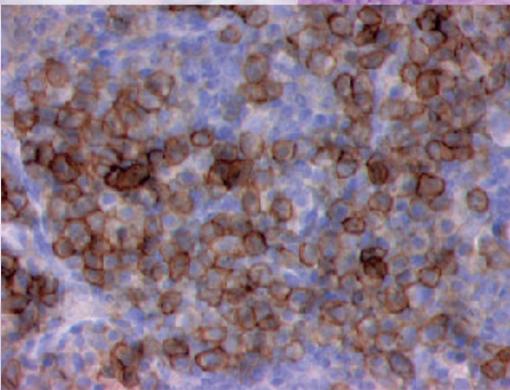
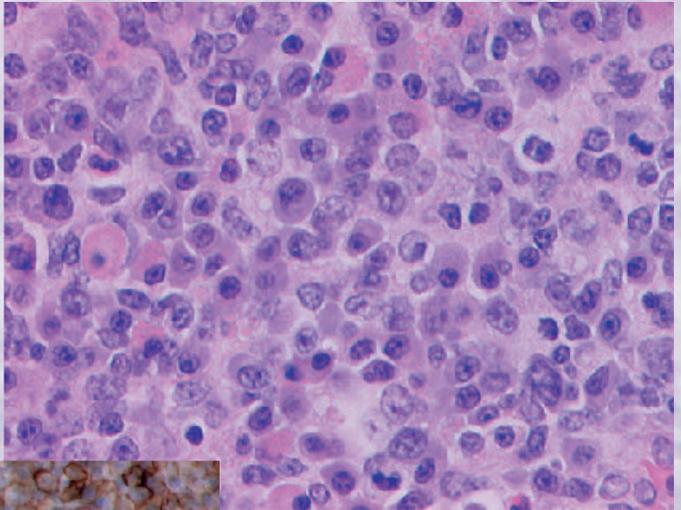


**Histologische, immunhistochemische
und molekularbiologische
Charakterisierung retrovirusinduzierter,
muriner hämatopoietischer Neoplasien**



S. Kunder

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2006

© 2006 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-72-3

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Institut für Tierpathologie (Lehrstuhl: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl) der
Ludwig-Maximilians-Universität München

angefertigt am
Institut für Pathologie, GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
(PD. Dr. Leticia Quintanilla-Fend)
und in der
Abteilung für Vergleichende Medizin, GSF - Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit (Prof. Dr. Jörg Schmidt)

Histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung retrovirusinduzierter, muriner hämatopoietischer Neoplasien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Sandra Kristin Liane Kunder
aus
Berlin

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. H. Kaltner

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

To A Mouse

On Turning Her Up In Her Nest With The Plough, November, 1785

Wee, sleekit, cow'rin', tim'rous beastie
O what a panic's in thy breastie !
Thou need na start awa sae hasty,
Wi' bickering brattle !
I wad be laith to rin an' chase thee
Wi' murd'ring pattle !

I'm truly sorry man's dominion
has broken Nature's social union,
An' justifies that ill opinion
Which makes thee startle
At me, thy poor earth-born companion,
An' fellow-mortal !

I doubt na, whiles, but thou may thieve ;
What then ? poor beastie, thou maun live !
A daimen-icker in a thrave
'S a sma' request ;
I'll get a beleesin' wi' the lave,
And never miss't !

Thy wee bit housie, too, in ruin !
Its silly wa's the win's are strewin' !
An' naething, now, to big a new ane
O' foggage green !
An' bleak December's winds ensuin'
Baith snell an' keen !

Thou saw the fields laid bare and waste.
An' weary winter comin' fast,
An' cozie here, beneath the blast,
Thou thought to dwell,
Till crash ! the cruel coulter past
Out-thro' thy cell.

That wee bit heap o' leaves an' stibble
Has cost thee mony a weary nibble !
Now thou's turn'd out, for a' thy trouble,
But house or hald,
To thole the winter's sleety dribble,
An' cranreuch cauld !

But, Mousie, thou art no thy lane,
In proving foresight may be vain :
The best laid schemes o' mice an' men
Gang aft a-gley,
An' lea'e us nought but grief an' pain
For promis'd joy.

Still thou art blest compar'd wi' me !
The present only toucheth thee :
But oh ! I backward cast my e'e
On prospects drear !
An' forward tho' I canna see,
I guess an' fear!

