blot-internen WT normalisiert. Die relativen Proteinexpressionen in SLy1^{KO} sind jeweils als Quotient aus den relativen Proteinexpressionen in SLy1^{KO} und den jeweiligen Blot-internen WT berechnet. Angegeben sind davon die jeweiligen Mittelwerte mit SEM und n-Anzahl.

Protein	relative Expression in SLy1 ^{KO} \pm SEM (n)
p53	1,360 \pm 0,10 (n = 10)
ATR	1,613 \pm 0,13 (n = 10)
ATM	1,404 \pm 0,12 (n = 10)
CHK1	1,839 \pm 0,26 (n = 10)
CHK2	1,581 \pm 0,18 (n = 7)

3.1.2 Expression der mRNA des p53-Signalwegs und SOCS1 in der T-Zell-Entwicklung

Da aus vorangegangenen Arbeiten eine Verschiebung der Entwicklungspopulationen bei SLy1^{KO}-Thymozyten bekannt gewesen war (Reis *et al.*, 2009), wurde die erhöhte Expression in Thymozyten detaillierter untersucht. Es wurden die verschiedenen Entwicklungspopulationen DN und DP, sowie periphere T-Zellen auf die mRNA-Expression von p53, ATR, ATM, CHK1, CHK2, p21, CDC25c und SOCS1 analysiert und die Expression zwischen den Genotypen SLy1^{WT} und SLy1^{KO} erneut verglichen.

Um die mRNA-Expressionslevel der einzelnen Zellpopulationen einordnen zu können, wurden zunächst die Expressionslevel aller Populationen der SLy1^{WT}-Mäuse verglichen, wobei eine einfaktorielle Varianzanalyse mit *Tukey's post-hoc* Test angewendet wurde.

Die mRNA-Expression von p53 war v.a. im DN-Thymozytenstadium deutlich erhöht. Eine signifikante Erhöhung zeigte sich innerhalb der Thymozytenentwicklung von DN-Thymozyten gegenüber DP-Thymozyten als auch von DN-Thymozyten gegenüber T-Zellen der Milz (Abb. 14).

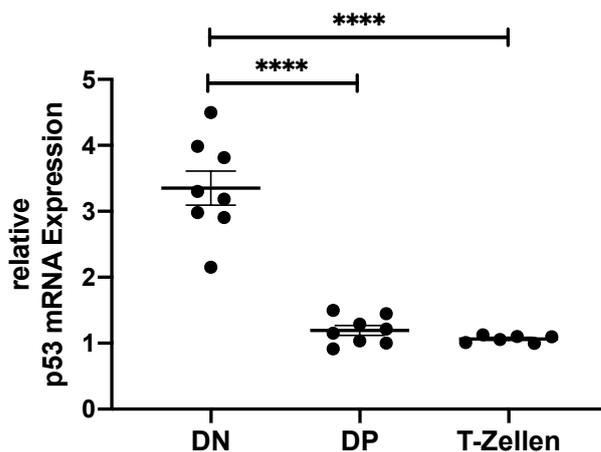


Abbildung 14: Relative Expression von p53 in der T-Zell-Entwicklung.

Relative Expression der p53-mRNA in DN, DP und T-Zellen von SLy1^{WT}-Mäusen im Alter von 8 - 12 Wochen. Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von n = 6 - 8 Mäusen. p**** \leq 0,0001 bei einfaktorieller Varianzanalyse mit *Tukey's post-hoc* Test.

ERGEBNISSE

Die Kinasen ATR, ATM sowie CHK1 und CHK2 zeigten analog zu p53 eine Erhöhung der mRNA im DN-Thymozytenstadium. Die DN-Thymozyten zeigten bei allen Kinasen signifikant höhere mRNA-Level im Vergleich zu DP-Thymozyten als auch zu T-Zellen (Abb. 15).

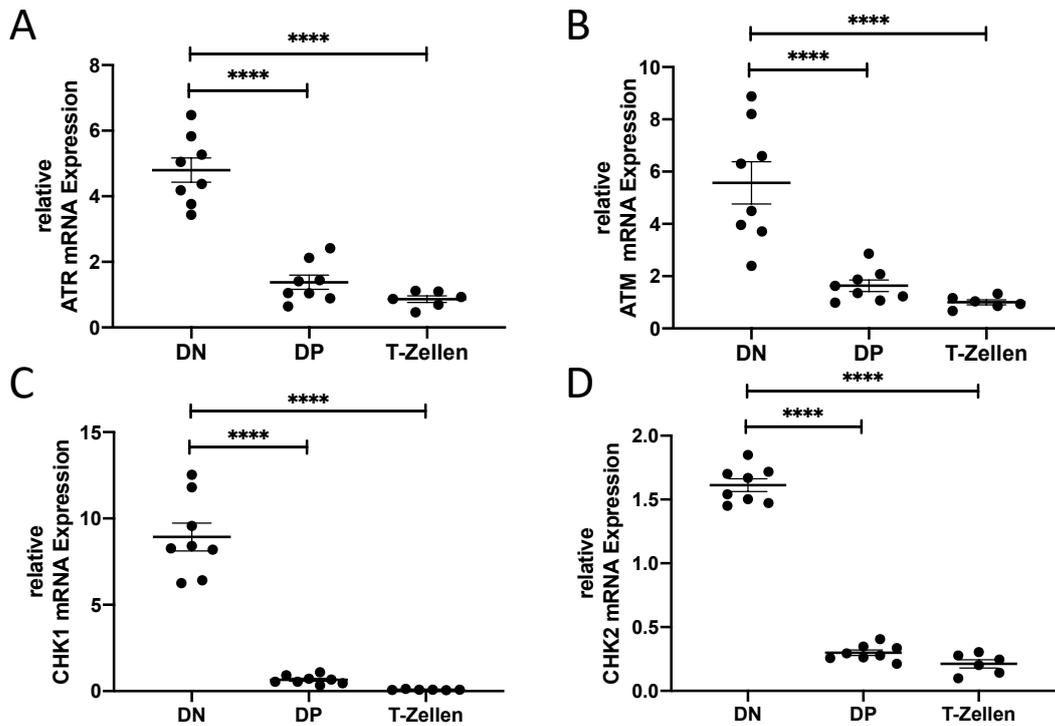


Abbildung 15: Relative Expression der Moleküle des p53-Signalwegs in der T-Zell-Entwicklung.

Relative Expression der mRNA von **A.** ATR, **B.** ATM, **C.** CHK1, sowie **D.** CHK2 in DN, DP und T-Zellen von SLy1^{WT}-Mäusen im Alter von 8 - 12 Wochen. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von n = 6 - 8 Mäusen. p**** \leq 0,0001 bei einfaktorieller Varianzanalyse mit *Tukey's post-hoc* Test.

ERGEBNISSE

Auch die mRNA der Proteine CDC25c, p21 sowie SOCS1 zeigten die oben beschriebenen Unterschiede zwischen den einzelnen Thymozytenstadien und T-Zellen (Abb. 16). Die stärkste Expression von CDC25c und p21 fand sich im DN-Stadium (Abb. 16A/B). Der Zytokininhibitor SOCS1 war hingegen in den DP-Zellen am stärksten exprimiert und zeigte zudem signifikant höhere Expressionslevel in DP- sowie DN-Thymozyten im Vergleich zu T-Zellen der Milz (Abb. 16C).

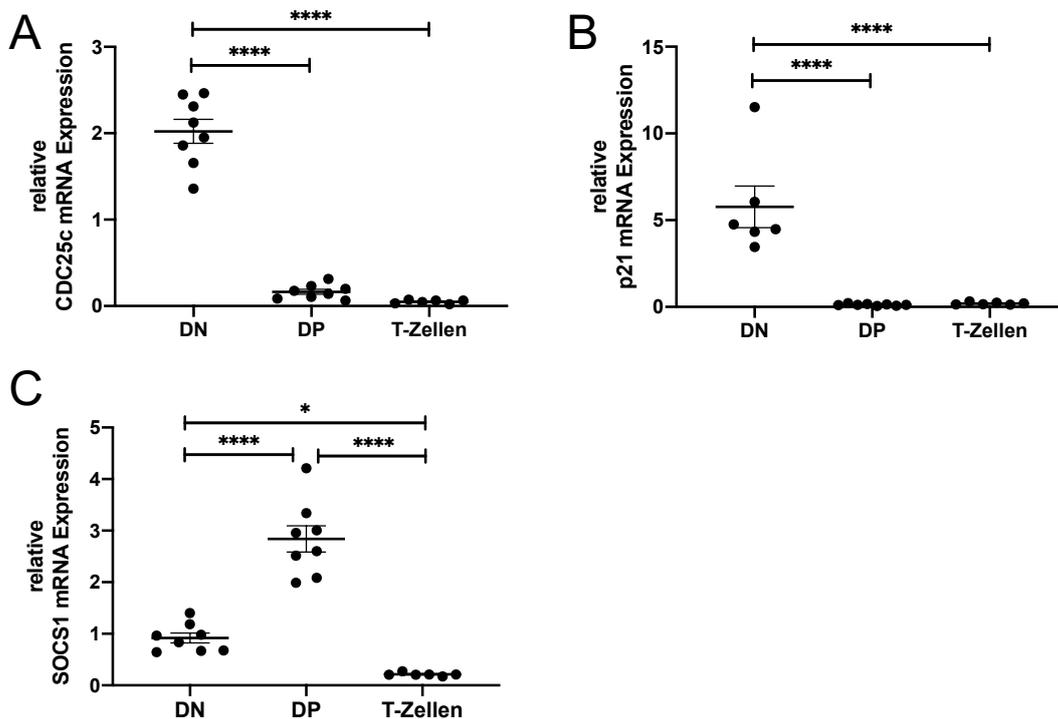


Abbildung 16: Relative Expression von CDC25c, p21 und SOCS1 in der T-Zell-Entwicklung.

Relative Expression der mRNA von **A.** CDC25c, **B.** p21 und **C.** SOCS1 in DN, DP und T-Zellen von SLy1^{WT}-Mäusen im Alter von 8 - 12 Wochen. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von n = 6 - 8 Mäusen. $p^{****} \leq 0,0001$ und $p^* \leq 0,05$ bei einfaktorierter Varianzanalyse mit *Tukey's post-hoc* Test.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei WT-Mäusen die mRNA des p53-Signalwegs, der Effektorproteine CDC25c und p21 als auch des Zytokininhibitors SOCS1 in der Thymozytenentwicklung stärker exprimiert werden als in peripheren T-Zellen. Im DN-Stadium ist die Expression besonders prominent mit Ausnahme von SOCS1, welches v.a. im DP-Stadium eine wichtige Rolle spielt.

3.1.3 Nachweis der mRNA und Proteine des p53-Signalwegs in DN-Thymozyten von Mäusen mit SLy1-Knockout

Das DN-Stadium ist das erste Entwicklungsstadium der Thymozyten im Thymus. Der Anteil der DN liegt laut vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe in SLy1^{WT}-Mäusen bei 3,46% und in SLy1^{KO}-Mäusen bei 6,56% der Thymozyten (Reis *et al.*, 2009). Zur Analyse der mRNA und der Proteine aus DN-Zellen wurden jeweils Thymozyten aus ca. 8 Wochen alten SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Mäusen gewonnen und diese mittels MACS isoliert. Anschließend wurde für die qPCR die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben bzw. für den Western Blot die Zellen lysiert. Aufgrund der geringen Zellzahl wurden zur Proteingewinnung die Zellen von jeweils 2 Mäusen des gleichen Genotyps und Alters gepoolt. Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend den Gesamthymozyten (Kapitel 3.1.1). Zur Vergleichbarkeit unter den jeweiligen Blots wurden die Proben auf einen gemeinsamen WT normiert. Hierfür wurde der Durchschnitt Blot-übergreifend von allen WT-Mäusen herangezogen.

ERGEBNISSE

Im DN-Entwicklungsstadium war die Expression von p53 weder auf mRNA- noch auf Proteinebene bei einer SLy1-Defizienz verändert (Abb. 17).

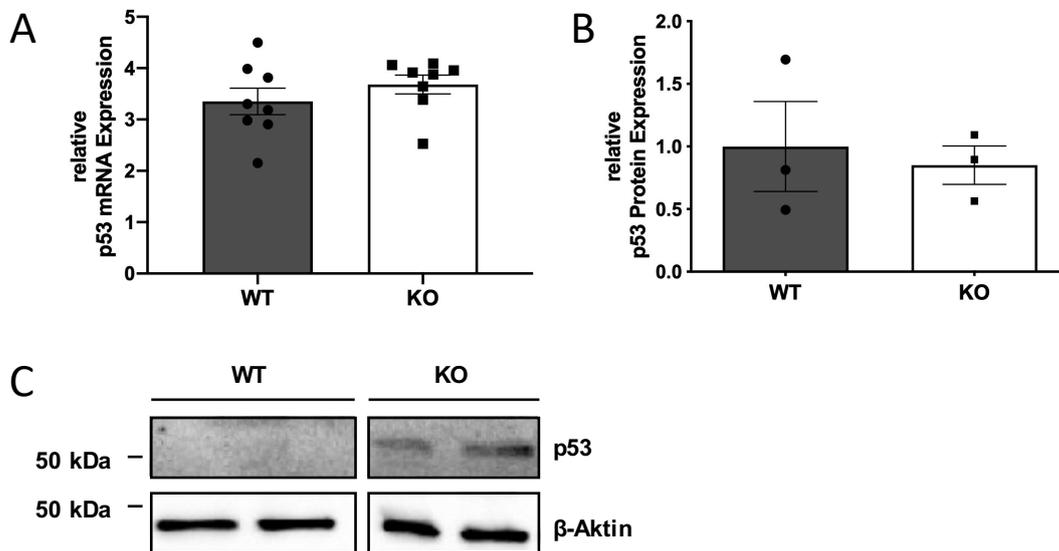


Abbildung 17: Expressionsanalyse von p53 in DN-Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

A. Relative p53 mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten. Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ Mäusen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test. **B.** Quantitative Western Blot Auswertung von p53 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten. Werte sind auf β -Aktin normalisiert und auf einen WT normiert. Graph zeigt Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ (aus je 2 Proben gepoolt). Ungepaarter zweiseitiger t-Test. **C.** Western Blot von p53. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Belichtungszeit für p53 200 sek, für β -Aktin 10 sek.

ERGEBNISSE

Die Kinasen ATR und ATM waren auf mRNA-Ebene unverändert (Abb. 18A/B). Auf Proteinebene konnte bei ATR durchschnittlich ein 5,2-fach verstärktes Vorliegen nachgewiesen werden (Abb. 18C/E). Bei ATM zeigte sich eine signifikante Erhöhung um den Faktor 2,9 (Abb. 18D/F).

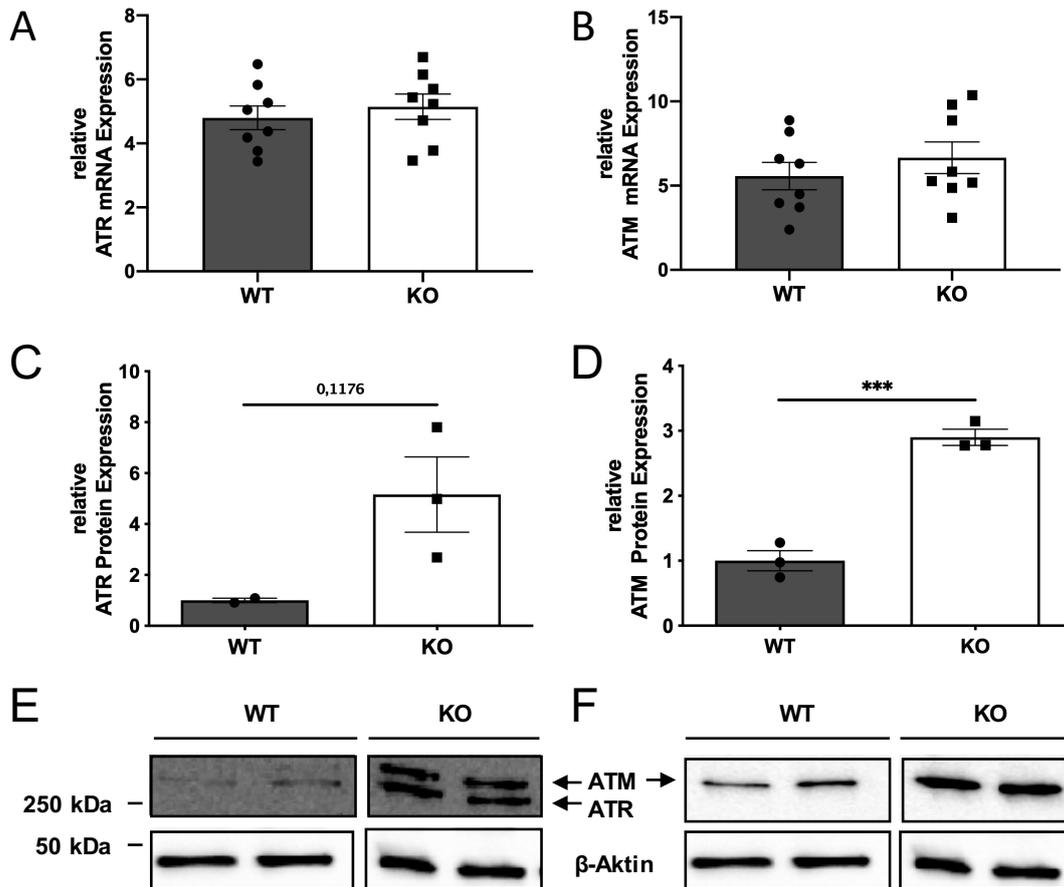


Abbildung 18: Expressionsanalyse von ATR und ATM in DN-Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative mRNA-Expression von **A.** ATR und **B.** ATM in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ Mäusen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test. Quantitative Western Blot Auswertung von **C.** ATR und **D.** ATM in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten. Werte sind jeweils auf β -Aktin normalisiert und je auf ihren WT normiert. Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM von $n = 2 - 3$ (aus je 2 Proben gepoolt). $p^{***} \leq 0,001$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. Western Blot von **E.** ATR und **F.** ATM. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Belichtungszeit für ATR 120 sek, ATM 10 sek und für β -Aktin 10 sek.

ERGEBNISSE

Die Kinasen CHK1 und CHK2 zeigten bei SLy1-Defizienz ebenfalls keine Unterschiede in der mRNA-Expression (Abb. 19A/B). Auf Proteinebene zeigten sich bei CHK1 signifikant erhöhte Proteinlevel um den Faktor 4,6 (Abb. 19C/E) und bei CHK2 um den Faktor 1,9 (Abb. 19D/F).

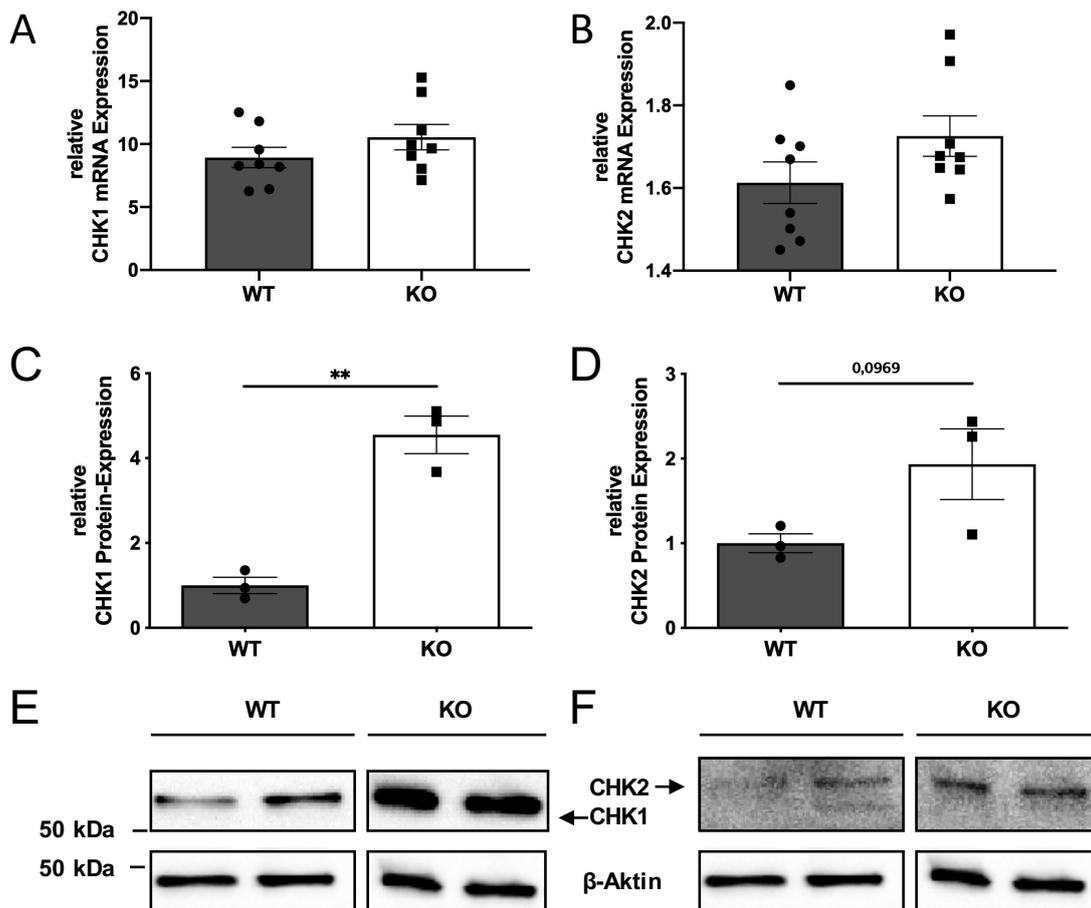


Abbildung 19: Expressionsanalyse von CHK1 und CHK2 in DN-Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative mRNA-Expression von **A.** CHK1 und **B.** CHK2 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ Mäusen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test. Quantitative Western Blot Auswertung von **C.** CHK1 und **D.** CHK2 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten. Werte sind jeweils auf β -Aktin normalisiert und je auf ihren WT normiert. Graph zeigt Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ (aus je 2 Proben gepoolt). $p^{**} \leq 0,01$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test. Western Blot von **E.** CHK1 und **F.** CHK2. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Belichtungszeit für CHK1 60 sek, CHK2 120 sek und für β -Aktin 10 sek.

ERGEBNISSE

Die Proteine CDC25c (Abb. 20A), p21 (Abb. 20B), sowie SOCS1 (Abb. 20C) wiesen keine veränderten mRNA-Expressionslevel auf. Aufgrund der gering vorhandenen Proteinmengen wurde keine Bestimmung der Proteinlevel durchgeführt.

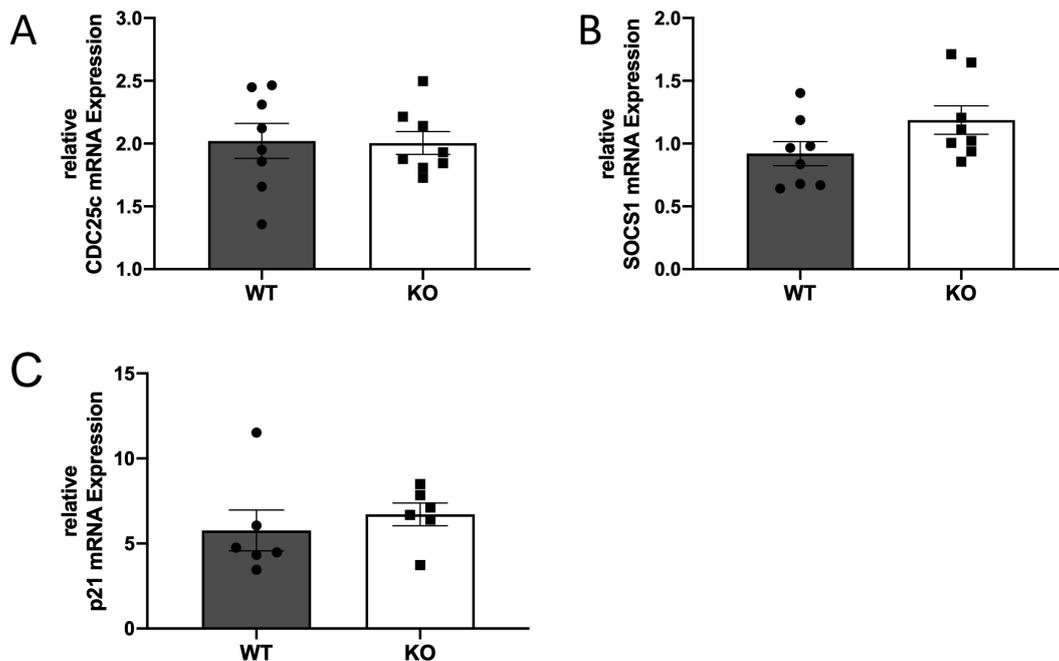


Abbildung 20: Expressionsanalyse von CDC25c, SOCS1 und p21 in DN-Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative mRNA-Expression von **A.** CDC25c, **B.** SOCS1 und **C.** p21 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von n = 6 - 8 Mäusen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test.

3.1.4 Nachweis der mRNA des p53-Signalwegs in DP-Thymozyten von Mäusen mit SLy1-Knockout

Die DN-Zellen entwickeln sich im Thymus zu DP-Zellen weiter. Der Anteil der DP beträgt laut Vorarbeiten bei SLy1^{WT}-Mäusen 84,7% und bei SLy1^{KO}-Mäusen 77,9% der Thymozyten (Reis *et al.*, 2009). Zur Analyse der mRNA von DP-Thymozyten wurde die RNA mittels *Flow Sorter* isoliert und in cDNA umgeschrieben.

ERGEBNISSE

Die erhöhte Expression von p53 auf mRNA-Ebene in Thymozyten fand sich in der Population der DP-Zellen wieder. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung von p53 in SLy1-defizienten DP-Zellen im Vergleich zu DP-Zellen von SLy1^{WT}-Mäusen um den Faktor 1,2 (Abb. 21A), wohingegen die Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 keinen Unterschied zwischen den Genotypen erkennen ließen (Abb. 21B-E).

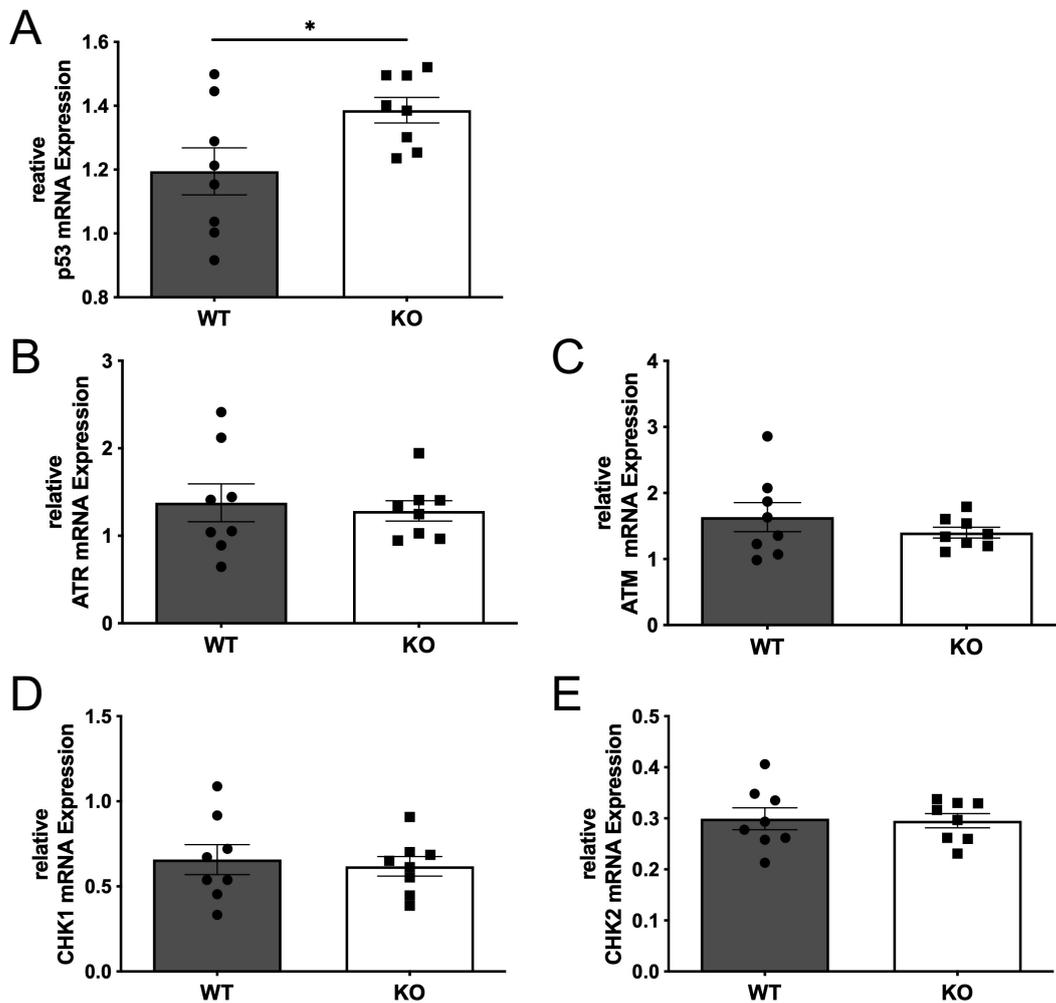


Abbildung 21: Expressionsanalyse des p53-Signalwegs in DP-Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DP-Zellen von **A.** p53, **B.** ATR, **C.** ATM, **D.** CHK1 und **E.** CHK2. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

ERGEBNISSE

Eine weitere signifikante Veränderung zeigte sich bei der Phosphatase CDC25c. Hier fand sich etwa halb so viel mRNA in SLy1^{KO}-DP-Zellen (Abb. 22A). Die mRNA von SOCS1 und p21 ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 22B/C).

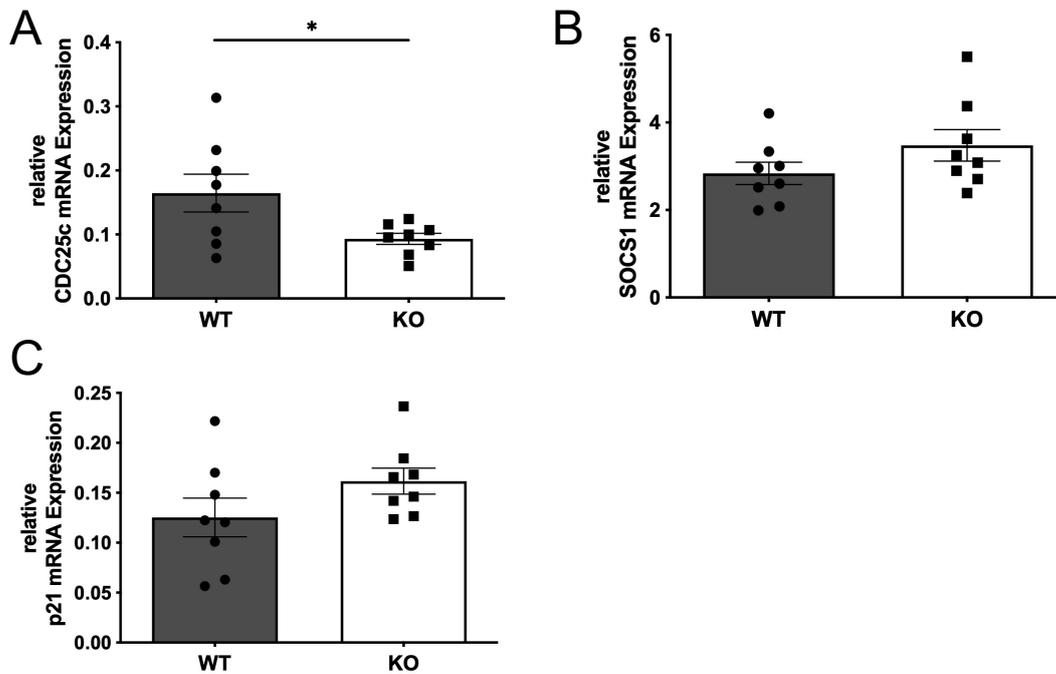


Abbildung 22: Expressionsanalyse von CDC25c, SOCS1 und p21 in DP-Thymozyten von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DP-Zellen von **A.** CDC25c, **B.** SOCS1 und **C.** p21. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

3.1.5 Nachweis der mRNA des p53-Signalwegs in peripheren T-Zellen aus der Milz von Mäusen mit SLy1-Knockout

Nach abgeschlossener Entwicklung der Thymozyten werden die reifen naiven T-Zellen in die Blutbahn abgegeben und befinden sich vermehrt in den sekundären lymphatischen Organen wie u.a. der Milz. Zur Analyse dieser Population wurden T-Zellen aus der Milz von SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Mäusen gewonnen. CD90.2-positive Zellen wurden mittels MACS aufgereinigt, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben.

ERGEBNISSE

In den peripheren SLy1^{KO}-T-Zellen lagen die p53-mRNA-Level um den Faktor 1,2 erhöht vor im Vergleich zu SLy1^{WT}-T-Zellen (Abb. 23A). Bei den Kinasen ATR und ATM sowie bei CHK1 und CHK2 ließen sich keine Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} erkennen (Abb. 23B/C, Abb. 23D/E).

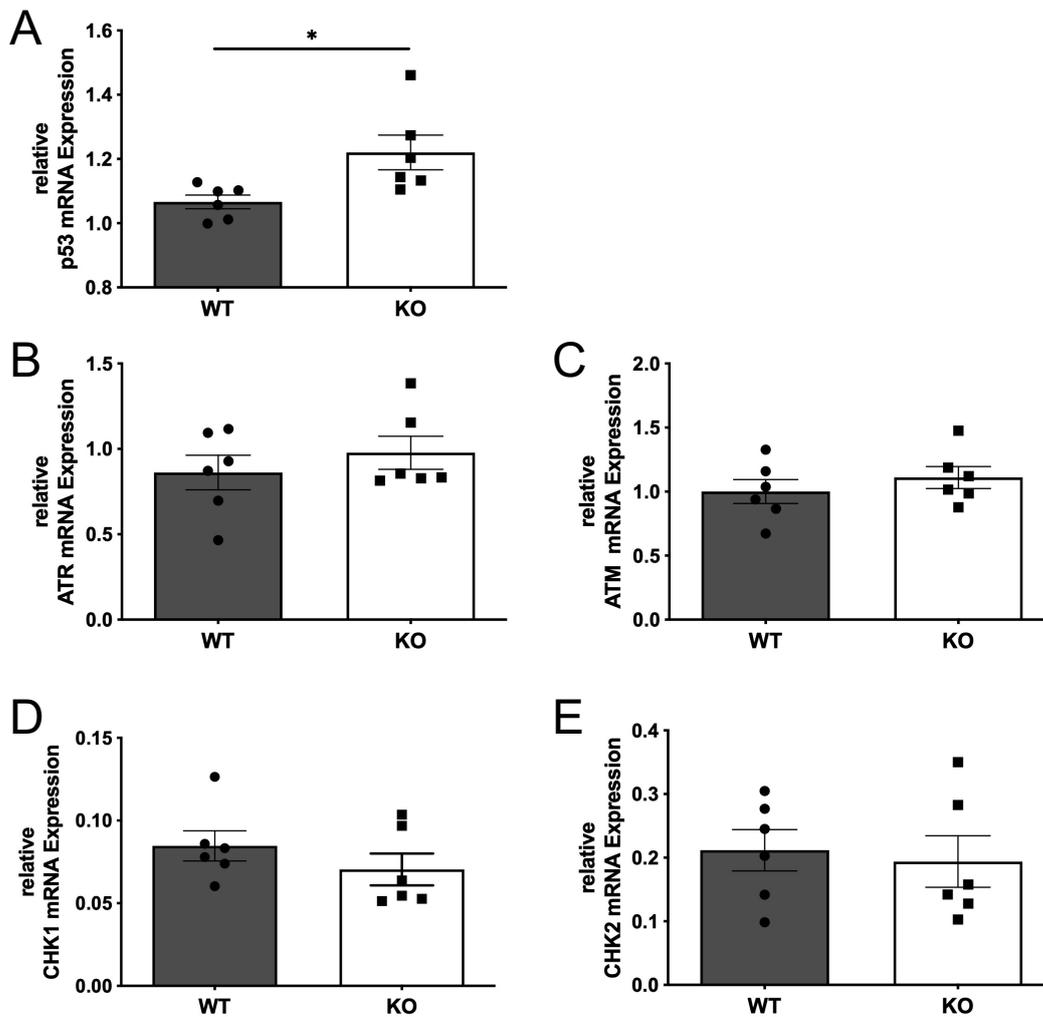


Abbildung 23: Expressionsanalyse des p53-Signalwegs in peripheren T-Zellen aus der Milz von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-T-Zellen von **A.** p53, **B.** ATR, **C.** ATM, **D.** CHK1 und **E.** CHK2. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von n = 6 Mäusen. *p \leq 0,05 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

ERGEBNISSE

Die Phosphatase CDC25c zeigte keine veränderten Expressionslevel (Abb. 24A). Für das Molekül SOCS1 hingegen konnte in dieser Population eine signifikant erhöhte Expression um den Faktor 1,3 festgestellt werden (Abb. 24B). p21 zeigte keine Veränderungen (Abb. 24C).

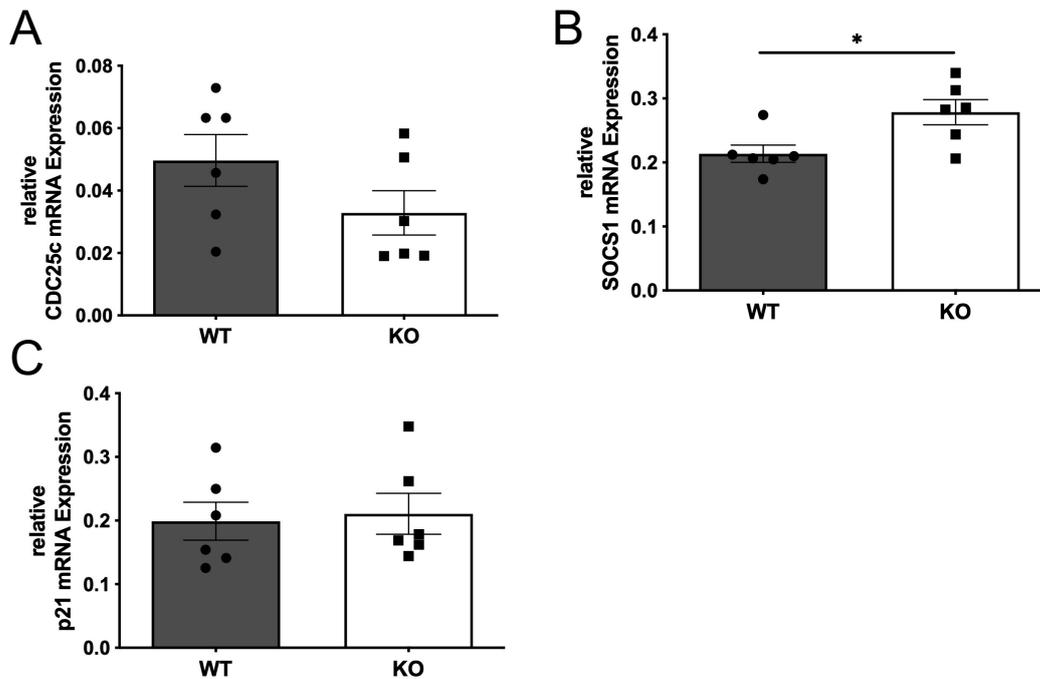


Abbildung 24: Expressionsanalyse von CDC25c, SOCS1 und p21 in peripheren T-Zellen aus der Milz von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Relative mRNA-Expression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-T-Zellen von **A.** CDC25c, **B.** SOCS1 und **C.** p21. Graphen zeigen einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von n = 6 Mäusen. *p \leq 0,05 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass bei einer SLy1-Defizienz die erhöhte Expression von p53 auf mRNA-Ebene nicht nur während der Thymozytenentwicklung, sondern auch in T-Zellen der Milz auftritt.

3.2 Analyse der T-Zellentwicklung in Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Aus Vorarbeiten mit SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Mäusen war bereits bekannt gewesen, dass ein Fehlen des SLy1-Proteins zu einer Reduktion der Zellzahl in den jeweiligen lymphatischen Organen Thymus, Lymphknoten und Milz führt (Reis *et al.*, 2009). Die reduzierte Thymozytenzellzahl bei SLy1-Defizienz hat sich dabei v.a. ab dem DP-Stadium manifestiert, wobei eine vergrößerte DN-Thymozytenpopulation zu finden gewesen war (Reis *et al.*, 2009; Reis, 2007). Diese Ergebnisse hatten die Vermutung nahegelegt, dass eine SLy1-Defizienz zu einem möglichen Differenzierungs- oder Proliferationsdefizit am Übergang vom DN- zum DP-Stadium führen könnte (Reis, 2007). Weiter wurde in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression des p53-Signalwegs bei einer SLy1-Defizienz beobachtet (siehe Kapitel 3.1). Damit stellte sich die Frage, ob eine spezifische Deletion des Gens TP53 bzw. des Proteins p53 in Thymozyten die reduzierte Zellzahl bei SLy1-Defizienz regulieren kann. Daher wurde eine Mauslinie mit einem konditionalen Knockout von TP53 in den Thymozyten (p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺) mit den SLy1-defizienten Mäusen (SLy1^{KO}) gekreuzt. Dieser Genotyp wird im Weiteren mit SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bezeichnet bzw. bei einer unveränderten SLy1-Expression mit SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ (Tab. 2). Als Kontrollgruppen wurden jene Genotypen verwendet, bei welchen p53 weiterhin in Thymozyten und T-Zellen exprimiert wurde. Dabei wird im Weiteren der Genotyp mit modifiziertem TP53 und fehlender Cre-Rekombinase mit SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bezeichnet. Der Genotyp mit nicht-modifiziertem TP53, aber exprimierter Cre-Rekombinase wird mit SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ bzw. mit SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ bezeichnet (Tab. 2). Es wurden folgende Vergleiche unter den Gruppen vorgenommen: Es wurde der SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Genotyp mit dem SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Genotyp mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test verglichen, um die Wirkung einer SLy1-Defizienz im Kontext einer p53-Defizienz zu untersuchen. Des Weiteren wurde der SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻-Genotyp mit dem SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻-Genotyp bzw. der SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺-Genotyp mit dem SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺-Genotyp mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test verglichen, um die Ergebnisse

ERGEBNISSE

mit den Vorarbeiten von Reis *et al.* (2009) abzugleichen und damit zu klären, ob der Vergleich zwischen SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und den Kontrollgruppen SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ Rückschlüsse auf einen Einfluss der p53-Defizienz auf den Phänotyp der SLy1-Defizienz zulässt. Dafür wurde dann SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit *Dunnett's post-hoc* Test jeweils mit SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ verglichen, um die Fragestellung zu beantworten, ob der Phänotyp einer SLy1-Defizienz durch eine zusätzliche p53-Defizienz korrigiert werden kann. Analog wurde SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ mit SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ bezüglich der jeweiligen absoluten Zellzahl verglichen, um die Auswirkung einer p53-Defizienz auf die Zellzahl zu untersuchen.

Es wurde die Zellzahl in den lymphatischen Organen Thymus, Milz, inguinale Lymphknoten (*lymph node*, LN) und Knochenmark (*bone marrow*, BM) bestimmt. Zusätzlich wurden im Thymus die FSC- und SSC-Werte, die Zellpopulationen DN-, DP- und CD4SP- und CD8SP-Thymozyten sowie die DN-Subpopulationen DN1 - DN4 mittels Durchflusszytometrie analysiert. In den Lymphknoten und in der Milz wurden die T- und B-Lymphozytenpopulationen sowie die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellsubpopulationen bestimmt. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte im Alter von 25 Wochen, da das Auftreten eines spontanen Tumorgeschehens in p53-defizienten Mäusen in der Literatur im Alter von 4 - 6 Monaten beschrieben wurde (Klusmann *et al.*, 2016; Dudgeon *et al.*, 2014; Donehower *et al.*, 1995; Donehower *et al.*, 1992).

Es wurde zum einen die Hypothese überprüft, ob die Reduktion der Zellzahl bei SLy1-Defizienz auf eine Hochregulation des p53-Signalwegs zurückzuführen ist und zum anderen, ob das SLy1-Protein *direkt* als Regulator von Proliferationsfaktoren für Thymozyten wirkt. Des Weiteren wurde der Einfluss einer SLy1-Defizienz auf eine mögliche Tumorentstehung bei p53-Defizienz untersucht.

Es ist vorneweg anzumerken, dass diese Studie in der vorliegenden Arbeit neu etabliert wurde. Es konnten je nach Genotyp nur 3 bis 6 Mäuse untersucht werden, dies ist in der jeweiligen Abbildungsbeschriftung angegeben. Die folgenden Ergebnisse können daher lediglich einen Hinweis auf mögliche Veränderungen in diesem Mausmodell geben. Es sind noch weitere Tiere zur Untermauerung der Ergebnisse nötig.

Die Mäuse aller untersuchten Genotypen zeigten eine unauffällige Entwicklung bis einschließlich der 25. Lebenswoche. Lediglich eine Maus des Genotyps $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ fiel aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes mit 21 Wochen auf. Diese wurde aus der folgenden Auswertung herausgenommen und wird in Kapitel 3.2.5 gesondert beschrieben.

3.2.1 Analyse der Zellzahl lymphatischer Organe in Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Zunächst wurde die Zellzahl in den lymphatischen Organen Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark untersucht. Entsprechend den Ergebnissen von Reis *et al.* (2009) fand sich bei den $SLy1^{KO}$ -Genotypen eine Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den entsprechenden $SLy1^{WT}$ -Genotypen.