by Robert Burns

Vorwort

Kaum eine tierpathogene Virusfamilie wird so intensiv erforscht wie die der Retroviren. Die ersten wissenschaftlichen Arbeiten auf diesem Gebiet gehen bereits auf den Anfang des 20. Jahrhunderts zurück und beschreiben die Infektion von Hühnern mit dem aviären Leukose- und aviären Sarkomvirus durch zellfrei filtriertes Tumormaterial erkrankter Hühner. Das globale Interesse an der Grundlagenforschung von Retroviren erklärt sich vor allem dadurch, dass sie Erreger humaner hämatopoietischer Neoplasien (Lymphome/Leukämien) und des erworbenen Immundefektsyndroms (AIDS) sind. Die Möglichkeit, retrovirale pathogenetische Regelmechanismen humaner Erkrankungen in Modellorganismen zu untersuchen, führte in den letzten zwanzig Jahren zu einem explosionsartigen Anstieg von Mausmodellen. Der direkte Vergleich zwischen Human- und Mauspathologie gewinnt in diesem Zusammenhang zunehmend an Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Kooperation zwischen der Abteilung für Vergleichende Medizin, unter der Leitung von Professor Jörg Schmidt und dem Institut für Pathologie, unter der Leitung von PD Leticia Quintanilla-Fend (GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) sowie dem Department of Molecular Biology, University of Aarhus, unter der Leitung von Professor Finn Skou Pedersen. Seit mehr als 20 Jahren erforschen diese Arbeitsgruppen die molekulare Pathogenese verschiedener muriner Leukämieviren durch *in vitro* und *in vivo* Studien. Die morphologische Klassifizierung der im Mausexperiment induzierten Tumore gestaltete sich oft schwierig, nicht zuletzt deshalb, weil ein einheitlich geltendes, klares und umfassendes Klassifizierungsschema für murine hämatopoietische Neoplasien nicht vorhanden war. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die histologische, immunphänotypische und molekularbiologische Charakterisierung retrovirusinduzierter Tumore anhand der neuesten Klassifizierungsvorschläge für Lymphome und Leukämie bei Mäusen sowie die vergleichende Beurteilung der pathogenen Fähigkeiten verschiedener Virustypen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1	Retroviren	1
1.1.1	Taxonomie und Struktur von Retroviren	1
1.1.2	Tumorinduktion durch endogene und exogene Retroviren	2
1.1.3	Einteilung muriner Leukämieviren (MLVs)	4
1.1.4	Infektionszyklus muriner Leukämieviren	4
1.1.5	Das murine Leukämievirus Akv	7
1.1.6	Genomstruktur und Transkription von Akv	7
1.1.7	Transkription viraler und zellulärer Gene	11
1.1.8	Transkriptionsfaktoren und ihre Bindungsstellen im Akv-Enhancer	12
1.1.8.1	NF1 (Nukleärer Faktor 1)	13
1.1.8.2	Ets (E26 transformations-spezifische Sequenz)	13
1.1.8.3	RUNX1 (Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 1)	14
1.1.8.4	GR (Glukokortikoid Rezeptor)	15
1.1.8.5	bHLH Proteine (Basische Helix-Loop-Helix Proteine)	15
1.2	Hämatopoietische und lymphatische Organe der Maus	17
1.2.1	Die Milz	17
1.2.2	Der Thymus	20
1.2.3	Die Lymphknoten	20
1.3	Klassifikation humaner hämatopoietischer Tumore	24
1.4	Klassifikationen muriner hämatopoietischer Tumore	25
1.4.1	Lymphatische Neoplasien und verwandte Erkrankungen	26
1.4.1.1	Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom (Prä-T LBL)	26
1.4.1.2	Kleinzelliges B-Zell-Lymphom (SBL)	27
1.4.1.3	Splenisches Marginalzonen-Lymphom (SMZL)	27
1.4.1.4	Follikuläres B-Zell-Lymphom (FBL)	28
1.4.1.5	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)	29
1.4.1.6	Plasmozytom (PCT)	30
1.4.1.7	Murines erworbenes Immundefizienz Syndrom (MAIDS)	31

1.4.2	Nicht-lymphatische hämatopoietische Neoplasien und verwandte Erkrankungen.....	31
1.4.2.1	Nicht-lymphatische Leukämien	32
1.4.2.2	Myeloische Dysplasien.....	33
1.4.2.3	Myeloische nicht-reaktive Proliferationen.....	34
2	Material und Methoden	40
2.1	Tierversuch.....	40
2.1.1	Tierversuchsgenehmigung.....	40
2.1.2	Behandlung der Versuchstiere	40
2.2	Pathologie.....	41
2.2.1	Sektion und makroskopische Untersuchung	41
2.2.2	Histologie	42
2.2.3	Immunhistochemie	42
2.2.4	Klassifizierung hämatopoietischer Tumore	46
2.3	Molekularbiologische Untersuchungen	46
2.3.1	Southern Blot	46
2.3.1.1	DNA-Extraktion aus gefrorenem Gewebe.....	46
2.3.1.2	DNA-Aufbereitung, -Transfer, -Hybridisierung, -Sonden.....	46
2.3.2	PCR mit anschließender Fragmentanalyse.....	48
2.3.2.1	DNA-Extraktion aus dem Paraffinschnitt.....	48
2.3.2.2	DNA-Amplifizierung, Gene-Scan.....	49
2.4	Plasmide und Virusmutanten.....	49
2.4.1	Plasmidkonstruktion	50
2.4.2	Viruskonstruktion.....	52
2.5	Zellkultur	52
2.6	Virustiterbestimmung	53
2.7	Kontrolle der Transfektion und Infektion	54
2.8	Statistische Analysen	54