Die Zellzahl im Thymus bei einer p53-Defizienz betrug beim Genotyp $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ durchschnittlich $176,30 \times 10^6$ Zellen, bei einer zusätzlichen SLy1-Defizienz zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellzahl auf 43% (Abb. 25, Tab. 14). In der Kontrollgruppe $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ war die Zellzahl mit durchschnittlich $82,93 \times 10^6$ Zellen auf 85% im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ reduziert (Abb. 25, Tab. 14). In der Kontrollgruppe $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ war die Zellzahl mit $49,38 \times 10^6$ Zellen auf 65% im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ reduziert (Abb. 25, Tab. 14). Die Reduktion in den Kontrollgruppen erreichte jedoch keine Signifikanz.

Beim Vergleich $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{KO}$ -Kontrollgenotypen wurde deutlich, dass eine zusätzliche p53-Defizienz die Zellzahlreduktion einer SLy1-Defizienz nicht korrigieren kann. Der Vergleich der Zellzahl des Genotyps $SLy^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. der Zellzahl des Genotyps $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$

ERGEBNISSE

bzw. $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ zeigte mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit *Dunnett's post-hoc* Test keine signifikanten Unterschiede zwischen $p53$ -defizienten und $p53$ -exprimierenden Genotypen bei $SLy1$ -Defizienz (Abb. 25). Der Vergleich $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{WT}$ -Kontrollgenotypen konnte zeigen, dass eine alleinige $p53$ -Defizienz zu einer signifikant erhöhten Zellzahl im Thymus führt. Die Zellzahl war bei $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ um 181% im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. um 232% im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ erhöht (Abb. 25).

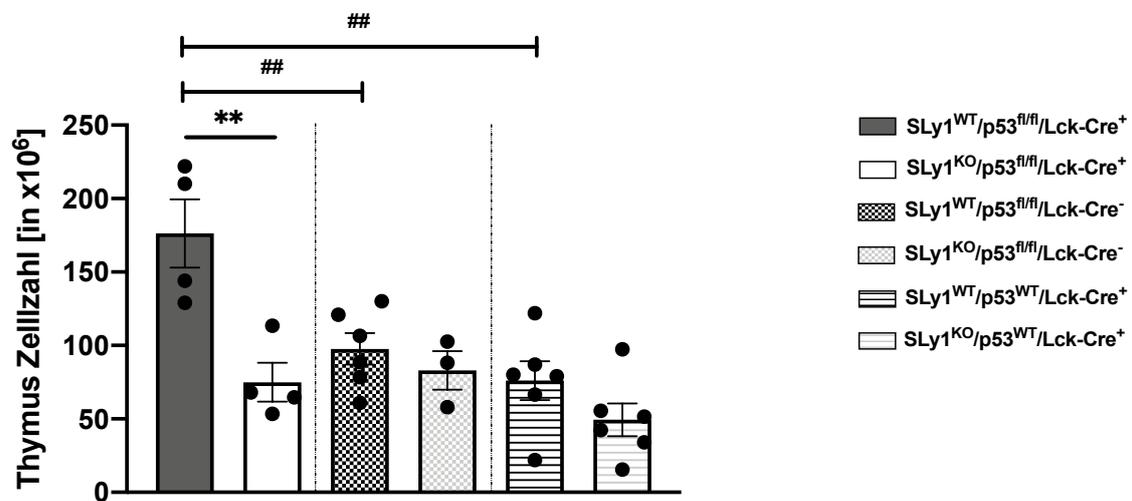


Abbildung 25: Zellzahl im Thymus von $SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Mäusen und Kontrollmäusen.

Zellzahl im Thymus von $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ und $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ bzw. $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ und $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ und $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ im Alter von 25 Wochen. Graph zeigt Mittelwerte \pm SEM und einzelne Werte aus $n = 3 - 6$ Mäusen [in $\times 10^6$]. ** $p \leq 0,01$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test jeweils zwischen $SLy1^{WT}$ und entsprechendem $SLy1^{KO}$. ## $p \leq 0,01$ bei einfaktorieller Varianzanalyse zwischen den $SLy1^{WT}$ -Gruppen bzw. zwischen den $SLy1^{KO}$ -Gruppen mit *Dunnett's post-hoc* Test mit Vergleich von $p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. $p53^{WT}/Lck-Cre^+$ jeweils zu $p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$.

Zusammenfassend lässt sich unabhängig vom $p53$ -Kontext eine Reduktion der Zellzahl im Thymus bei einer $SLy1$ -Defizienz feststellen, wobei die Zellzahlreduktion zwischen $SLy1^{KO}$ - und $SLy1^{WT}$ -Mäusen bei einer $p53$ -Defizienz am stärksten ausgeprägt war.

ERGEBNISSE

Die Zellzahl in der Milz von $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ war durchschnittlich auf 77% und in der Milz der $SLy1^{KO}$ -Kontrollmäuse auf 47% ($SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$) bzw. auf 55% ($SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^-$) im Vergleich zu den jeweils entsprechenden $SLy1^{WT}$ -Genotypen reduziert (Abb. 26A, Tab. 14). Die Ergebnisse erreichten aber keine Signifikanz. Der Vergleich $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{KO}$ -Kontrollgenotypen konnte wie auch bei der Zellzahl im Thymus keine Unterschiede zwischen p53-defizienten und p53-exprimierenden Genotypen bei $SLy1$ -Defizienz zeigen (Abb. 26A). Der Vergleich $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{WT}$ -Kontrollgenotypen konnte zudem keinen Unterschied bezüglich der Zellzahl bei einer p53-Defizienz oder einer p53-Expression nachweisen (Abb. 26A).

In den Lymphknoten war die Zellzahl von $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Mäusen signifikant auf 69% von $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ verringert (Abb. 26B, Tab. 14). In den Lymphknoten der Kontrollgruppen war kein Unterschied zwischen $SLy1^{KO}$ und $SLy1^{WT}$ zu erkennen (Abb. 26B, Tab. 14). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede weder beim Vergleich $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{KO}$ -Kontrollgenotypen noch beim Vergleich $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{WT}$ -Kontrollgenotypen (Abb. 26B).

Die Zellzahl im Knochenmark von $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Mäusen im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Mäusen war unverändert (Abb. 26C). Auch bei den Kontrollmäusen konnte kein Unterschied im Knochenmark zwischen $SLy1^{KO}$ und $SLy1^{WT}$ beobachtet werden (Abb. 26C, Tab. 14). Beim Vergleich $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{WT}$ -Kontrollgenotypen konnte hingegen bei p53-Defizienz, entsprechend der Ergebnisse im Thymus, eine erhöhte Zellzahl festgestellt werden. Die Zellzahl war bei $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ signifikant um 160% im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ und um durchschnittlich (jedoch nicht signifikant) 148% im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ erhöht (Abb. 26C).

ERGEBNISSE

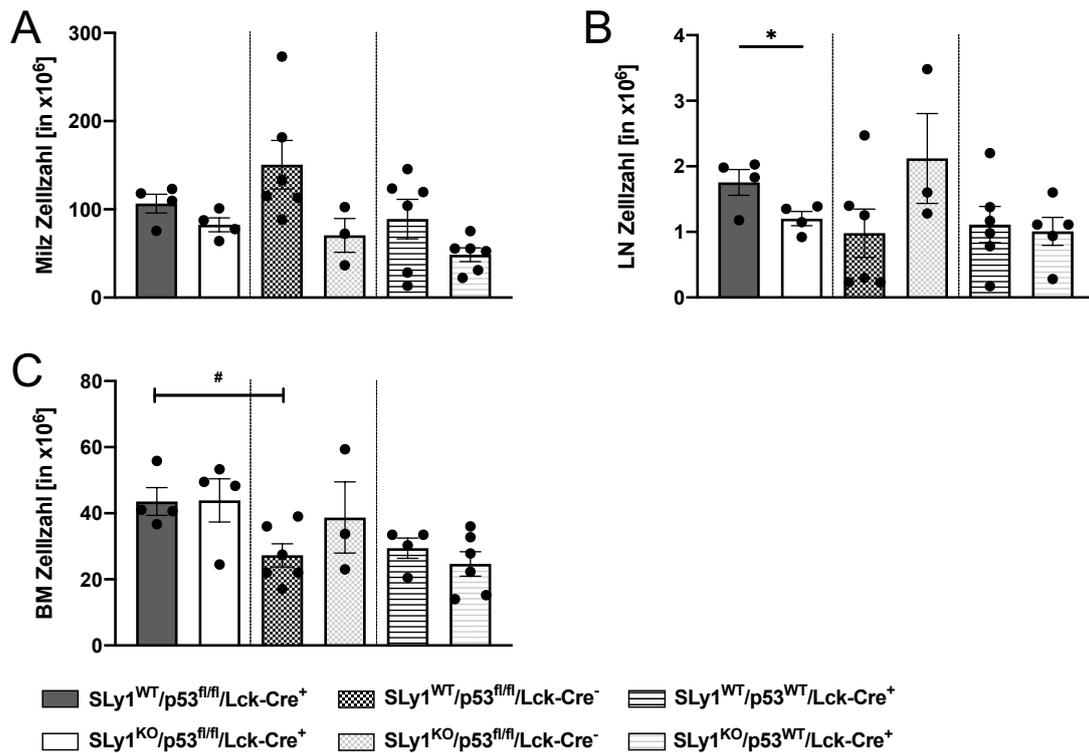


Abbildung 26: Zellzahl in Milz, Lymphknoten und Knochenmark von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen.

Zellzahl **A.** in der Milz, **B.** in den Lymphknoten (LN) sowie **C.** im Knochenmark (BM) von SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bzw. SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ im Alter von 25 Wochen. Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM und einzelne Werte aus $n = 3 - 6$ Mäusen [in $\times 10^6$]. * $p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test jeweils zwischen SLy1^{WT} und entsprechendem SLy1^{KO}. # $p \leq 0,05$ bei einfaktorieller Varianzanalyse zwischen den SLy1^{WT}-Gruppen bzw. zwischen den SLy1^{KO}-Gruppen mit *Dunnnett's post-hoc* Test mit Vergleich von p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. p53^{WT}/Lck-Cre⁺ jeweils zu p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺.

ERGEBNISSE

Tabelle 14: Durchschnittliche Zellzahl in Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen.

Die Daten geben die Zellzahl von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen im Alter von 25 Wochen an. Es sind die Mittelwerte der Zellzahl in $\times 10^6$ nach Genotyp mit SEM und n-Anzahl angegeben. Signifikanz mit einzelnen p-Werten und *p \leq 0,05 bzw. **p \leq 0,01 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test.

Organ	Genotyp	SLy1 ^{WT} ± SEM (n)	SLy1 ^{KO} ± SEM (n)	p-Wert	Signifi- kanz
Thymus	p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺	176,30 ± 23,28 (n = 4)	74,92 ± 13,23 (n = 4)	0,0091	**
	p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁻	97,62 ± 10,74 (n = 6)	82,93 ± 13,12 (n = 3)	0,4395	ns
	p53 ^{WT} /Lck-Cre ⁺	76,08 ± 13,25 (n = 6)	49,38 ± 11,22 (n = 6)	0,1551	ns
Milz	p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺	106,50 ± 10,70 (n = 4)	82,50 ± 7,82 (n = 4)	0,1202	ns
	p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁻	150,70 ± 27,55 (n = 6)	70,50 ± 19,02 (n = 3)	0,0992	ns
	p53 ^{WT} /Lck-Cre ⁺	89,04 ± 22,35 (n = 6)	48,68 ± 7,80 (n = 6)	0,1190	ns
LN	p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺	1,80 ± 0,20 (n = 4)	1,20 ± 0,11 (n = 4)	0,0487	*
	p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁻	0,98 ± 0,37 (n = 6)	2,12 ± 0,69 (n = 3)	0,1483	ns
	p53 ^{WT} /Lck-Cre ⁺	1,11 ± 0,28 (n = 6)	1,00 ± 0,21 (n = 5)	0,7775	ns
BM	p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁺	43,55 ± 4,21 (n = 4)	43,90 ± 6,55 (n = 4)	0,9656	ns
	p53 ^{fl/fl} /Lck-Cre ⁻	27,27 ± 8,52 (n = 6)	38,72 ± 10,78 (n = 3)	0,2316	ns
	p53 ^{WT} /Lck-Cre ⁺	29,45 ± 3,08 (n = 4)	24,68 ± 3,71 (n = 6)	0,3895	ns

3.2.2 Analyse der Thymozytenpopulationen von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Im Weiteren wurden die Zellen aus dem Thymus durchflusszytometrisch untersucht.

Die Zellen aus dem Thymus von 25 Wochen alten Mäusen zeigten unabhängig vom Genotyp entsprechend Abbildung 27 keine nennenswerten morphologischen Auffälligkeiten in der Durchflusszytometrie.

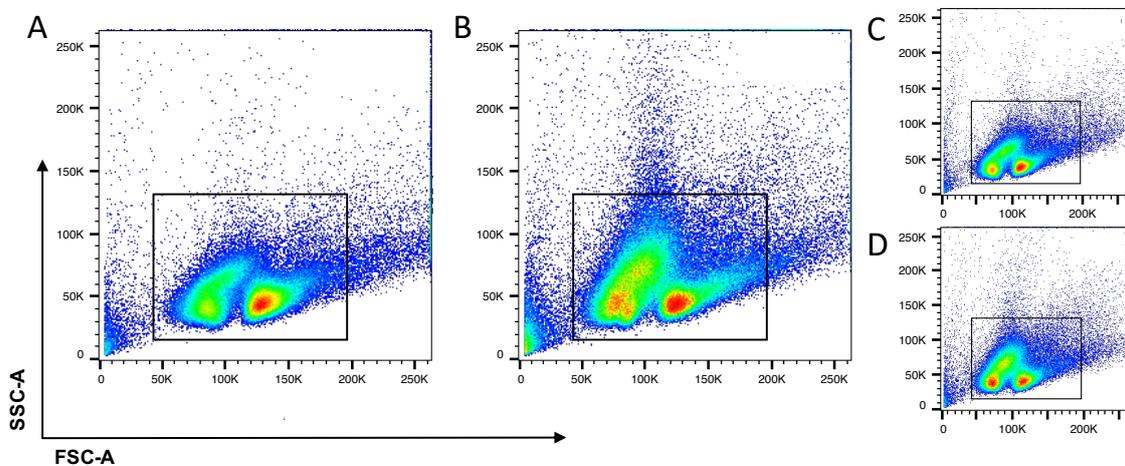


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen aus dem Thymus anhand von FSC-A und SSC-A von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen.

FSC/SSC-A-Abbildungen von jeweils einer repräsentativen Maus für die Thymozyten von **A.** SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺, **B.** SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺, **C.** SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und **D.** SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ im Alter von 25 Wochen.

Des Weiteren wurden, wie in Abbildung 28 dargestellt, die durchschnittliche Größe und Komplexität der Thymozyten aus der $\alpha\beta$ -Thymozytenpopulation (CD90.2⁺, TZR $\gamma\delta$ ⁻) analysiert. Dabei gibt die Vorwärtsstreuung (FSC) die Zellgröße und die Seitwärtsstreuung (SSC) die intrazelluläre Granularität wieder, so dass Zellen mit einem komplexen Zytoplasma höhere SSC-Werte zeigen (Stetler-Stevenson, 2003). Für Lymphoblasten sind höhere FSC- als auch SSC-Werte zu erwarten (Li, Juco, Mann & Holden, 2004). In der vorliegenden Arbeit waren weder signifikante Unterschiede zwischen den SLy1^{KO}-Genotypen und den jeweils entsprechenden SLy1^{WT}-Genotypen noch zwischen SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und den SLy1^{KO}-Kontrollgenotypen erkennbar (Abb. 28).

ERGEBNISSE

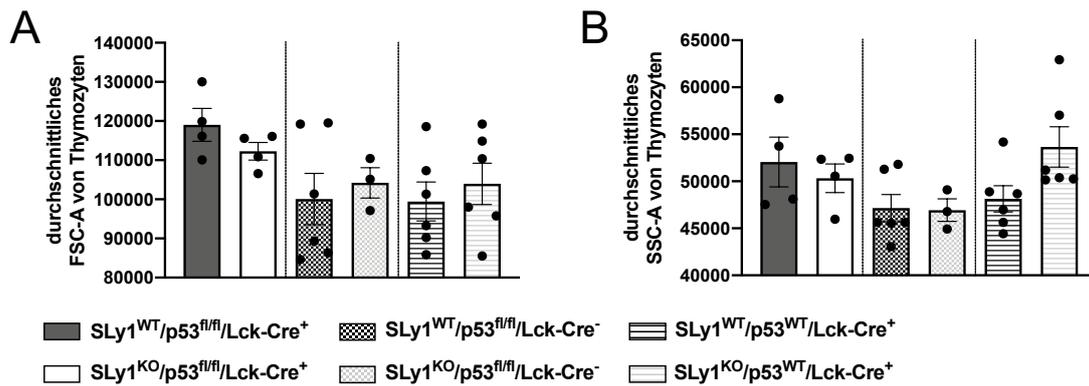


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Bestimmung von FSC-A und SSC-A der Thymozyten von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen.

Durchschnittliche Werte von **A.** FSC-A und **B.** SSC-A der Thymozyten von SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bzw. SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ im Alter von 25 Wochen. Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM und einzelne Werte aus $n = 3 - 6$ Mäusen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test jeweils zwischen SLy1^{WT} und entsprechendem SLy1^{KO}. Einfaktorielle Varianzanalyse zwischen den SLy1^{KO}-Gruppen mit *Dunnett's post-hoc* Test mit Vergleich von p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. p53^{WT}/Lck-Cre⁺ jeweils zu p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺.

Im Weiteren wurde die Thymozytenentwicklung anhand der Verteilung der Thymozytenpopulation über die einzelnen Entwicklungsstadien DN, DP und SP untersucht. Dabei zeigte sich bei einer p53-Defizienz über alle Entwicklungsstadien hinweg eine deutliche Zellzahlerhöhung, welche bei gleichzeitig vorliegender SLy1-Defizienz nicht nachweisbar war. Bei den Kontrollgruppen war durch eine SLy1-Defizienz die Zellzahl ab dem DP-Stadium reduziert.

Der Anteil der DN-, DP- sowie der SP-Population an der Gesamthymozytenpopulation war bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ im Vergleich zu SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ nicht signifikant verändert (Abb. 29A/C/E). Die absolute Zellzahl der DN-Population war ebenfalls nicht signifikant verändert, wobei bei SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ durchschnittlich $4,10 \times 10^6$ DN-Zellen und bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ durchschnittlich nur $2,36 \times 10^6$ DN-Zellen im Thymus nachgewiesen werden konnten (Abb. 29B). Die absolute Zellzahl der DP-Population war bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ mit $36,80 \times 10^6$ Zellen hingegen signifikant auf 33% von 112×10^6 Zellen in SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ (Abb. 29D)

ERGEBNISSE

und die absolute Zellzahl der SP-Population mit $6,85 \times 10^6$ Zellen ebenfalls signifikant auf 48% von $14,25 \times 10^6$ Zellen bei $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Mäusen reduziert (Abb. 29F).

In den Kontrollgruppen $SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ und $SLy1^{WT/KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ konnten die von Reis *et al.* (2009) bereits beschriebenen Veränderungen bei $SLy1$ -Defizienz größtenteils nachvollzogen werden. Die Genotypen $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ und $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ zeigten einen signifikant vergrößerten Anteil der DN-Population an der Gesamthymozytenpopulation im Vergleich zu den entsprechenden $SLy1^{WT}$ -Mäusen (Abb. 29A). Bezüglich der absoluten Zellzahlen der DN-, DP- sowie SP-Population konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden, dennoch geben die Daten einen Hinweis auf eine tendenziell erhöhte DN-Zellzahl (Abb. 29B) sowie eine reduzierte DP- und SP-Zellzahl bei $SLy1^{KO}$ -Mäusen (Abb. 29D/F).

Beim Vergleich der DN-, DP- sowie SP-Populationen (relativ wie absolut) von $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. vs. $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen $p53$ -defizienten und $p53$ -exprimierenden Genotypen bei $SLy1$ -Defizienz (Abb. 29). Folglich scheint eine $p53$ -Defizienz die Veränderungen durch $SLy1$ -Defizienz, sprich die Reduktion der DP- sowie SP-Zellzahl, nicht korrigieren zu können.

Beim Vergleich von $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. vs. $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ zeigte sich bei einer $p53$ -Defizienz in allen Thymozytenpopulationen (DN, DP und SP) eine signifikant größere Zellzahl entsprechend der deutlich vergrößerten Gesamtzellzahl des Thymus bei $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ (Abb. 29 B/D/F).

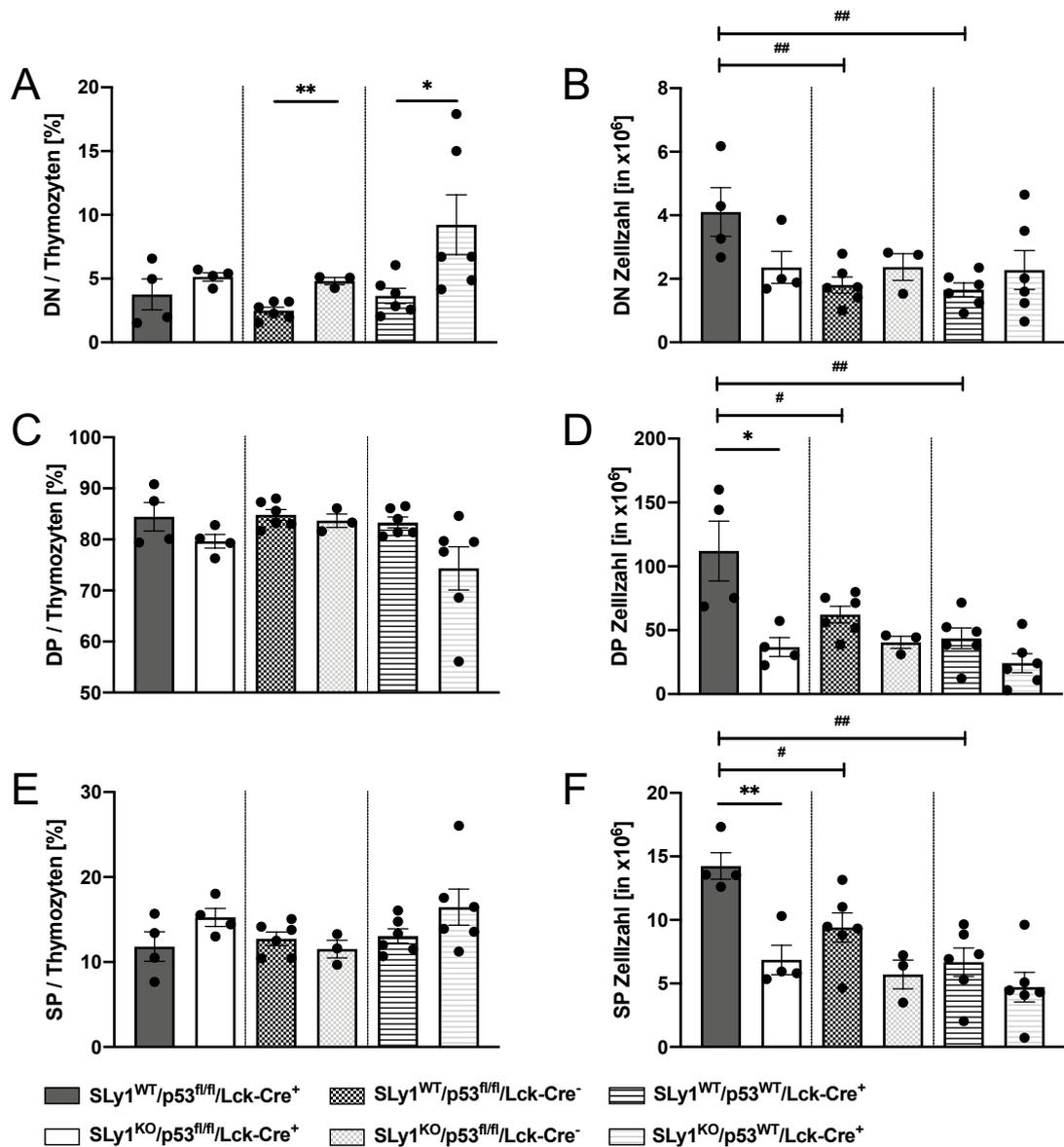


Abbildung 29: Thymozytenpopulationen DN, DP und SP von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen.

Relativer Anteil **A.** der DN-Population, **C.** der DP-Population und **E.** der SP-Population an der Gesamthymozytenpopulation, sowie die absolute Zellzahl **B.** der DN-Population, **D.** der DP-Population und **F.** der SP-Population im Thymus von SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bzw. SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ im Alter von 25 Wochen. Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM und einzelne Werte aus n = 3 - 6 Mäusen. *p ≤ 0,05 und **p ≤ 0,01 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test jeweils zwischen SLy1^{WT} und entsprechendem SLy1^{KO}. #p ≤ 0,05 und ##p ≤ 0,01 bei einfaktorieller Varianzanalyse zwischen den SLy1^{WT}-Gruppen (bei B, D, F) bzw. zwischen den SLy1^{KO}-Gruppen (A – F) mit *Dunnett's post-hoc* Test mit Vergleich von p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. p53^{WT}/Lck-Cre⁺ jeweils zu p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺.

ERGEBNISSE

Beim Vergleich der SP-Subpopulationen CD4SP und CD8SP konnte bei SLy1-Defizienz eine vergrößerte CD8SP-Population (anteilig an der Gesamtpopulation im Thymus) nachgewiesen werden.

Bezüglich der CD4SP-Subpopulation war weder bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ noch bei den Kontrollgruppen SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ im Vergleich zu den entsprechenden SLy1^{WT}-Mäusen ein nennenswerter Unterschied beim Anteil an der Gesamthymozytenpopulation erkennbar (Abb. 30A). Die absolute Zellzahl der CD4SP-Subpopulation bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺, SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ spiegelte dabei jeweils lediglich die reduzierte Gesamtzellzahl im Thymus bei SLy1-Defizienz wider (Abb. 30B). So zeigte die absolute CD4SP-Zellzahl bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ eine signifikante Reduktion im Vergleich zu SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ (Abb. 30B). Bei SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ konnte im Vergleich zu den entsprechenden SLy1^{WT}-Mäusen ebenfalls eine Reduktion der absoluten CD4SP-Zellzahl beobachtet werden - jedoch nicht signifikant (Abb. 30B).

Die CD8SP-Subpopulation war beim Genotyp SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ signifikant vergrößert (anteilig an der Gesamtpopulation), wobei bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ 5,9% der Thymozyten einfach positiv für CD8 (CD8⁺CD4⁻) waren und bei SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ lediglich 2,9% (Abb. 30C). Auch in der Kontrollgruppe SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ war der Anteil der CD8SP-Subpopulation mit 4,6% signifikant vergrößert im Vergleich zu SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ mit 3,5% (Abb. 30C). In der Kontrollgruppe SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ war der Anteil mit 3,8% ebenfalls größer als bei SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ mit 3,1% (Abb. 30C). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Die absolute CD8SP-Zellzahl erschien zwischen SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bzw. zwischen SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ unverändert, da aufgrund der oben beschriebenen Reduktion der Gesamtzellzahl im Thymus die beobachtete relative Erhöhung der CD8SP-Subpopulation nicht mehr ausschlaggebend war (Abb. 30D).

ERGEBNISSE

Beim Vergleich des Anteils der CD8SP-Subpopulation bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{KO}$ -Kontrollgenotypen war kein signifikanter Unterschied zwischen $p53$ -defizienten und $p53$ -exprimierenden Genotypen bei $SLy1$ -Defizienz erkennbar (Abb. 30C). Somit scheint eine $SLy1$ -Defizienz unabhängig von $p53$ mit einem vergrößerten Anteil der CD8SP-Subpopulation einherzugehen.

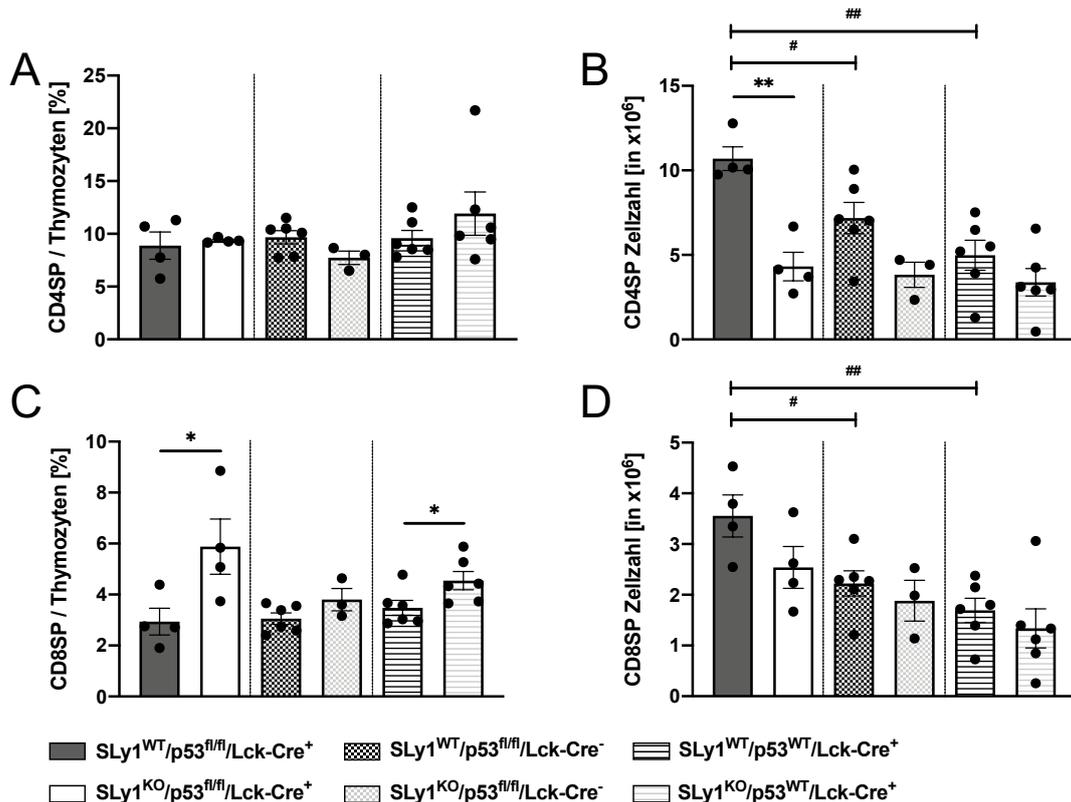


Abbildung 30: Thymozytensubpopulationen CD4SP und CD8SP von $SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Mäusen und Kontrollmäusen.

Relativer Anteil **A.** der CD4SP-Subpopulation und **C.** der CD8SP-Subpopulation an der Gesamthymozytenpopulation sowie absolute Zellzahl **B.** der CD4SP-Subpopulation und **D.** der CD8SP-Subpopulation im Thymus von $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ und $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ bzw. $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ und $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ und $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ im Alter von 25 Wochen. Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM und einzelne Werte aus $n = 3 - 6$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test jeweils zwischen $SLy1^{WT}$ und entsprechendem $SLy1^{KO}$. # $p \leq 0,05$ und ## $p \leq 0,01$ bei einfaktorierter Varianzanalyse zwischen den $SLy1^{WT}$ -Gruppen (bei B und D) bzw. zwischen den $SLy1^{KO}$ -Gruppen (bei A – D) mit *Dunnett's post-hoc* Test mit Vergleich von $p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. $p53^{WT}/Lck-Cre^+$ jeweils zu $p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$.

3.2.3 Analyse der DN-Thymozytenentwicklung im Thymus von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Die Untersuchungen von SLy1^{KO}-Mäusen bei Reis *et al.* (2009) hatten die Vermutung zugelassen, dass es bei einer SLy1-Defizienz im DN-Stadium zu einem Differenzierungs- oder Proliferationsproblem kommt. Hierbei war ein leicht reduzierter Anteil der DN1-Subpopulation, ein vergrößerter Anteil der DN2- und DN3-Subpopulation sowie ein kleinerer Anteil der DN4-Subpopulation auffällig gewesen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Anteile der DN-Subpopulationen DN1 bis DN4 an der Population CD90.2⁺/TZRγδ⁻ unter Berücksichtigung von p53 ebenfalls näher analysiert.

Beim Genotyp SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ war im Vergleich zum Genotyp SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ im Durchschnitt der Anteil der DN1-Subpopulation kleiner und der Anteil der DN2-Subpopulationen größer (Abb. 31A/B). Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant und können nur einen möglichen Hinweis geben. Für die Subpopulationen DN3 und DN4 konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 31C/D). Bei den Kontrollgruppen konnte entsprechend Reis *et al.* (2009) bei SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ eine signifikant vergrößerte DN2-Subpopulation und bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ eine signifikant vergrößerte DN3-Subpopulation nachgewiesen werden (Abb. 31).

Beim Vergleich SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ vs. SLy1^{KO}-Kontrollgenotypen war bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ die DN1-Subpopulation signifikant größer als bei SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ (Abb. 31A). In den weiteren DN-Subpopulationen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abb. 31B-D).

Die Unterschiede, welche zwischen den SLy1^{KO}-Genotypen und den jeweiligen SLy1^{WT}-Genotypen beobachtet werden konnten, geben auch in der vorliegenden Arbeit einen Hinweis auf eine Rolle von SLy1 im DN-Stadium, welche unabhängig von p53 zu sein scheint. Die Daten lassen auch hier keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung in einem bestimmten DN-Stadium zu.

ERGEBNISSE

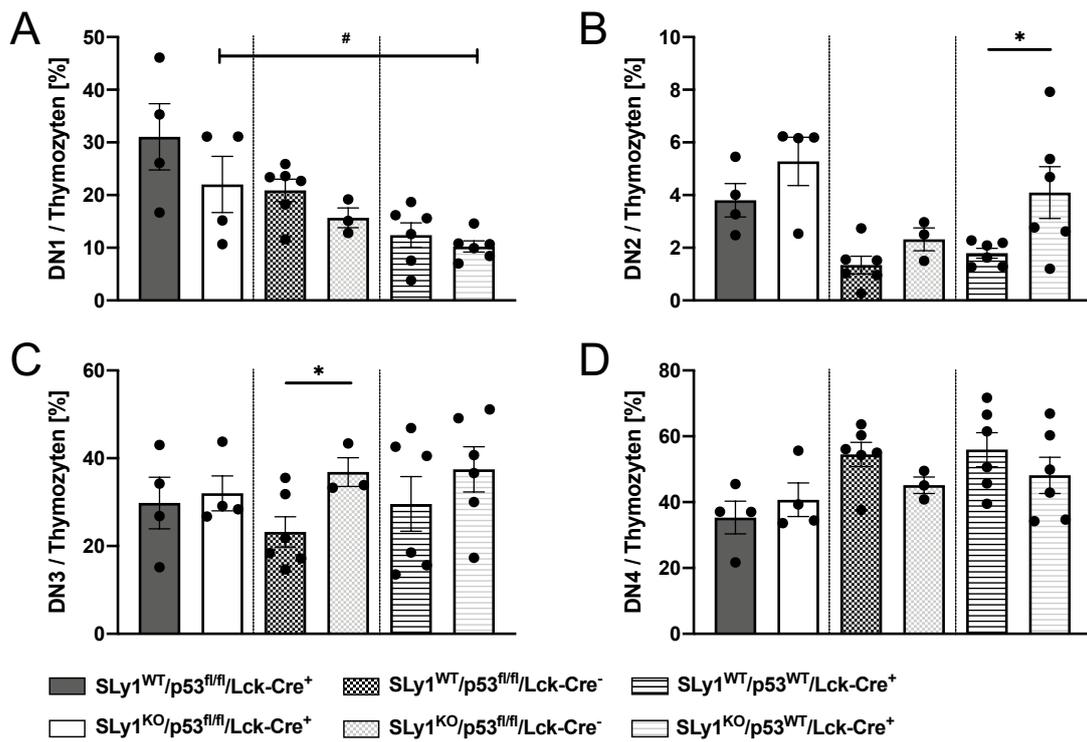


Abbildung 31: Thymozytensubpopulationen DN1 – DN4 von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen.

Relativer Anteil der **A.** DN1-Subpopulation, **B.** DN2-Subpopulation, **C.** DN3-Subpopulation und **D.** DN4-Subpopulation an der DN-Thymozytenpopulation im Thymus von SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bzw. SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ im Alter von 25 Wochen. Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM und einzelne Werte aus $n = 3 - 6$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test jeweils zwischen SLy1^{WT} und entsprechendem SLy1^{KO}. # $p \leq 0,05$ bei einfaktorieller Varianzanalyse zwischen den SLy1^{KO}-Gruppen mit *Dunnett's post-hoc* Test mit Vergleich von p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. p53^{WT}/Lck-Cre⁺ jeweils zu p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺.

3.2.4 Analyse der Lymphozytenpopulationen in sekundären lymphatischen Organen von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Die reifen T-Zellen wandern aus dem Thymus in die peripheren lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten. Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, war bei einer SLy1-Defizienz unabhängig von p53 die absolute SP-Thymozytenzellzahl (entsprechend der reduzierten Zellzahl im Thymus) reduziert, wobei der Anteil der CD8SP-Subpopulation vergrößert war. Daher sollte weiter geklärt werden, ob es in der Peripherie ebenfalls zu einer Veränderung der T-Zellpopulation sowie der CD4⁺- und CD8⁺-T-Subpopulation bei SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz kommt. Reis *et al.* (2009) hatten in SLy1^{KO}-Mäusen bei reduzierter Gesamtzellzahl in der Milz bzw. in den Lymphknoten eine Reduktion der T- sowie der B-Zellzahl nachweisen können, wobei die Anteile der Populationen jeweils unverändert gewesen waren. Zudem war eine geringfügige Verschiebung von CD4⁺- zu CD8⁺-T-Zellen in der Milz aufgefallen (Reis, 2007).

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, war bei einer SLy1-Defizienz unabhängig von p53 die Gesamtzellzahl in der Milz im Durchschnitt reduziert - jedoch nicht signifikant (Abb. 26A, Tab. 14). Dabei konnte in der Milz aller SLy1^{KO}-Mäuse unabhängig von p53 eine Reduktion der absoluten T- sowie B-Zellzahl bei gleichzeitig unverändertem Anteil der T- und B-Zellpopulation an der Gesamtsplenozytenpopulation nachgewiesen werden.

In der Milz von SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ war der Anteil der T- und B-Zellpopulation an der Gesamtsplenozytenpopulation im Vergleich zu SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ nicht signifikant verändert (Abb. 32A/C). Die absolute Zellzahl der T- und B-Zellpopulation war ebenfalls nicht signifikant verändert, wobei die absolute T-Zellzahl von SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ im Durchschnitt auf 82% (Abb. 32B) und die absolute B-Zellzahl im Durchschnitt auf 71% im Vergleich zu SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ reduziert war (Abb. 32D) bei Reduktion der Gesamtzellzahl der Milz bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ auf 77% (Abb. 26A, Tab. 14). In den Kontrollgruppen konnte analog zu Reis *et al.* (2009) bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ eine deutliche Reduktion der absoluten Zellzahl der T-

ERGEBNISSE

und B-Zellpopulation bei verkleinerter Gesamtzellzahl der Milz nachgewiesen werden. Die T-Zellen waren bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^{-}$ vs. $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^{-}$ auf durchschnittlich 47%, bei $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^{+}$ vs. $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^{+}$ signifikant auf 33% reduziert (Abb. 32B). Die B-Zellen waren bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^{-}$ vs. $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^{-}$ signifikant auf 45% und bei $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^{+}$ vs. $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^{+}$ ebenfalls signifikant auf 37% reduziert (Abb. 32D).

Der Vergleich der T- und B-Zellpopulation bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^{+}$ vs. $SLy1^{KO}$ -Kontrollgenotypen mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit *Dunnetts' post hoc* Test erbrachte eine signifikant vergrößerte absolute T-Zellzahl bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^{+}$ im Vergleich zu $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^{+}$ (Abb. 32B). Da sich dieser Unterschied bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^{+}$ vs. $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^{-}$ nicht nachweisen ließ, kann hierbei keine Aussage getroffen werden. Es muss eine größere Probenzahl abgewartet werden.

Somit ließ sich in der Milz bei einer *SLy1*-Defizienz v.a. ein Defizit bei der absoluten Zellzahl erkennen. Weder der Anteil der T- noch der B-Zellpopulation war durch eine *SLy1*-Defizienz signifikant beeinflusst. Eine *p53*-Defizienz konnte das Zellzahldefizit durch *SLy1*-Defizienz nicht korrigieren. Diese Ergebnisse sind analog zu jenen Ergebnissen aus dem Thymus bei *SLy1*-Defizienz.

ERGEBNISSE

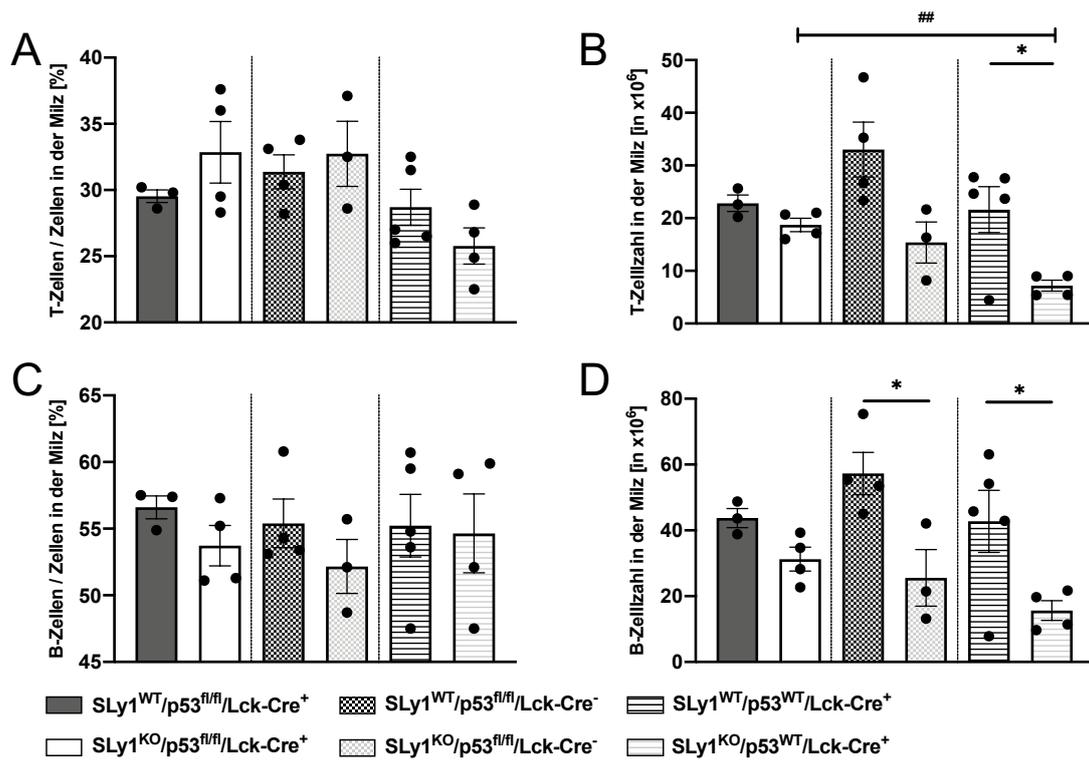


Abbildung 32: T- und B-Zellpopulation in der Milz von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen.

Relativer Anteil **A.** der T-Zellpopulation und **C.** der B-Zellpopulation an der Gesamtsplenozytenpopulation sowie absolute Zellzahl **B.** der T-Zellpopulation und **D.** der B-Zellpopulation in der Milz von SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bzw. SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ im Alter von 25 Wochen. Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM und einzelne Werte aus $n = 3 - 5$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test jeweils zwischen SLy1^{WT} und entsprechendem SLy1^{KO}. ## $p \leq 0,01$ bei einfaktorierter Varianzanalyse zwischen den SLy1^{WT}-Gruppen (bei B und D) bzw. zwischen den SLy1^{KO}-Gruppen (bei A – D) mit *Dunnett's post-hoc* Test mit Vergleich von p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. p53^{WT}/Lck-Cre⁺ jeweils zu p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺.

ERGEBNISSE

In den Lymphknoten von $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ fanden sich keine Unterschiede weder bei der T- noch bei der B-Zellpopulation (relativ wie absolut) im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ (Abb. 33A-D). In der Kontrollgruppe $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ konnte ein vergrößerter Anteil der B-Zellpopulation im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ nachgewiesen werden (Abb. 33C). Der Vergleich der T- sowie der B-Zellpopulation bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ vs. $SLy1^{KO}$ -Kontrollgenotypen erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 33).

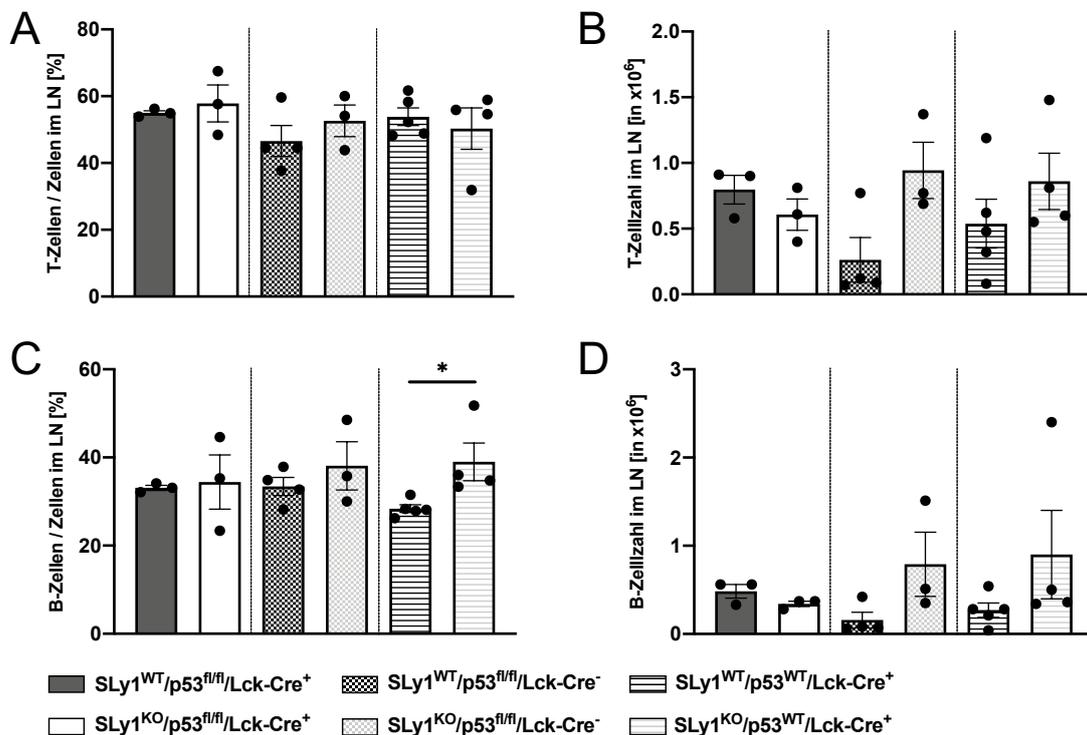


Abbildung 33: T- und B-Zellpopulation in den Lymphknoten von $SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Mäusen und Kontrollmäusen.

Relativer Anteil **A.** der T-Zellpopulation und **C.** der B-Zellpopulation an der gesamten Zellzahl der Lymphknoten sowie absolute Zellzahl **B.** der T-Zellpopulation und **D.** der B-Zellpopulation in den Lymphknoten von $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ und $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ bzw. $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ und $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. $SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ und $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ im Alter von 25 Wochen. Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM und einzelne Werte aus $n = 3 - 5$ Mäusen. * $p \leq 0,05$ bei ungepaartem zweiseitigem t-Test jeweils zwischen $SLy1^{WT}$ und entsprechendem $SLy1^{KO}$. Einfaktorielle Varianzanalyse zwischen den $SLy1^{WT}$ -Gruppen (bei B und D) bzw. zwischen den $SLy1^{KO}$ -Gruppen (bei A – D) mit *Dunnett's post-hoc* Test mit Vergleich von $p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. $p53^{WT}/Lck-Cre^+$ jeweils zu $p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$.

ERGEBNISSE

Der Vergleich der T-Zellsubpopulationen CD4⁺ und CD8⁺ (anteilig an der gesamten T-Zellpopulation) konnte zeigen, dass es bei SLy1-Defizienz unabhängig von p53 auch in den Lymphknoten zu einer vergrößerten CD8-positiven T-Zellsubpopulation kommt - analog zum Thymus mit vergrößerter CD8-positiver Thymozytensubpopulation (CD8SP).

In der Milz konnten keine signifikanten Unterschiede weder bei der CD4⁺- noch bei der CD8⁺-T-Zellsubpopulation festgestellt werden (Abb. 34A/B).

In den Lymphknoten konnte hingegen bei allen SLy1^{KO}-Genotypen eine vergrößerte CD8⁺-T-Zellsubpopulation bei reduzierter CD4⁺-T-Zellsubpopulation im Vergleich zu entsprechenden SLy1^{WT}-Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 34C/D). So zeigte sich in den Lymphknoten eine signifikante Reduktion der CD4⁺-T-Zellsubpopulation bei gleichzeitig signifikant vergrößerter CD8⁺-T-Zellsubpopulation bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ vs. SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ sowie bei der Kontrollgruppe SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ vs. SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ (Abb. 34C/D).

Der Vergleich der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellsubpopulation zwischen den SLy1^{KO}-Genotypen mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit *Dunnnett's post hoc* Test erbrachte als einzigen signifikanten Unterschied eine größere CD8⁺-T-Zellsubpopulation in den Lymphknoten von SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ im Vergleich zu SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁻ (Abb. 34 A-D bzw. Abb. 34D). Dieser Unterschied ließ sich jedoch nur zu einer Kontrollgruppe nachweisen und der Durchschnitt von SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ lag zudem unter dem Durchschnitt der zweiten Kontrollgruppe SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻.

Somit scheint eine SLy1-Defizienz zu einer Verschiebung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellsubpopulation zu führen, welche durch eine p53-Defizienz nicht normalisiert werden kann.

ERGEBNISSE

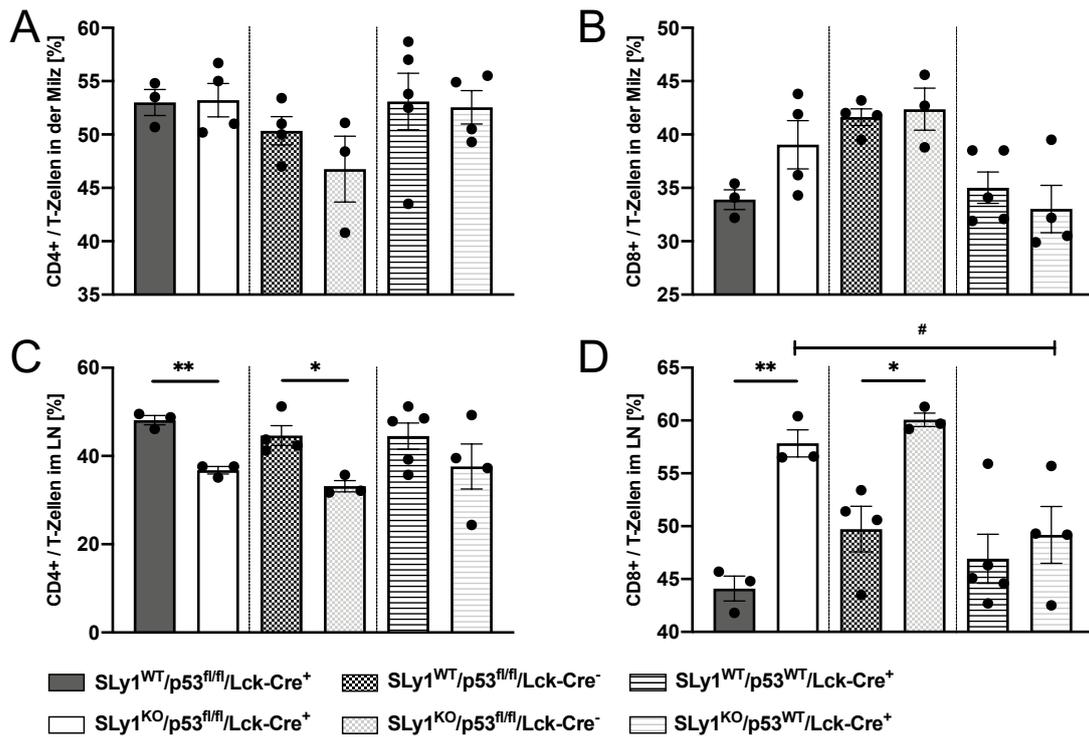


Abbildung 34: T-Zellsubpopulation CD4⁺ und CD8⁺ in der Milz und in den Lymphknoten von SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen und Kontrollmäusen.

Relativer Anteil der CD4⁺-Subpopulation an der T-Zellpopulation **A.** in der Milz und **C.** in den Lymphknoten sowie relativer Anteil der CD8⁺-Subpopulation **B.** in der Milz und **D.** in den Lymphknoten von SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bzw. SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ und SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ im Alter von 25 Wochen. Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM und einzelne Werte aus n = 3 - 6 Mäusen. *p ≤ 0,05 und **p ≤ 0,01 bei ungepaartem zweiseitigem t-Test jeweils zwischen SLy1^{WT} und entsprechendem SLy1^{KO}. #p ≤ 0,05 bei einfaktorierter Varianzanalyse zwischen den SLy1^{KO}-Gruppen mit *Dunnett's post-hoc* Test mit Vergleich von p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. p53^{WT}/Lck-Cre⁺ jeweils zu p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺.

ERGEBNISSE

Zusammenfassend lässt sich zum einen feststellen, dass eine p53-Defizienz mit einer deutlich erhöhten Gesamtzellzahl im Thymus einhergeht, wobei in SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen in allen Thymozytenstadien (DN, DP und SP als auch CD4SP und CD8SP) die absolute Zellzahl signifikant höher ist als in den SLy1^{WT}-Kontrollmäusen SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺.

Zum anderen lässt sich feststellen, dass eine SLy1-Defizienz im Thymus zu einer Reduktion der Gesamtzellzahl und dabei zu einer Reduktion der absoluten Zellzahl der DP- und SP-Population führt. Diese Veränderungen zeigten sich sowohl bei einer p53-Expression als auch bei einer p53-Defizienz.

Ebenso fand sich in der Milz von SLy1-defizienten Mäusen bei durchschnittlich reduzierter Gesamtsplenozytenzahl eine Reduktion der absoluten T- sowie B-Zellzahl, wobei der Anteil der T- und B-Zellpopulation unverändert vorlag. Auch diese Veränderung zeigte sich unabhängig vom p53-Kontext, wobei die Daten des Genotyps SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ keine Signifikanzen erlangten. In den Lymphknoten war bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ die Zellzahl reduziert, bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ und SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Auffällig war sowohl im Thymus als auch in den Lymphknoten ein vergrößerter Anteil an CD8-positiven Thymozyten bzw. T-Zellen bei SLy1-Defizienz.

3.2.5 Mögliche Veränderungen im Thymus einer Maus mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Wie bereits oben beschrieben, treten bei p53-defizienten Mäusen im Alter von 4 – 6 Lebensmonaten Tumore auf, wobei in global p53-defizienten Mäusen v.a. T-Zell-Lymphome im Thymus mit CD4⁺CD8⁺-Zellen beschrieben werden (Klusmann *et al.*, 2016; Dudgeon *et al.*, 2014; Donehower *et al.*, 1995; Donehower *et al.*, 1992).

Im Alter von 21 Wochen fiel eine Maus des Genotyps SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ mit einem schlechten Allgemeinzustand auf (struppiges Fell, apathisches Verhalten). Es wurden Thymus, Lymphknoten, Milz und das Knochenmark präpariert. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert bezüglich ihrer Lichtstreuungseigenschaften FSC und SSC sowie im Thymus bezüglich der Thymozytenpopulationen (DN, DP, CD4SP, CD8SP). Als Kontrolle wurde direkt eine 21 Wochen alte Maus mit dem Genotyp SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ mitpräpariert und untersucht.

Die Kontrollmaus zeigte keine Auffälligkeiten. Der Thymus dieser Maus war 1 cm groß (Abb. 35A). Bei der Maus des Genotyps SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ wurde eine mediastinale Raumforderung im Sinne eines deutlich vergrößerten Thymus mit 1,6 cm festgestellt, wobei das gesamte Mediastinum ausgefüllt wurde (Abb. 35B).

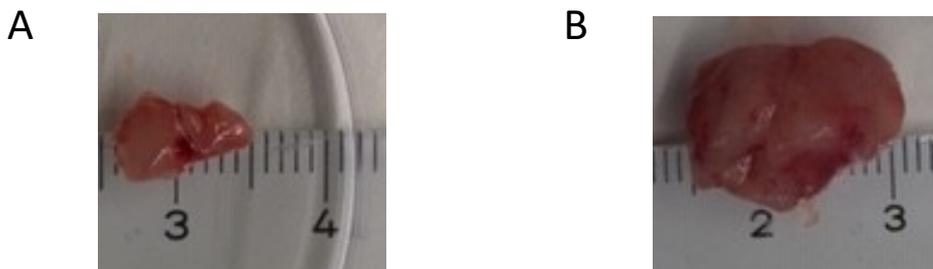


Abbildung 35: Veränderter Thymus einer SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus und Kontrollmaus. Thymus von einer **A.** SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus und **B.** SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus.

ERGEBNISSE

Die Gesamtzellzahl des Thymus der auffälligen Maus betrug mit $486,66 \times 10^6$ Zellen 7,6-mal so viel wie der Thymus der 21 Wochen alten $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus bzw. 6,5-mal so viel wie der Thymus der 25 Wochen alten Mäuse des Genotyps $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ (vgl. Tab. 14 und Tab. 15). Bei der mediastinalen Raumforderung dieser Maus handelte es sich somit um eine Hyperplasie. Bei der $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus ist anzumerken, dass die Gesamtzellzahl des Thymus deutlich geringer war als in den entsprechenden 25 Wochen alten Tieren (vgl. Tab. 14 und Tab. 15)

Tabelle 15: Zellzahl der lymphatischen Organe einer $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus und Kontrollmaus.

Daten geben die Zellzahl der verschiedenen lymphatischen Organe der Mäuse nach Genotyp im Alter von 21 Wochen in $\times 10^6$ an.

Genotyp	Thymus	Milz	LN	BM
$SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$	64,33	101,5	2,76	8,33
$SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$	486,66	45,33	0,97	16

Die Lichtstreuungseigenschaften der Zellen wurden entsprechend Kapitel 3.2.2 untersucht (Abb. 36). Die isolierten Zellen aus dem Thymus der $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus zeigten neben einer deutlichen Zunahme der Zellzahl morphologische Veränderungen (Abb. 36B). Ein Teil der Zellen war vergrößert (FSC), ein anderer Teil der Zellen wies eine Zunahme in der Komplexität des Zytoplasmas (SSC) auf.

Abbildung 37 zeigt die auffällige Verteilung der Thymozytenpopulationen bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ im Vergleich zur Kontrollmaus. Bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ war der Anteil an DN-Thymozyten und CD8SP-Thymozyten vergrößert, der Anteil an DP-Thymozyten sowie der CD4SP-Thymozyten hingegen reduziert. Diese Veränderungen waren unabhängig von der Wahl des Lymphozytengates (siehe Anhang).

Von einer weiteren Einteilung in die DN-Subpopulationen DN1 - DN4 wurde abgesehen (Daten nicht gezeigt).

ERGEBNISSE

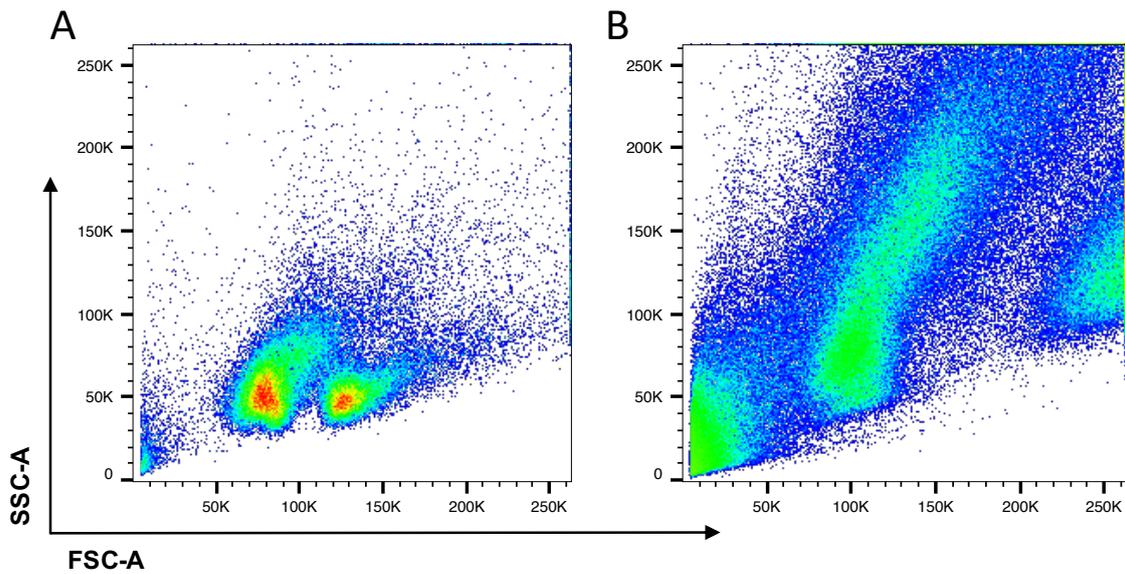


Abbildung 36: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen aus dem Thymus anhand von FSC-A und SSC-A von einer $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus und Kontrollmaus.

A. $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ und **B.** $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$. Die Abbildungen zeigen die durchflusszytometrische Analyse der Thymozyten.

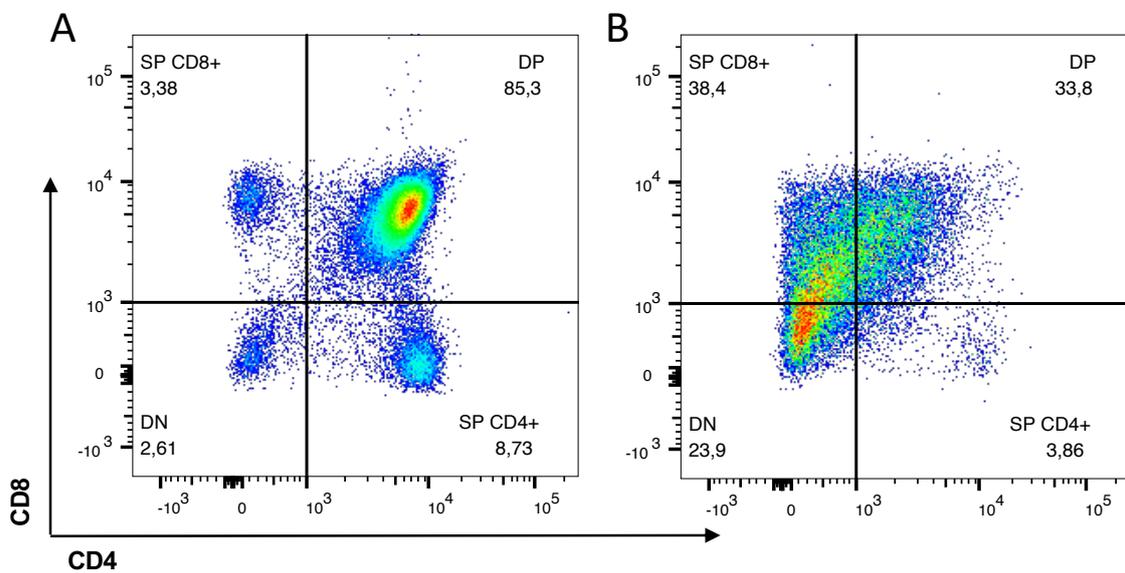


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellpopulationen DN, DP und SP aus dem Thymus einer $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus und Kontrollmaus.

DN-, DP- und SP-Thymozyten **A.** von $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ und **B.** von $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$. Die Abbildungen zeigen die durchflusszytometrische Analyse der Thymozyten. Die Grundpopulation ist entsprechend Kapitel 3.2.2 gewählt.

ERGEBNISSE

Die Zellen der Milz und der inguinalen Lymphknoten wurden nur auf ihre Lichtstreuungseigenschaften SSC und FSC hin untersucht. Wie in Abbildung 38 in der Milz und im Lymphknoten für die Peripherie gezeigt, ließen sich keine morphologischen Veränderungen in der SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus erkennen. Die Veränderung der Zellen schien sich auf den Thymus zu beschränken.

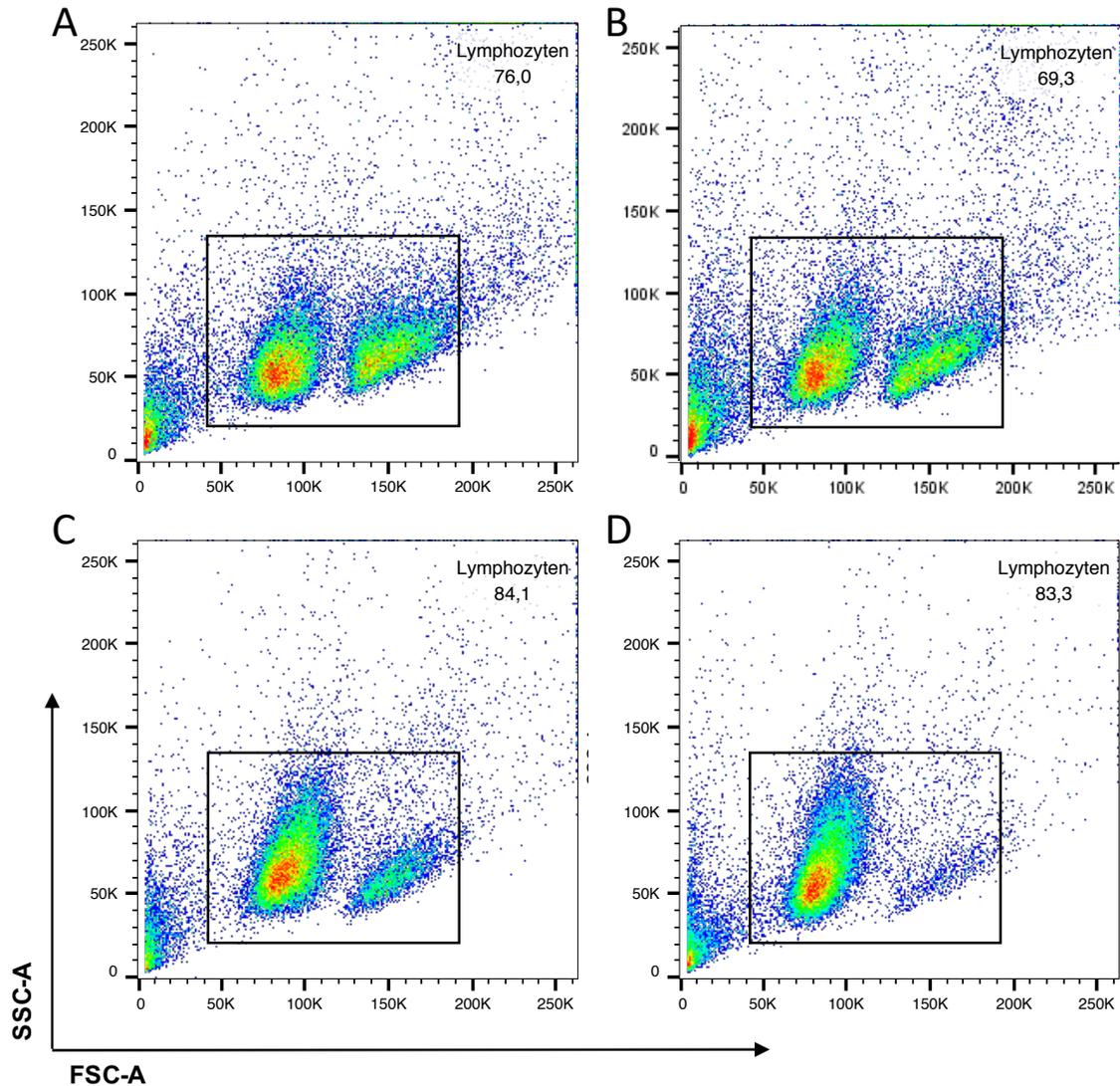


Abbildung 38: Durchflusszytometrische Bestimmung von FSC-A und SSC-A der Zellen aus der Milz und den Lymphknoten einer SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus und Kontrollmaus.

Zellen aus der Milz von **A.** SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und **B.** SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ sowie Zellen aus den LN von **C.** SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und **D.** SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ mit lymphozytenspezifischer Lichtstreuung. Die Abbildungen zeigen die durchflusszytometrische Analyse der Zellen.

4 DISKUSSION

4.1 Analyse des p53-Signalwegs in Mäusen mit SLy1-Knockout

Als Reaktion auf intolerablen Zellstress bei Replikation oder bei DNA-Schäden findet eine Akkumulation von p53 über die Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 statt, wobei p53 als Transkriptionsfaktor für weitere zellzyklusregulierende Gene wirkt (Hubackova *et al.*, 2020). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass bei einer SLy1-Defizienz der Tumorsuppressor p53 in Gesamthymozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant hochreguliert ist. Diese Hochregulation konnte mit einer erhöhten Expression der Kinasen ATM, ATR, CHK1 und CHK2 in Verbindung gebracht werden, welche ebenfalls sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene vermehrt vorlagen. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass eine SLy1-Defizienz in Thymozyten zu erhöhten p53-Level aufgrund von Replikationsstress oder DNA-Schäden führt (Abb. 39).

Zum einen scheint die Aktivierung von p53 auf Proteinebene stattzufinden, denn die Proteinlevel der Kinasen ATR und ATM deuten darauf hin, dass beide Proteine aktiviert werden und akkumulieren. Dies scheint wiederum die Checkpoint-Kinasen CHK1 sowie CHK2 zu aktivieren, welche ebenfalls akkumulieren. ATR, ATM, CHK1 und CHK2 führen letztendlich zu einer verstärkten Akkumulation von p53 in SLy1-defizienten Thymozyten. Um die Kausalität zwischen der Hochregulation der Kinasen und p53 letztendlich beweisen zu können, müssen im Weiteren die Phosphorylierungslevel der einzelnen Kinasen und die Phosphorylierungsstellen von p53 untersucht werden. Denn die Regulation von p53 sowie die Aktivierung der Signalkaskade aus ATR, ATM, CHK1 und CHK2 erfolgt auf Proteinebene durch *posttranslationale* Phosphorylierung, wobei die Phosphorylierungsstellen an p53 spezifisch für verschiedene Kinasen sind (Hubackova *et al.*, 2020).

Zum anderen scheint die Aktivierung von p53 bei SLy1-Defizienz *transkriptional* stattzufinden, da des Weiteren eine Erhöhung der mRNA von p53 und den Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 festzustellen war. Eine *transkriptionale* Aktivierung von p53 wird in der Literatur u.a. bei DNA-Schäden über das RNA-Polymerase-II-Bindungsprotein Che-1 beschrieben, wobei die Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von Che-1

DISKUSSION

führen und Che-1 wiederum als Transkriptionsfaktor für p53 fungiert (Bruno *et al.*, 2006). Bruno *et al.* (2006) konnten hierbei nach Induktion eines DNA-Schadens mittels des Anthracyclins Doxorubicin in HCT116-Zellen eine Phosphorylierung von Che-1 nachweisen, wobei Che-1 als Substrat von ATM und CHK2 beschrieben wird. Diese Phosphorylierung führt wiederum zu erhöhten mRNA-Level von p53 und Zielgenen wie p21 und einem Zellzyklusstopp bei G2/M. Ein DNA-Schaden induziert hierbei eine *posttranslationale* Modifikation (Phosphorylierung) von Che-1, aber keine gesteigerte Transkription bzw. keine erhöhten Che-1 mRNA-Level. Gleichzeitig konnten bei einer Überexpression von Che-1 in NIH3T3-Zellen erhöhte mRNA-Level von p53 und seinen Zielgenen beobachtet werden. Nach Doxorubicin-Behandlung konnte in diesen Zellen zudem eine Reduktion der Phosphatase CDC25c festgestellt werden, welche wichtig für den Eintritt in die Mitose ist. Um diese Kausalität in den SLy1-defizienten Zellen weiter zu untersuchen, müsste die Expression von Che-1 bzw. die Phosphorylierung von Che-1 in SLy1-defizienten Thymozyten analysiert werden. Hubackova *et al.* (2020) konnten zudem eine erhöhte Transkription von u.a. ATR, ATM und CHK2 bei Replikationsstress nachweisen, wobei der Replikationsstress durch eine fehlende DHODH-Pyrimidinbiosynthese durch Transplantation von mtDNA-depletierten 4T1p-Zellen in Balb/c-Mäuse ausgelöst wurde (Hubackova *et al.*, 2020).

Eine Aktivierung von p53 wird des Weiteren durch eine Inhibierung der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 beschrieben. Hubackova *et al.* (2020) konnten nach einer Replikationsstressinduktion mittels einer Pyrimidinsyntheseinhibierung durch Leflunomid zum einen eine Aktivierung von CHK1 und CHK2 über eine vermehrte Phosphorylierung sowie erhöhte p53- und phosphorylierte p53-Protein-Level nachweisen. Zum anderen wurde durch die Pyrimidinsyntheseinhibierung ein ribosomaler Stress in den Zellen induziert, welcher ribosomale Proteine wie RPL5 und RPL11 an Mdm2 binden ließ, Mdm2 inhibierte und dadurch p53 stabilisierte, wobei erhöhte Mdm2-Proteinlevel und eine reduzierte Mdm2-Ubiquitinierung von p53 beobachtet werden konnten. Des Weiteren konnten Arefanian *et al.* (2016) auch bei SLy1-defizienten NK-Zellen eine Aktivierung von

DISKUSSION

p53 bei einer ribosomalen Instabilität nachweisen, welche über einen reduzierten Mdm2-vermittelten p53-Abbau zu erhöhten p53-Leveln in der Zelle führt. Es wurden in SLy1-defizienten NK-Zellen erhöhte p53-Level, eine vermehrte Bindung von RPL5 an Mdm2 und eine reduzierte Bindung von p53 an Mdm2 nachgewiesen. In T-Zellen konnten Arefanian *et al.* (2016) nur geringe Mengen an p53 nachweisen, so dass auf eine andere Rolle von SLy1 in T-Zellen geschlossen wurde. Da in der vorliegenden Arbeit in Thymozyten und T-Zellen jedoch eine erhöhte p53-Expression nachgewiesen werden konnte, sollte in diesem Zusammenhang weiterfolgend die Mdm2-Expressionslevel bei SLy1-defizienten Thymozyten untersucht werden, um eine mögliche Mdm2-Interaktion als Ursache für die erhöhten p53-Level abzuklären.

Zusammenfassend lässt sich bei einer SLy1-Defizienz in Thymozyten eine Erhöhung der p53-Expressionslevel beobachten. Diese erhöhten p53-Expressionslevel können auf molekularer Ebene auf eine Aktivierung über die Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 zurückgeführt werden, wobei diese Kinasen p53 sowohl auf *posttranslationaler* als auch auf *transkriptionaler* Ebene zu aktivieren scheinen. Die beteiligten Interaktionspartner sprechen hierbei für einen Replikationsstress bzw. DNA-Schäden, ausgelöst durch eine SLy1-Defizienz. Es müssen noch die Phosphorylierungslevel der Kinasen sowie p53, die Rolle des RNA-Polymerase-II-Bindungsproteins Che-1 sowie die Rolle von Mdm2 auf die Aktivierung von p53 untersucht werden.

Nachdem bei einer SLy1-Defizienz in Thymozyten eine Akkumulation von p53 nachgewiesen werden konnte, stellte sich weiter die Frage, ob diese Akkumulation mit einer Aktivierung des p53-Signalwegs einhergeht bzw. welche Zielgene von p53 bei einer SLy1-Defizienz aktiviert werden. In der Literatur werden als typische Zielgene von p53 für die Seneszenz p21 und für die Apoptose PUMA beschrieben (Klusmann *et al.*, 2016).

DISKUSSION

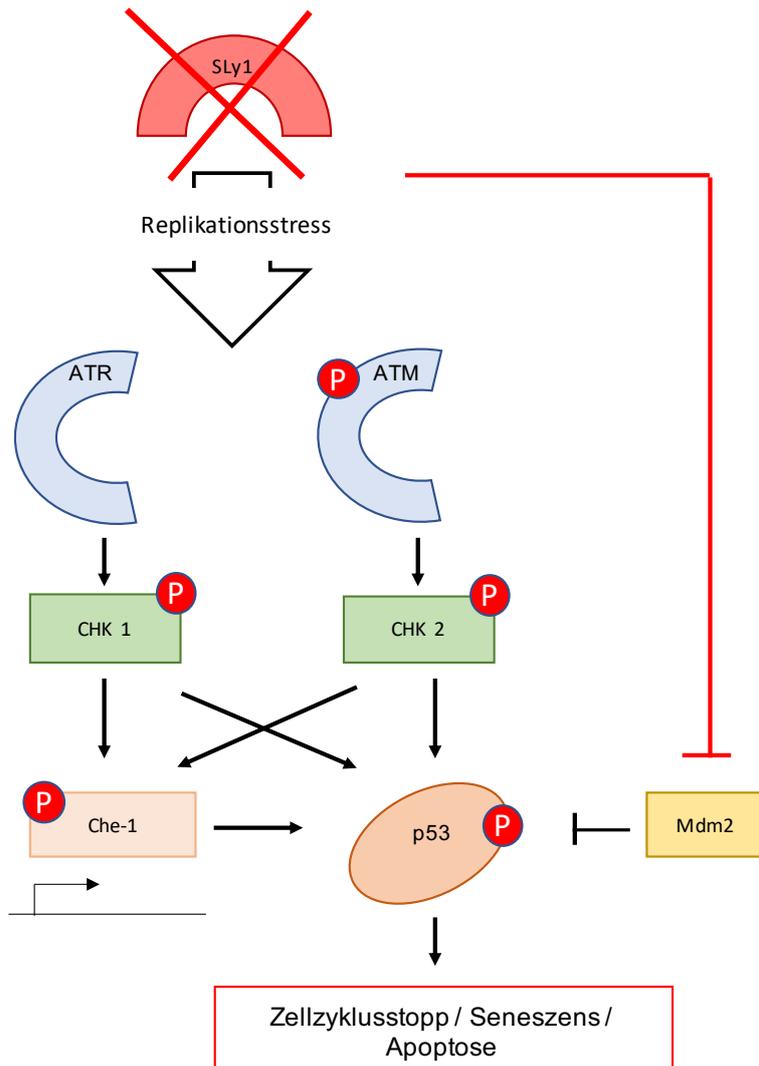


Abbildung 39: Zusammenhang einer SLy1-Defizienz und der Aktivierung des p53-Signalweg.

Eine SLy1-Defizienz könnte einen Replikationsstress im Thymozyten auslösen und somit den p53-Signalweg aktivieren. Nähere Informationen vgl. Abb. 3.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Zusammenhang mit der p53-Aktivierung tatsächlich eine Erhöhung des p53-Zielgens p21 auf mRNA-Level in der Gesamthymozytenpopulation beobachtet werden, was einerseits einen aktiven p53-Signalweg nachweist und andererseits einen Hinweis darauf gibt, dass SLy1-defiziente Thymozyten seneszent werden. In vorausgegangenen Arbeiten war bereits eine signifikant erhöhte Apoptoserate mittels AnnexinV-, DAPI- und Caspase3-Färbung *in vitro* in SLy1-defizienten Thymozyten im DN-Stadium

DISKUSSION

nachgewiesen worden (Reis *et al.*, 2009). Diese war jedoch zu gering, um als alleinige Ursache eine Reduktion der DP-Thymozyten um 50% zu erklären. Zudem konnte durch eine Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in SLy1-defizienten Mäusen der SLy1^{WT}-Phänotyp von Thymozyten mit normaler Zellularität nicht wiederhergestellt werden (Schäll, 2015). Hubackova *et al.* (2020) konnten bei Replikationsstressinduktion durch Pyrimidinsyntheseinhibition neben einem erhöhten p53-Signalweg ebenfalls einen Zellzyklusarrest, eine erhöhte p21-Expression sowie eine Seneszenzinduktion mittels erhöhter β -Galactosidaseaktivität nachweisen (Hubackova *et al.*, 2020).

Die reduzierte Zellzahl von Thymozyten in SLy1-defizienten Mäusen könnte somit durch den hochregulierten p53-Signalwegs erklärt werden, welcher eine erhöhte Apoptoserate sowie eine Seneszenz der Thymozyten bedingt. Um diese Theorie weiter abzuklären, müssen noch die Apoptosemarker PUMA auf mRNA- und Proteinebene sowie der Seneszenzmarker p21 auf Proteinebene untersucht werden. Außerdem sollte der direkte Nachweis einer möglichen Seneszenz in SLy1-defizienten Thymozyten z.B. mittels β -Galactosidasenachweis erfolgen.

Im Zusammenhang einer Seneszenz und dem veränderten p53-Signalweg konnte in SLy1-defizienten Gesamthymozyten eine signifikante Hochregulation von SOCS1 beobachtet werden. Dies ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Zum einen wird SOCS1 als Verstärker für die Aktivierung von p53 durch die Kinasen ATR, ATM und CHK2 im Thymus und in der Milz beschrieben (Calabrese *et al.*, 2009), wobei in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass bei einer SLy1-Defizienz eine Aktivierung von p53 über diese Kinasen stattzufinden scheint. Zum anderen beschreiben Calabrese *et al.* (2009) eine Hochregulation von SOCS1 zusammen mit einem konstitutiv aktiven STAT5A und der Induktion einer Seneszenz. Dabei konnte unsere Arbeitsgruppe in SLy1-defizienten Thymozyten eine erhöhte Phosphorylierung von STAT5A mittels Durchflusszytometrie nachweisen (Kloos, 2021), wobei eine Aktivierung von STAT5 durch den IL-7-Signalweg erfolgt (Ribeiro *et al.*, 2018).

Des Weiteren konnte in SLy1-defizienten Thymozyten eine erhöhte Expression des IL-7R α auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Kloos,

2021; Schäll, 2015). Die vermehrte Phosphorylierung von STAT5 in SLy1-defizienten Thymozyten weist dabei auf einen tatsächlich vermehrt aktiven IL-7R-Signalweg hin. Die IL-7-Zytokinkonzentrationen im Serum von SLy1-defizienten Mäusen und ihrer Kontrollgruppen in der vorliegenden Arbeit waren jedoch zu niedrig, um detektiert werden zu können (Daten nicht gezeigt).

Zuletzt wird in der Thymozytenentwicklung für SOCS1 eine für die Differenzierung entscheidende, gegenregulatorische Rolle zum IL-7R beschrieben (Singer *et al.*, 2008). Damit könnten die beobachteten SOCS1-Level bei einer SLy1-Defizienz in der vorliegenden Arbeit reaktiv durch einen verstärkt aktiven IL-7R-Signalweg bedingt sein. Um weiter abzuklären, ob höhere SOCS1-Proteinlevel als Gegenregulation von vermehrt exprimierten IL-7R α -Leveln auftreten, fehlen hierbei noch der Nachweis von IL-7R α sowie von SOCS1 auf Proteinebene.

Es scheint somit einen Zusammenhang zwischen einer SLy1-Defizienz, dem p53-Signalweg und dem IL-7R-Signalweg zu geben, wobei SOCS1 als Schlüsselmolekül zwischen den Signalwegen fungieren könnte.

4.1.1 Nachweis des p53-Signalwegs in DN- und DP-Thymozyten sowie in T-Zellen von Mäusen mit SLy1-Knockout

Da die DP-Population mit ca. 80% den größten Teil der Gesamthymozytenpopulation ausmacht (Hayday & Pennington, 2007), erfolgten weitere Analysen der DN- und DP-Zellen sowie der T-Zellen auf mRNA-Ebene und bei der DN-Population zusätzlich auf Proteinebene.

Die mRNA- und Proteinlevel von p53 bei SLy1-Defizienz waren im DN-Stadium unverändert, im DP-Stadium sowie in den reifen peripheren T-Zellen der Milz konnte aber eine signifikante Erhöhung der p53-mRNA-Expression beobachtet werden (Abb. 40).

Es bleibt zu klären, warum in DN-Thymozyten bei einer SLy1-Defizienz weder eine Veränderung der p53-Level auf mRNA- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, zumal in DN-Thymozyten die Kinasen ATR und ATM sowie CHK1 auf Proteinebene signifikant erhöht waren. Der Vergleich der mRNA-Expressionslevel des p53-Signalwegs in SLy1^{WT}-Mäusen zwischen den

DISKUSSION

einzelnen Thymozytenpopulationen DN und DP sowie den T-Zellen konnte eine erhöhte mRNA-Expression von p53 und den beteiligten Kinasen im DN-Stadium (SLy1^{WT}-DN) im Vergleich zu SLy1^{WT}-DP und SLy1^{WT}-T-Zellen zeigen. Die Hochregulation im DN-Stadium kann im Zusammenhang mit einer allgemein erhöhten Proliferation und einem erhöhten Replikationsstress in diesem Stadium stehen.

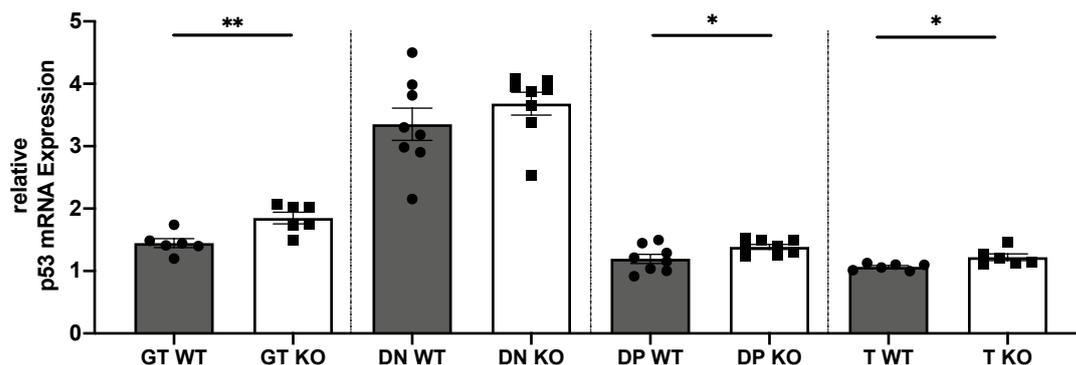


Abbildung 40: p53-mRNA-Expression in Thymozyten bzw. T-Zellen von SLy1^{WT/KO}-Mäusen.

Graph zeigt einzelne Werte relativ zu β -Aktin und Mittelwerte \pm SEM von $n = 6 - 8$ Mäusen; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ungepaarter zweiseitiger t-Test jeweils zwischen SLy1^{WT} und entsprechendem SLy1^{KO}.

Ein mögliches Erklärungsmodell für die Beobachtungen bei SLy1-defizienten DN-Thymozyten könnte somit ein Maximum der Transkriptionskapazität von p53 und den Kinasen sein. Eine Hochregulation des p53-Signalwegs bei SLy1-defizienten DN-Thymozyten wäre dann nur noch durch eine erhöhte Translationsrate oder *posttranslationale* Modifikation möglich.

Des Weiteren zeigten die mRNA-Level der Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 in der DN-, DP- sowie T-Zellpopulation keine signifikante Veränderung bei einer SLy1-Defizienz. Aufgrund der signifikanten Hochregulation bei den Gesamthymozyten kann hierbei jedoch von einem kumulativen Effekt über alle Thymozytenentwicklungsstadien ausgegangen werden.

Bei der Untersuchung der p53-Effektorproteine konnte interessanterweise auf mRNA-Ebene beobachtet werden, dass die Phosphatase CDC25c, welche für eine Induktion der Mitose im Zellzyklus eine Rolle spielt (Bruno *et al.*, 2006), im

DISKUSSION

DP-Stadium, dem Stadium mit der größten Zellzahl, reduziert vorlag. Bei Bruno *et al.* (2006) wird ebenfalls eine Reduktion der Phosphatase CDC25c im Zusammenhang mit Replikationsstress beobachtet. Diese Beobachtung stützt somit die These, dass es bei einer SLy1-Defizienz zu einem p53-induzierten Zellzyklusstopp kommt und die Reduktion der Zellularität bei einer SLy1-Defizienz im Zusammenhang mit einem verlangsamten Zellzyklus im Kontext eines Replikationsstress steht.

Zusammenfassend scheint die bereits in vorangegangenen Arbeiten beobachtete reduzierte Thymozytenzahl u.a. durch die Hochregulation des p53-Signalwegs durch die Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 erklärt werden zu können. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass die reduzierte Zellzahl bei einer SLy1-Defizienz neben einer erhöhten Apoptoserate durch einen Zellzyklusstopp und eine Seneszenz bedingt sein könnte. Dabei ist die Ursache für die p53-Aktivierung in SLy1-defizienten Thymozyten noch unklar. Während in SLy1-defizienten NK-Zellen bereits eine ribosomale Instabilität als Ursache für eine p53-Hochregulation nachgewiesen werden konnte (Arefanian *et al.*, 2016), könnte in Thymozyten die Ursache für die p53-Hochregulation ein möglicher Replikationsstress bei SLy1-Defizienz sein. Für diese These spricht zudem die lokalisationsabhängige Funktionalität von SLy1. Replikationsstress findet im Nukleus statt und für SLy1 ist eine Rolle im Nukleus nachgewiesen worden. Durch die SLy1^A-Mutation liegt das Protein nur im Zytoplasma vor und kann nicht in den Nukleus verlagert werden (Beer *et al.*, 2005). In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp einer SLy1^A-Maus mit einer SLy1^{KO}-Maus vergleichbar ist, womit das Fehlen von SLy1 im Nukleus ursächlich für die reduzierte Thymozytenzahl zu sein scheint (Reis *et al.*, 2009). Somit könnte das Fehlen von SLy1 einen Replikationsstress in der Zelle und dadurch eine Hochregulierung des p53-Signalwegs bedingen. Dies könnte dann durch einen Zellzyklusstopp, einen verlangsamten Zellzyklus, Apoptose sowie Seneszenz *indirekt* zu einer reduzierten Thymozytenpopulation führen. Es bleibt noch zu klären, ob die SLy1-Defizienz zusätzlich *direkt* ein Proliferationsdefizit bewirkt.

4.2 Analyse der T-Zellentwicklung in Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Unter der Annahme, dass eine SLy1-Defizienz v.a. *indirekt* über die verstärkte Aktivierung des p53-Signalwegs mit Zellzyklusstopp, Apoptose und Seneszenz zu einer Zellzahlreduktion führt, müsste ein spezifisches Ausschalten von p53 in Thymozyten bei einer SLy1-Defizienz zu einer Umgehung des reaktiven Stopps des Zellzyklus und somit zu einer Normalisierung der Thymozytenzahl führen. Zum anderen könnte SLy1 *direkt* eine Rolle als Regulator von Proliferationsfaktoren im Nukleus haben, wobei ein Ausschalten des p53-Signalwegs keinen Einfluss auf die reduzierte Thymozytenzahl bei SLy1-Defizienz hätte.

Tatsächlich konnten die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die reduzierte Zellzahl bei einer SLy1-Defizienz durch ein zusätzliches Ausschalten von p53 nicht korrigiert werden kann und eine SLy1-Defizienz folglich nicht nur *indirekt* über eine Aktivierung des p53-Signalweg, sondern auch *direkt* zu einer Reduktion der Zellzahl führt.

4.2.1 Das Mausmodell mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Der konditionale Knockout für die T-Zell-spezifische p53-Defizienz erfolgte mittels Cre-Rekombinase, welche am Promotor der Tyrosin-Kinase Lck lokalisiert wurde, sowie einer flankierenden LoxP-Insertion an beiden p53-Allelelen.

Um die Auswirkung einer p53-Defizienz auf die Thymozytenentwicklung zu untersuchen, ist ein Mausmodell nötig, welches bereits im DN-Stadium die Cre-Rekombinase exprimiert, was für das Lck-Cre-Mausmodell zutrifft, wie Carow, Gao, Coquet, Reilly und Rottenberg (2016) belegen. In ihrer Publikation von 2016 analysieren Carow *et al.* die Auswirkungen einer Expression der Cre-Rekombinase am Promotor der Lck in C57BL/6 Mäusen auf den Thymus, die Milz sowie die Lymphknoten. Dabei konnte eine Expression der Lck-Cre bereits ab dem DN-Thymozytenstadium nachgewiesen werden. Außerdem unterstreichen diese Ergebnisse die Wichtigkeit des Vergleichs zwischen SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und der Kontrollgruppe SLy1^{WT/KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺, da

so der p53-Effekt unabhängig von Störeffekten durch die Insertion der Cre-Rekombinase untersucht werden kann. So konnten im Thymus von Lck-Cre⁺-Tieren u.a. eine Reduktion der Zellzahl auf 65%, ein vergrößerter Anteil der DN-Population und der CD8SP-Population sowie ein reduzierter Anteil der DP-Population im Vergleich zu Lck-Cre⁻-Tieren nachgewiesen werden (Carow *et al.*, 2016). Diese Veränderungen sind interessanterweise ähnlich den Veränderungen bei einer globalen SLy1-Defizienz.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in den Kontrollgruppen SLy1^{WT/KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT/KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ die von Reis *et al.* (2009) beschriebenen Veränderungen einer SLy1-Defizienz nachvollzogen werden können, womit Vergleiche zwischen SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ und den Kontrollgruppen SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ Rückschlüsse auf den Einfluss einer p53-Defizienz auf einen SLy1-Knockout zulassen.

4.2.2 Analyse der Zellzahl im Thymus von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

In der vorliegenden Arbeit konnte die von Reis *et al.* (2009) vorbeschriebene Reduktion der Zellzahl im Thymus bei SLy1-Defizienz bestätigt werden. Diese Reduktion konnte bei SLy1^{KO}-Mäusen im Alter von 8 – 12 Wochen (Kapitel 3.1.1), bei den Kontrollmäusen SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ im Alter von 25 Wochen wie auch bei SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ (Kapitel 3.2.1) festgestellt werden. Gleichzeitig war kein signifikanter Unterschied zwischen der Zellzahl bei SLy1-Knockout mit p53-Defizienz (SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺) und der Zellzahl bei SLy1-Defizienz mit p53-Expression (SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺) nachweisbar.

Im Thymus von 25 Wochen alten, p53-defizienten Mäusen mit unveränderter SLy1-Expression (SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Mäusen) fiel eine signifikant vergrößerte Zellzahl im Vergleich zu SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ auf. Diese erhöhte Zellzahl könnte im Sinne einer Hyperplasie auf ein mögliches Tumorgeschehen bei diesem Genotyp hinweisen. Einen Hinweis hierfür liefert die Publikation von Donehower *et al.* von 1995.

Donehower *et al.* (1995) hatten bei globalen p53-Knockout-Mäusen der Mauslinie C57BL/6 x 129/Sv ein spontanes Auftreten von Lymphomen im Alter von durchschnittlich 20 Wochen feststellen können, wobei v.a. T-Zell-Lymphome im Thymus nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit diese erhöhte Zellzahl bei gleichzeitiger SLy1-Defizienz in p53-defizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass eine SLy1-Defizienz protektiv gegenüber einem Tumorgeschehen wirkt. Dagegen spricht jedoch, dass in der vorliegenden Arbeit eine Maus vom Genotyp SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ mit einer medialen Raumforderung auffiel (siehe Kapitel 4.2.5). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Protein SLy1 als Regulator von Proliferationsfaktoren wirkt und eine SLy1-Defizienz somit ein Proliferationsdefizit bedingt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zellzahlreduktion bei SLy1-Defizienz durch eine p53-Defizienz nicht korrigiert werden kann. Eine SLy1-Defizienz führt unabhängig vom Alter der Mäuse und einer p53-Defizienz zu einer Zellzahlreduktion im Thymus.

4.2.3 Analyse der Thymozytenpopulationen im Thymus von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Eine SLy1-Defizienz führt im Thymus bei reduzierter Gesamtzellzahl zu einer Reduktion der absoluten Zellzahl der DP- und SP-Population bei erhöhtem Anteil der DN-Population an der Gesamthymozytenpopulation. Diese Veränderungen zeigten sich bei einer p53-Expression, bei einer p53-Defizienz sowie bei Reis *et al.* (2009). Da der Anteil der DP-Population an der Gesamthymozytenpopulation 75 - 88% und der Anteil der DN-Population lediglich 1 - 2% ausmacht (Hayday & Pennington, 2007), führt eine Reduktion der DP- sowie SP-Zellzahl schnell zu einer deutlichen Reduktion der Gesamthymozytenpopulation. Eine eingeschränkte Zellzahl der DP- sowie SP-Zellen führt wiederum zu einem vergrößerten Anteil der DN-Population. Die DN-Population könnte zudem aufgrund eines Feedbackmechanismus bei reduzierter DP- und SP-Zellzahl vergrößert vorliegen.

DISKUSSION

Der einzige Unterschied zwischen $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ und $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^-$ bzw. $SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre^+$ sowie den Ergebnissen von Reis *et al.* (2009) zeigte sich in der DN-Population. Hier konnte kein signifikanter Unterschied beim Anteil der DN-Population bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ im Vergleich zu $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ nachgewiesen werden und die absolute Zellzahl schien entgegen den Ergebnissen von Reis *et al.* (2009) bei einer $SLy1$ -Defizienz nicht vergrößert, sondern tendenziell reduziert. Eine Kodefizienz von $SLy1$ und $p53$ scheint in allen Thymozytenstadien (DN, DP und SP) zu einer Reduktion der absoluten Zellzahl im Vergleich zu entsprechenden $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Tieren zu führen.

Somit fanden sich unter Bedingungen mit erhöhter Zellzahl, sprich grundsätzlich bei $p53$ -Defizienz oder bei der DP-Population, die absolute Zellzahl bei $SLy1$ -Defizienz reduziert. Neben dem von Reis *et al.* (2009) postulierten Defizit beim Übergang vom DN- zum DP-Stadium lässt sich somit ein genereller, hemmender Effekt auf die Proliferation bei einer $SLy1$ -Defizienz vermuten.

Zugleich kann der bei einer $SLy1$ -Defizienz hochregulierte $p53$ -Signalweg (siehe Kapitel 4.1.1) als alleinige Ursache für die Reduktion der Thymozyten ausgeschlossen werden, da eine zusätzliche $p53$ -Defizienz die Zellzahlreduktion einer $SLy1$ -Defizienz nicht korrigieren konnte.

Das Protein $SLy1$ spielt nicht nur in der Thymozytenentwicklung eine Rolle. In der Milz konnte bei $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ keine Signifikanz erreicht werden, doch auch hier scheint unabhängig vom $p53$ -Kontext eine Reduktion der T- sowie der B-Zellzahl durch eine $SLy1$ -Defizienz vorzuliegen. In vorausgegangenen Arbeiten war zudem eine reduzierte Proliferation von peripheren T-Zellen nach TZR-Stimulation (Reis, 2007) sowie nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* nachgewiesen worden, welche zu einer schlechteren Infektabwehr bei $SLy1$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollmäusen geführt hatte (Schäll *et al.*, 2015).

DISKUSSION

Grundsätzlich kommen als Ursachen für ein Zellzahndefizit entweder eine erhöhte Apoptoserate, ein Proliferationsdefizit (verlangsamter Zellzyklus oder Seneszenz) oder beides zugleich in Frage. Reis *et al.* (2009) hatten bereits eine antiapoptotische Rolle für das Protein SLy1 postuliert. In SLy1^{KO}-DN-Thymozyten waren mittels AnnexinV-Färbung bereits erhöhte Apoptoseraten im DN-Stadium festgestellt worden (Reis *et al.*, 2009). Zugleich fand sich mittels Caspase-3-Färbung eine erhöhte Apoptoseinduktion im DN3-Thymozytensubstadium, wobei auf eine antiapoptotische bzw. protektive Funktion von SLy1 im DN3-Stadium bei der β -Selektion geschlossen wurde (Reis *et al.*, 2009). Zudem konnte in kultivierten SLy1^{KO}-DN-Thymozyten eine um 50% reduzierte Proliferation nachgewiesen werden und die Differenzierung von DN zu DP schien verlangsamt (Reis *et al.*, 2009). Das Protein SLy1 könnte somit neben einer antiapoptotischen Rolle als Regulator von Proliferationsfaktoren fungieren und eine SLy1-Defizienz somit ein Proliferationsdefizit bedingen.

Des Weiteren wird die Differenzierung von der Progenitorzelle zum DN-Thymozyten, zum DP-Thymozyten und schließlich zum SP-Thymozyten und zur peripheren T-Zelle durch eine SLy1-Defizienz nicht vollständig beeinträchtigt. Es konnten bei einer SLy1-Defizienz unabhängig vom p53-Kontext alle Stadien der Thymozytenentwicklung bzw. T-Zellen nachgewiesen werden, wobei jedoch eine vergrößerte CD8SP- bzw. CD8⁺-T-Zellpopulation vorzuliegen schien (Kapitel 4.2.4).

Zusammenfassend folgt daraus, dass SLy1-defiziente Mäuse lediglich durch ihre reduzierte T-Zellzahl eine Immunschwäche in Infektionsversuchen zeigen (Schäll *et al.*, 2015), wobei sich SLy1-defiziente Thymozyten bzw. T-Zellen normal differenzieren und eine normale Funktionalität aufweisen. Die reduzierte Zellzahl bei SLy1-Defizienz ist dabei durch zwei Dinge zu erklären. Die SLy1-Defizienz führt *indirekt* über einen aktivierten p53-Signalweg zu einer reduzierten Zellzahl, wobei es in der Folge zu Apoptose sowie zum Zellzyklusstopp u.a. durch die Herunterregulierung von CDC25c bzw. die Hochregulierung von p21 kommt. Die Hochregulierung von p21 gibt einen Hinweis darauf, dass die Thymozyten

DISKUSSION

seneszent werden (Klusmann *et al.*, 2016), wobei dies stadienübergreifend geschieht (entsprechend dem Nachweis in Gesamthymozyten). Gleichzeitig muss die reduzierte Zellzahl aber auch *direkt* auf die SLy1-Defizienz zurückzuführen zu sein, da das Ausschalten des p53-Signalwegs keine Normalisierung des SLy1-defizienten Phänotyps erreichen konnte. Somit scheinen mehrere Faktoren zugleich das Zelldefizit bei SLy1-Defizienz zu bedingen: Eine p53-bedingte erhöhte Apoptoserate, eine erhöhte Seneszenzrate sowie eine direkte Rolle von SLy1 als Regulator von Proliferationsfaktoren, welche für eine normale Proliferation von Thymozyten nötig wären.

4.2.4 CD4SP- vs. CD8SP-Thymozyten von Mäusen mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Bei einer SLy1-Defizienz lagen relativ mehr CD8SP-Thymozyten im Thymus vor als bei SLy1^{WT}. Diese Veränderung konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl bei einer T-Zell-spezifischen p53-Defizienz (SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺) als auch bei den Kontrollmäusen des Genotyps SLy1^{KO}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺ beobachtet werden. Auch in der Publikation von Reis *et al.* (2009) war die CD8SP-Thymozytenpopulation durch eine SLy1-Defizienz vergrößert. Interessanterweise konnte zudem in der vorliegenden Arbeit ein signifikant größerer Anteil an CD8⁺-T-Zellen in den Lymphknoten von SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ als auch von SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ nachgewiesen werden. In seiner Dissertationsschrift beschreibt Reis (2007) ebenfalls eine leicht vergrößerte CD8⁺-T-Zellpopulation in der Milz. Die Hochregulierung des p53-Signalwegs in SLy1^{KO}-Mäusen scheint somit bei der veränderten Differenzierung zu CD8SP- vs. CD4SP-Zellen nicht ursächlich zu sein.

Bei der Entscheidung, ob ein DP-Thymozyt sich zu CD4SP oder CD8SP differenziert, handelt es sich um die sogenannte „CD4/CD8-Linienwahl“ (*lineage choice*). Ein Erklärungsmodell ist hierbei das „kinetische Signalmodell“ (Singer *et al.*, 2008). Singer *et al.* (2008) beschreiben bei diesem Modell, dass DP-Thymozyten die Positive Selektion durchlaufen, wobei lediglich jene Thymozyten überleben, welche einen funktionierenden TZR gebildet haben. Voraussetzung

DISKUSSION

ist hierbei, dass während der Positiven Selektion im DP-Stadium keine weiteren Überlebenssignale erfolgen (z.B. durch den IL-7R-Signalweg), um zu gewährleisten, dass ein Thymozyt ausschließlich über den TZR-Signalweg Überlebenssignale erhält und somit eine Selektion von Thymozyten nach der Funktionalität des TZR erfolgt. Daher wird ab dem DP-Stadium der IL-7R herunterreguliert und gleichzeitig SOCS1 als Suppressor von Zytokinsignalen hochreguliert (Singer *et al.*, 2008). Nach der erfolgreichen Positiven Selektion wird die CD8-Genexpression eingestellt und es wird nur der Oberflächenmarker CD4 und kein bzw. wenig CD8 exprimiert ($CD4^+CD8^{low}$). Diese Zwischenzellen sind weiterhin bipotent. Persistiert das TZR-Signal bei vorliegender CD8-Defizienz, entwickeln sich die Zwischenzellen zu CD4SP-Thymozyten bzw. $CD4^+$ -T-Zellen. Bleibt hingegen das TZR-Signal aus, entwickelt sich die Zelle zu einem CD8SP-Thymozyten bzw. einer $CD8^+$ -T-Zelle. Dabei ist die Zelle auf das Zytokin IL-7 angewiesen, welche die Zelle vor einem Zelltod schützt und ein sogenanntes „*CD8-Co-Receptor-Reversal*“ initiiert (Singer *et al.*, 2008). Die CD4-Transkription wird beendet und die CD8-Transkription wird wieder aufgenommen. Der IL-7-Signalweg führt dabei über STAT5 zu einer Enhanceraktivierung, welche zu einer CD8-Transkription führt (Singer *et al.*, 2008). Das Ausschalten des IL-7R-Inhibitors SOCS1 wird in der Literatur mit einer vergrößerten CD8-positiven Population beschrieben, während eine IL-7R-Hemmung durch einen IL-7R-Antikörper hingegen mit einer fehlenden CD8-Population einherging (Singer *et al.*, 2008; Brugnera *et al.*, 2000).

Vor dem Hintergrund, dass der IL-7R-Signalweg und SOCS1 als Gegenregulation entscheidende Rollen für die Thymozytenentwicklung spielen (Singer *et al.*, 2008) und der IL-7R-Signalweg sowie SOCS1 bei einer SLy1-Defizienz verändert vorliegen, ist die Beobachtung von Interesse, dass sich bei einer SLy1-Defizienz unabhängig von der p53-Expression relativ mehr Thymozyten zu CD8SP-Thymozyten bzw. $CD8^+$ -T-Zellen entwickeln. Dies könnte durch einen verstärkten IL-7R-Signalweg bedingt sein, welcher eine CD8-Differenzierung fördert, wobei gleichzeitig SOCS1 in Thymozyten (wie oben bereits beschrieben) reaktiv erhöht sein könnte.

4.2.5 Mögliche Veränderungen im Thymus einer Maus mit SLy1-Knockout und T-Zell-spezifischer p53-Defizienz

Tumore in p53-defizienten Mäusen treten im Alter von 4 – 6 Lebensmonaten auf, wobei in global p53-defizienten Mäusen v.a. T-Zell-Lymphome im Thymus mit CD4⁺CD8⁺-Zellen beschrieben werden (Klusmann *et al.*, 2016; Dudgeon *et al.*, 2014; Donehower *et al.*, 1995; Donehower *et al.*, 1992). Bei homozygot p53-defizienten Mäusen findet zunächst eine normale Entwicklung statt, wobei laut Donehower *et al.* (1992) mit einer Wahrscheinlichkeit von 75% innerhalb der ersten 6 Lebensmonate mit dem Auftreten von Tumoren zu rechnen ist und 70% aller homozygot p53-defizienten Mäuse ein Lymphom entwickeln. Donehower *et al.* (1995) untersuchten die p53-Defizienz in der Mauslinie 129/Sv sowie in der Mauslinie C57BL/6 x 129/Sv. In 129/Sv-Mäusen traten die Lymphome im Alter von 13 Wochen, bei C57BL/6 x 129/Sv-Mäusen im Alter von 20 Wochen auf. 75% der Lymphome konnten als T-Zell-Lymphome im Thymus und ein weiterer Teil als B-Zell-Lymphome in der Milz und in den Lymphknoten identifiziert werden (Donehower *et al.*, 1995). Durch die somatische Rekombination der Thymozyten im Thymus lassen sich T-Zell-Klone anhand ihres jeweiligen TZR bestimmen. Dudgeon *et al.* (2014) konnten hierbei eine deutliche Zunahme der Klonalität bei p53-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen beobachten (jeweils prozentualer Anteil des häufigsten Klons an der jeweiligen Thymuspopulation). Während im Thymus einer WT-Maus unabhängig von der Lebenswoche eine Klonalität zwischen 0,05% bis 0,17% beobachtet werden konnte, fand sich bei p53-defizienten Mäusen im Alter von 9 Wochen eine Klonalität von bis zu 21% und bei 20 Wochen alten Mäusen bis zu 70% (Dudgeon *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 10 Mäuse mit einer T-Zell-spezifischen p53-Defizienz untersucht, wobei 5 Mäuse vom Genotyp SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ waren. Diese Mäuse fielen durch eine signifikant vergrößerte Zellzahl sowohl im Thymus als auch im Knochenmark auf (im Vergleich zu SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁻ bzw. SLy1^{WT}/p53^{WT}/Lck-Cre⁺), wobei die Durchflusszytometrie keine signifikanten morphologischen Auffälligkeiten zeigte. Zusätzlich wurde eine Maus von diesem Genotyp SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ bereits im Alter von 21 Wochen untersucht, wobei lediglich $64,33 \times 10^6$ Zellen und damit

DISKUSSION

36% der Zellen verglichen mit den 25 Wochen alten Tieren desselben Genotyps nachgewiesen werden konnten. Dieser Unterschied zwischen einer 21 Wochen alten Maus und den 25 Wochen alten Mäuse könnte ein Hinweis darauf sein, dass Lymphome im Thymus bei $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ zwischen den Lebenswochen 21 und 25 auftreten. Ob bei diesen Mäusen jedoch tatsächlich ein Tumorgeschehen vorlag, kann nicht sicher geklärt werden, zumal lediglich eine einzige Maus mit 21 Wochen zum Vergleich vorlag. Es wäre weitergehend eine Analyse der Klonalität in Anlehnung an die Arbeit von Dudgeon *et al.* (2014) nötig.

Interessanterweise konnte in $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Mäusen die erhöhte Zellzahl im Thymus nicht nachgewiesen werden. Dennoch fiel eine Maus von gerade diesem Genotyp im Alter von 21 Wochen mit einer mediastinalen Raumforderung auf.

Die deutliche Thymusvergrößerung bei gleichzeitig erhöhter Zellzahl deutet bei dieser Maus vom Genotyp $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ auf eine Hyperplasie des Thymus hin. Dabei bleibt zu klären, welche Zellen im Thymus vermehrt waren. Neoplasien lassen sich nach der Zellmorphologie, nach dem Immunphänotyp der Zellen sowie nach genetischen Veränderungen klassifizieren (Stetler-Stevenson, 2003). Dabei zeichnen sich Lymphoblasten mit höheren FSC- als auch SSC-Werten aus (Li *et al.*, 2004). Bei den Zellen der mediastinalen Raumforderung konnte eine deutliche Zunahme der FSC- als auch der SSC-Werte nachgewiesen werden, wobei 39% bzw. 68% der Zellen für den Lymphozytenmarker CD90.2 positiv waren (je nach Wahl des FSC/SSC-Gates). Die Zellen schienen zudem vermehrt CD8 auf der Oberfläche zu exprimieren – entsprechend der allgemein beobachteten Veränderung bei $SLy1$ -defizienten Mäusen. Da des Weiteren das T-Zell-Lymphom als der am häufigsten gefundene Tumor bei $p53$ -Defizienz beschrieben wird (Donehower *et al.*, 1995), können die vorliegenden Daten somit auf ein Lymphom des Thymus mit lymphoblastischen $CD8^+$ -T-Zellen hinweisen. Zur sicheren Feststellung der Diagnose fehlen jedoch weitere lymphomspezifische Expressionsanalysen, wie der Verlust von PTEN oder die Überexpression von Cdk6, welche bei Lymphomen im Thymus von $p53$ -

DISKUSSION

defizienten Mäusen durch Dudgeon *et al.* (2014) auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten. Interessant wäre außerdem die Analyse der Klonalität der Thymozyten.

Ein onkologisches Geschehen ist bei einer p53-Defizienz zu erwarten, doch dabei bleibt die Rolle von SLy1 bzw. die Auswirkung einer SLy1-Defizienz bei p53-Defizienz zu klären. Die Analyse einer einzigen Maus lässt keine definitive Aussage bezüglich eines vermehrten Auftretens von Lymphomen bei einer SLy1-p53-Kodefizienz zu. Zumal v.a. der Genotyp SLy1^{WT}/ p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ durch eine deutlich größere Zellzahl im Thymus auffällig war und bei einer zusätzlichen SLy1-Defizienz in den anderen untersuchten Mäusen des Genotyps SLy1^{KO}/ p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ diese vergrößerte Zellzahl nicht nachweisbar war.

Um eine Aussage über die Rolle von SLy1 bei einem Tumorgeschehen treffen zu können, muss die Analyse der SLy1-p53-defizienten Mäuse in der Arbeitsgruppe weitergeführt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem SLy1-defizienten Mausmodell der p53-Signalweg mittels Western Blot und qPCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine SLy1-Defizienz zu einer Aktivierung des p53-Signalwegs in Thymozyten sowie in T-Zellen führt. Die Aktivierung von p53 erfolgt durch die Kinasen ATR, ATM, CHK1 und CHK2 und kann daher als Reaktion auf einen Replikationsstress oder als Antwort auf DNA-Schäden erfolgen. Dabei findet sich diese Veränderung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Erhöhte p21-mRNA-Level weisen darauf hin, dass der p53-Signalweg hierbei eine Seneszenz in den Thymozyten bedingt. Dadurch könnte die reduzierte Zellzahl in lymphatischen Organen von SLy1-defizienten Mäusen neben einer geringeren Proliferation und erhöhten Apoptoserate durch eine Seneszenz der Thymozyten bedingt sein.

Zudem wurde in einem Mausmodell mit einer SLy1- und T-Zell-spezifischen p53-Defizienz die Thymozytenentwicklung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Reduktion der Zellzahl bei SLy1-Defizienz nicht allein durch einen aktivierten p53-Signalweg erklärt werden kann. Ein Ausschalten von p53 konnte die reduzierte Zellzahl bei SLy1-Defizienz nicht regulieren bzw. normalisieren. Hingegen zeigte sich bei einer alleinigen p53-Defizienz eine signifikant erhöhte Zellzahl im Thymus, welche bei einer zusätzlichen SLy1-Defizienz nicht nachweisbar war. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass das Zellzahlfizit bei einer SLy1-Defizienz neben dem bereits postulierten Defizit beim Übergang vom DN- zum DP-Thymozytenstadium auf einen generellen, hemmenden Effekt auf die Proliferation bei einer SLy1-Defizienz zurückzuführen ist.

Somit scheint SLy1 eine *direkte* Rolle als Regulator von Proliferationsfaktoren zu haben und die Zellzahlreduktion bei SLy1-Defizienz sowohl auf einen aktiven p53-Signalweg als auch *direkt* auf das Fehlen von SLy1 zurückzugehen. Ein Tumorgeschehen konnte lediglich in einer einzigen Maus vom Genotyp SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺ beobachtet werden, sodass weitere Tiere untersucht werden müssen, um eine Aussage bezüglich der Rolle von SLy1 in der Tumorentstehung treffen zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Arefanian, S., Schäll, D., Chang, S., Ghasemi, R., Higashikubo, R., Zheleznyak, A., Guo, Y., Yu, J., Asgharian, H., Li, W., Gelman, A. E., Kreisel, D., French, A. R., Zaher, H., Plougastel-Douglas, B., Maggi, L., Yokoyama, W., Beer-Hammer, S. & Krupnick, A. S. (2016). "Deficiency of the adaptor protein SLy1 results in a natural killer cell ribosomopathy affecting tumor clearance". *Oncolmmunology*, 5(12), pp. 1–14. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1238543.

Astoul, E., Laurence, A. D., Totty, N., Beer, S., Alexander, D. R. & Cantrell, D. A. (2003). "Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways". *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp. 9267–9275. DOI: 10.1074/jbc.M211252200.

Awasthi, P., Foiani, M. & Kumar, A. (2015). "ATM and ATR signaling at a glance". *Journal of Cell Science*, 128(23), pp. 4255-4262. DOI: 10.1242/jcs.169730.

Beer, S., Scheikl, T., Reis, B., Huser, N., Pfeffer, K. & Holzmann, B. (2005). "Impaired Immune Responses and Prolonged Allograft Survival in Sly1 Mutant Mice". *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), pp. 9646–9660. DOI: 10.1128/MCB.25.21.9646-9660.2005.

Beer, S., Simins, A. B., Schuster, A. & Holzmann, B. (2001). "Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells". *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1520(1), pp. 89–93. DOI: 10.1016/S0167-4781(01)00242-1.

Belver, L. & Ferrando, A. (2016). "The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia". *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 16(8), pp. 494–507. DOI: 10.1038/nrc.2016.63.

LITERATURVERZEICHNIS

Brandt, S. (2010). "Interaktionsanalyse der Adapterproteine SLy1 und SLy2". Mathematisch und Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (AG Beer-Hammer).

Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Ginter, T. I., Yamashita, Y., O Sharrow, S. & Singer, A. (2000). "Coreceptor reversal in the thymus: Signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells". *Immunity*, 13(1), pp. 59–71. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)00008-X.

Bruno, T., De Nicola, F., Iezzi, S., Lecis, D., D'Angelo, C., Di Padova, M., Corbi, N., Dimiziani, L., Zannini, L., Jekimovs, C., Scarsella, M., Porrello, A., Chersi, A., Crescenzi, M., Leonetti, C., Khanna, K. K., Soddu, S., Floridi, A., Passananti, C., Delia, D. & Fanciulli, M. (2006). "Chk2 phosphorylation by ATM/ATR and Chk1 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint". *Cancer Cell*, 10(6), pp. 473–486. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.10.012.

Calabrese, V., Mallette, F. A., Deschênes-Simard, X., Ramanathan, S., Gagnon, J., Moores, A., Ilangumaran, S. & Ferbeyre, G. (2009). "SOCS1 Links Cytokine Signaling to p53 and Senescence". *Molecular Cell*, 36(5), pp. 754–767. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.09.044.

Carow, B., Gao, Y., Coquet, J., Reilly, M. & Rottenberg, M. E. (2016). "Lck-Driven Cre Expression Alters T Cell Development in the Thymus and the Frequencies and Functions of Peripheral T Cell Subsets." *The Journal of Immunology*, 197(6), pp. 2261–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1600827.

Chen, E. L. Y., Thompson, P. K. & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2019). "RBPJ-dependent Notch signaling initiates the T cell program in a subset of thymus-seeding progenitors". *Nature Immunology*. Springer US, 20(11), pp. 1456–1468. DOI: 10.1038/s41590-019-0518-7.

LITERATURVERZEICHNIS

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A. M., Butel, J. S. & Bradley, A. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours". *Nature*, 356(6366), pp. 215–221. DOI: 10.1038/356215a0.

Donehower, L. A., Harvey, M., Vogel, H., McArthur, M. J., Montgomery Jr, C. A., Park S. H., Thompson, T., Ford, R. J. & Bradley, A (1995). "Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice." *Molecular carcinogenesis*, 14(1), pp.16-22. DOI: 10.1002/mc.2940140105.

Dudgeon, C., Chan, C., Kang, W., Sun, Y., Emerson, R., Robins, H. & Levine, A. J. (2014). "The evolution of thymic lymphomas in p53 knockout mice". *Genes and Development*, 28(23), pp. 2613–2620. DOI: 10.1101/gad.252148.114.

Godfrey, D. I. & Zlotnik, A. (1993) "Control points in early T-cell development". *Immunology Today*, 14(11), pp. 547–553. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90186-O.

Hayday, A. C. & Pennington, D. J. (2007). "Key factors in the organized chaos of early T cell development". *Nature Immunology*, 8(2), pp. 137–144. DOI: 10.1038/ni1436.

Hubackova, S., Davidova, E., Boukalova, S., Kovarova, J., Bajzikova, M., Coelho, A., Terp, M. G., Ditzel, H. J., Rohlena, J. & Neuzil, J. (2020). "Replication and ribosomal stress induced by targeting pyrimidine synthesis and cellular checkpoints suppress p53-deficient tumors". *Cell Death and Disease*. Springer US, 11(2). DOI: 10.1038/s41419-020-2224-7.

Jiang, Q., Li, W. Q., Hofmeister, R. R., Young, H. A., Hodge, D. R., Keller, J. R., Khaled, A. R. & Durum, S. K. (2004). "Distinct Regions of the Interleukin-7 Receptor Regulate Different Bcl2 Family Members". *Molecular and Cellular Biology*, 24(14), pp. 6501–6513. DOI: 10.1128/MCB.24.14.6501-6513.2004.

LITERATURVERZEICHNIS

Kelly, A. P., Finlay, D. K., Hinton, H. J., Clarke, R. G., Fiorini, E. & Radtke, F. (2007). "Notch-induced T cell development requires phosphoinositide-dependent kinase 1". *EMBO Journal*, 26(14), pp. 3441–3450. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601761.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. (2014). "Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see)". *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 377–391. DOI: 10.1038/nri3667.

Kloos, I. (2021). „Die Rolle von SLy1 bei der Entwicklung einer T-Zell-akuten lymphatischen Leukämie“. Medizinische Dissertationsschrift. Eberhard Karls Universität Tübingen (AG Beer-Hammer).

Klusmann, I., Rodewald, S., Li, Y., Schulz-Heddergott, R. & Dobbelstein, M. (2016). "p53 Activity Results in DNA Replication Fork Processivity". *CellReports*, 17, pp. 1845–1857. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.10.036.

Kukuk, L., Dingley, A. J., Granzin, J., Nagel-Steger, L., Thiagarajan-Rosenkranz, P., Ciupka, D., Hänel, K., Batra-Safferling, R., Pacheco, V., Stoldt, M., Pfeffer, K., Beer-Hammer, S., Willbold, D. & Koenig, B. W. (2019). "Structure of the SLy1 SAM homodimer reveals a new interface for SAM domain self-association". *Scientific Reports*, 9(1), p. 54. DOI: 10.1038/s41598-018-37185-3.

Kyewski, B. & Klein, L. (2006). "A Central Role for Central Tolerance". *Annual Review of Immunology*, 24(1), pp. 571–606. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115601.

Lessard, F., Saint-Germain, E., Mignacca, L. & Ferbeyre, G. (2019). "SOCS1: phosphorylation, dimerization and tumor suppression". *Oncoscience*, 6(11-12), 386–389. DOI: 10.18632/oncoscience.495.

LITERATURVERZEICHNIS

Li, S., Juco, J., Mann, K. P. & Holden, J. T. (2004). "Flow Cytometry in the Differential Diagnosis of Lymphocyte-Rich Thymoma from Precursor T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma". *American Journal of Clinical Pathology*, 121(2), pp. 268–274. DOI: 10.1309/K2FY1TED8GEGFLNG.

Reis, B. (2007). "SLY1-Charakterisierung der Funktion und Rolle im Immunsystem". Mathematische und Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (AG Beer-Hammer).

Reis, B., Pfeffer, K. & Beer-Hammer, S. (2009). "The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development". *BMC Immunology*, 10, pp. 1–14. DOI: 10.1186/1471-2172-10-38.

Ribeiro, D., Melão, A., van Boxtel, R., Santos, C. I., Silva, A., Silva, M. C., Cardoso, B. A., Coffey, P. J. & Barata, J. T. (2018). "STAT5 is essential for IL-7-mediated viability, growth, and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells". *Blood Advances*, 2(17), pp. 2199–2213. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018021063.

Schäll, D. (2015). "Das Adapterprotein SLY1 - Ein Zelltyp-spezifischer Regulator des Immunsystems". Mathematische und Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift. Eberhard Karls Universität Tübingen (AG Beer-Hammer).

Schäll, D., Schmitt, F., Reis, B., Brandt, S. & Beer-Hammer, S. (2015). "SLY1 regulates T-cell proliferation during *Listeria monocytogenes* infection in a Foxo1-dependent manner". *European Journal of Immunology*, 45(11), pp. 3087–3097. DOI: 10.1002/eji.201545609.

Seddon, B. (2015). "Thymic IL-7 signaling goes beyond survival". *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 16(4), pp. 337–338. DOI: 10.1038/ni.3128.

LITERATURVERZEICHNIS

Singer, A., Adoro, S. & Park, J. H. (2008). "Lineage fate and intense debate: Myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice". *Nature Reviews Immunology*, pp. 788–801. DOI: 10.1038/nri2416.

Stetler-Stevenson, M. (2003). "Flow cytometry in lymphoma diagnosis and prognosis: Useful?". *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 16(4), pp. 583–597. DOI: 10.1016/S1521-6926(03)00068-9.

Strzeszewska, A., Alster, O., Mosieniak, G., Ciolko, A. & Sikora, E. (2018). "Insight into the role of PIKK family members and NF- κ B in DNA damage-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype of colon cancer cells article". *Cell Death and Disease*, 9(2). DOI: 10.1038/s41419-017-0069-5.

Yamashita, I., Nagata, T., Tada, T. & Nakayama, T. (1993). "CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection". *Int Immunol.*, 5(9), pp. 1139-50.
DOI: 10.1093/intimm/5.9.1139

Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. (2014). "Causes and consequences of replication stress". *Nature Cell Biology*, 16(1), pp. 2–9. DOI: 10.1038/ncb2897.

7 ANHANG

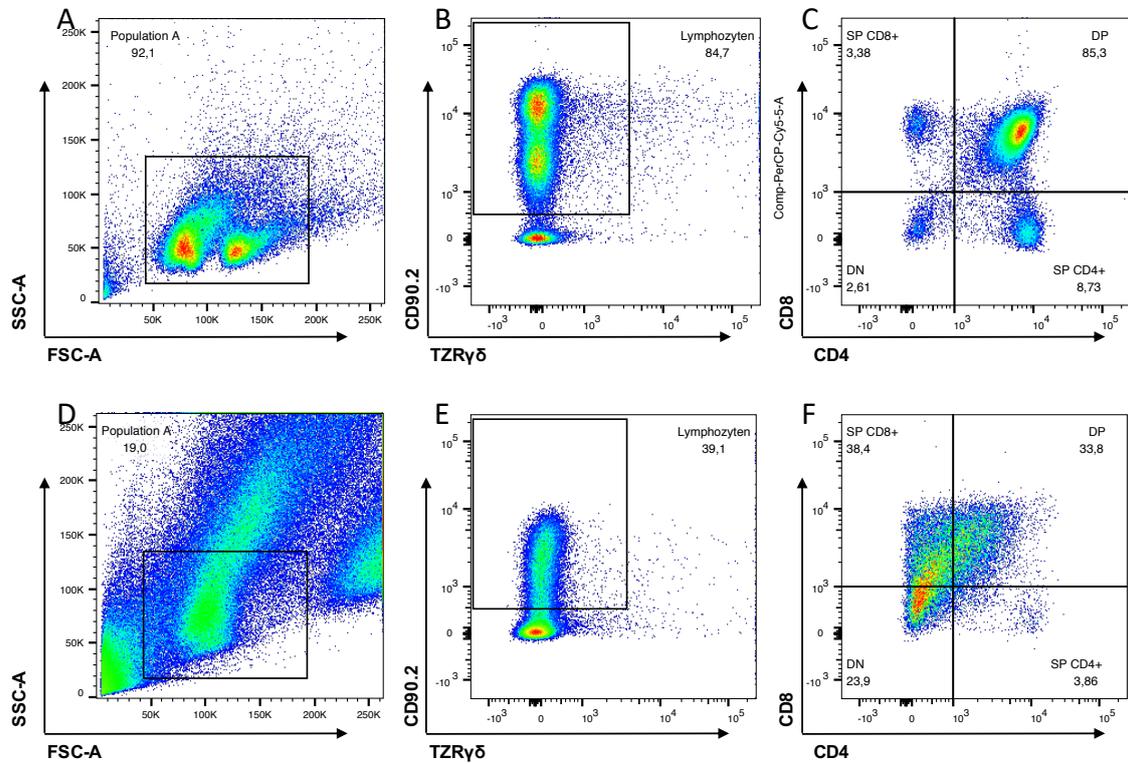


Abbildung 41: Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten bzw. Thymozytenpopulationen aus dem Thymus einer $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus und Kontrollmaus aus Grundpopulation A.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen aus dem Thymus, wobei die Grundpopulation A entsprechend Kapitel 3.2.2 gewählt ist. Die Abbildungen A und D zeigen jeweils die Grundpopulation A für die $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus bzw. für die $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus.

A. FSC-A und SSC-A aus der $SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus mit Markierung der Grundpopulation A. Aus Abbildung A weitere Bestimmung der **B.** Lymphozytenpopulation ($CD90.2^+$, $TZR\gamma\delta^+$) und **C.** DN-, DP- und SP-Thymozyten.

D. FSC-A und SSC-A aus der $SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre^+$ -Maus mit Markierung der Grundpopulation A. Aus Abbildung D weitere Bestimmung der **E.** Lymphozytenpopulation ($CD90.2^+$, $TZR\gamma\delta^+$) und **F.** DN-, DP- und SP-Thymozyten.

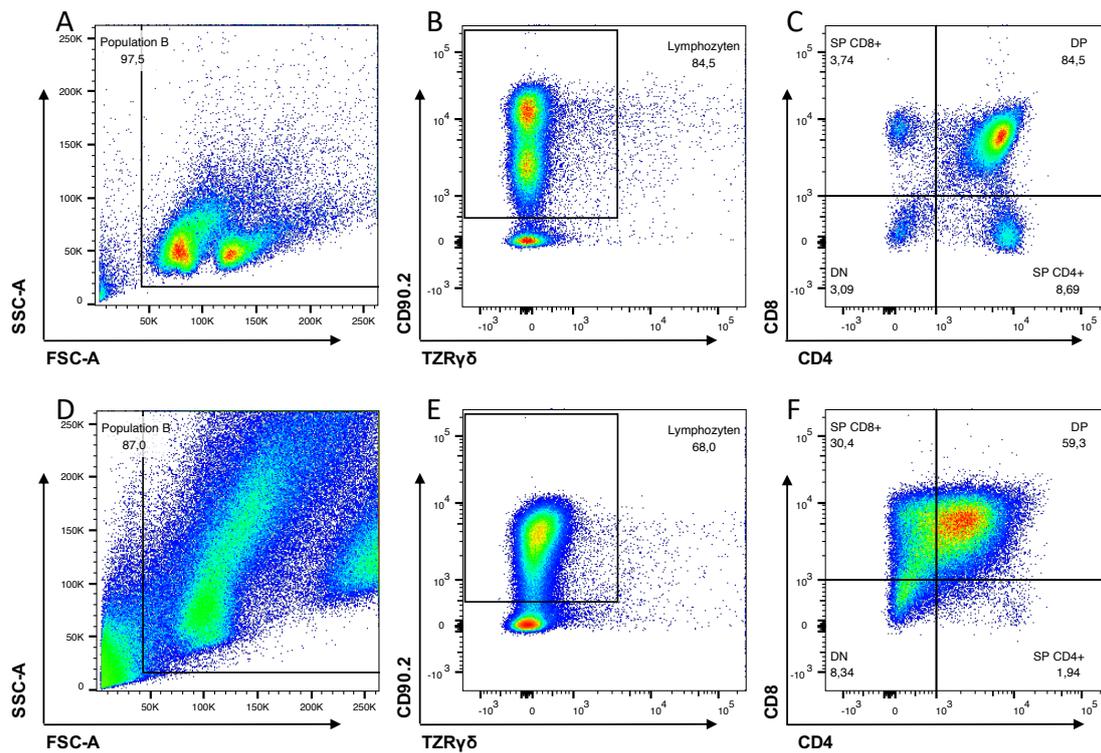


Abbildung 42: Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten bzw. Thymozytenpopulationen aus dem Thymus einer SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus und Kontrollmaus aus Grundpopulation B.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen aus dem Thymus, wobei die Grundpopulation B größer als Grundpopulation A gewählt ist, angepasst an die morphologischen Veränderungen der SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus. Die Abbildungen A und D zeigen jeweils die Grundpopulation B für die SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus bzw. für die SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus.

A. FSC-A und SSC-A aus der SLy1^{WT}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus mit Markierung der Grundpopulation B. **B.** Aus Abbildung A weitere Bestimmung der **B.** Lymphozytenpopulation (CD90.2⁺, TZRγδ⁺) und **C.** DN-, DP- und SP-Thymozyten.

D. FSC-A und SSC-A aus der SLy1^{KO}/p53^{fl/fl}/Lck-Cre⁺-Maus mit Markierung der Grundpopulation B. **E.** Aus Abbildung D weitere Bestimmung der **E.** Lymphozytenpopulation (CD90.2⁺, TZRγδ⁺) und **F.** DN-, DP- und SP-Thymozyten.

8 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik - Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie unter Betreuung von Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Claudia Müller, Renate Riehle und Jennifer Jaufmann von mir eigenständig durchgeführt, wobei Isabel Kloos und Daniel Schäll freundlicherweise einen Teil der RNA zur Verfügung gestellt haben: Bei Gesamthymozyten und DN-Thymozyten pro Genotyp jeweils die RNA von 2 Mäusen, bei peripheren T-Zellen die RNA von jeweils 4 Mäusen und bei DP-Zellen die RNA von 8 Mäusen. Die Genotypisierung der Mäuse wurde durch Claudia Müller vorgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig und nach Anleitung meiner Doktormutter durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben sowie wörtliche oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet zu haben.

Tübingen, 30.Juni 2021

Lena-Christin Gruber

9 VERÖFFENTLICHUNGEN

9.1 Posterpräsentationen

Lena-Christin Gruber, Isabel Kloos, Daniel Schäll, Bernhard Reis und Sandra Beer-Hammer: *Molecular Analysis of the Role of SLy1 in the IL7 Receptor Signaling Pathway*. 7.-12.10.2018; Autumn School (DGfl), Merseburg, Deutschland.

Lena-Christin Gruber, Isabel Kloos, Daniel Schäll, Bernhard Reis und Sandra Beer-Hammer: *Molecular Analysis of the Role of SLy1 in the p53 Signaling Pathway*. 15.-16.05.2019; Mildred Scheel Cancer Conference (Deutsche Krebshilfe), Bonn, Deutschland.

Lena-Christin Gruber, Isabel Kloos, Daniel Schäll, Bernhard Reis und Sandra Beer-Hammer: *Molecular Analysis of the Role of SLy1 in the p53 Signaling Pathway*. 24.01.2020; Forschungskolloquium der medizinischen Fakultät Tübingen, Deutschland.

9.2 Publikation in Vorbereitung

Lena-Christin Gruber * und Barbara Schneider *, Sandra Beer-Hammer

(* gleicher Beitrag):

Knockout of the SLy1 proto-oncogene protects mice from p53-induced tumor formation.

10 DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit einen Beitrag geleistet haben.

An allererster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer für das Bereitstellen des Themas und v.a. für die ununterbrochene und aufmerksame Begleitung bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die Möglichkeit bedanken, an diesem Institut promoviert haben zu dürfen.

Weiter möchte ich mich beim Interdisziplinären Promotionskolleg Medizin (IZKF) bedanken für die fachliche und finanzielle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für die Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit. Vielen herzlichen Dank v.a. an Claudia Müller für die technische Unterstützung und Renate Riehle; ein lieber Dank an Jennifer Jaufmann für all die geduldige Hilfe und Unterstützung und an Victoria Eiperle, die an langen Labortagen stets für gute Laune gesorgt hat.

Und ein ganz besonders lieber Dank geht an Barbara Schneider und Simon Killinger: Für Ideen sammeln und diskutieren, für praktische Tipps bei Techniken und Auswertungen und für die Kaffeepausen. Danke!!!