3	Ergebnisse	55
3.1	Histologische und immunhistochemische Tumorklassifikation	55
3.1.1	Reaktive folliculäre Hyperplasie, Hyperplasie der Marginalzone und milde Plasmazellproliferation	55
3.1.2	Plasmozytom (PCT)	56
3.1.2.1	Plasmozytom mit Manifestation eines zweiten Tumors	57
3.1.2.2	Plasmozytom mit großzelliger Zellkomponente	57
3.1.2.3	Plasmozytom mit myeloischer Dysplasie und verstärkter extramedullärer Hämatopoiese	58
3.1.2.4	Plasmozytom mit Marginalzonenhypertrophie	58
3.1.3	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)	60
3.1.4	Follikuläres B-Zell-Lymphom (FBL)	62
3.1.5	Splenisches Marginalzonen-Lymphom (SMZL)	64
3.1.6	Kleinzelliges B-Zell-Lymphom (SBL)	65
3.1.7	Akute myeloische Leukämie (AML)	65
3.1.8	Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom (Prä-T LBL)	66
3.1.9	Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse	68
3.1.9.1	Plasmozytom als häufigster Tumor	68
3.1.9.2	Aggressive Neoplasien haben kürzere Latenzzeiten	69
3.1.9.3	Kinetik von Plasmozytomvarianten	71
3.2	Molekularbiologische Ergebnisse	73
3.2.1	Southern Blot	73
3.2.2	PCR mit anschließender Fragmentanalyse	74
3.3	Pathogenität von Akv und Akv-Mutanten	77
3.3.1	Akv λ -623	78
3.3.2	Akv1-99	79
3.3.3	Akv1-99 mNF1mut2	80
3.3.4	Akv1-99 mEts	81
3.3.5	Akv1-99 mE _{GRE}	82
3.3.6	Akv1-99 mGR	83
3.3.7	Akv1-99 mE _{A/S}	84
3.3.8	Akv1-99 mE _{A/S} +mGR	85
3.3.9	Akv1-99 mE _{A/S} +mE _{GRE}	86

3.3.10	Akv1-99 mRUNX1	87
3.3.11	Akv1-99 mRUNX1+mGR	88
3.3.12	Akv1-99 mRUNX1+mE _{GRE}	89
3.3.13	Kontrollgruppe.....	90
3.3.14	Zusammenfassung.....	92
3.3.14.1	Pathogenität von Akv λ-623 und Akv1-99	92
3.3.14.2	Mutationen von Akv und Änderungen des Tumorspektrums.....	92
3.3.14.3	Induktion akuter myeloischer Leukämien und Vorläufer-T-Zell lymphoblastischer Lymphome durch Virusmutanten.....	93
3.3.14.4	Induktion von Plasmozytomen mit zusätzlichen Tumoren durch Akv1-99.....	93
3.3.14.5	Virusmutanten mit eingeschränkter Tumorvielfalt und kürzerer Latenzzeit.....	96
3.3.14.6	Virusmutanten mit großer Tumorvielfalt und mittlerer Latenzzeit ..	96
3.3.14.7	Virusmutanten mit eingeschränkter Tumorvielfalt und längerer Latenzzeit.....	97
3.3.14.8	Verlängerte Latenzzeit bei Akv1-99 mRUNX1+mE _{GRE}	99
3.3.14.9	Verlängerte Latenzzeit bei Akv1-99 mE _{AVS} +mE _{GRE}	100
4	Diskussion	101
4.1	Diagnostische Methoden zur Charakterisierung muriner Lymphome und Leukämien	102
4.1.1	Etablierung eines diagnostischen Antikörper-Panels für murine hämatopoietische Neoplasien	102
4.1.1.1	Bestimmte immunhistochemische Färbungen sind nicht am Paraffinschnitt möglich	103
4.1.1.2	Das Problem mit Hintergrundfärbungen.....	103
4.1.1.3	Kontrollen.....	106
4.1.2	Klonalitätsstudien: Ist eine Analysemethode vorzuziehen?.....	107
4.1.2.1	Vor- und Nachteile von Southern Blot und PCR-Analyse.....	107
4.1.2.2	Wie zuverlässig sind Southern Blot und PCR-Analyse?	109
4.1.2.3	Bedeutet Monoklonalität stets maligner Tumor?	109
4.1.2.4	Spricht monoklonales IgH stets für B-Zell Lymphom?	110

4.2	Charakterisierung retrovirusinduzierter muriner hämatopoietischer Neoplasien	111
4.2.1	Retrovirusinduzierte Plasmozytome: Eine in den "Bethesda Proposals" nicht beschriebene Variante des Plasmozytoms?	111
4.2.2	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL).....	120
4.2.3	Follikuläres B-Zell-Lymphom (FBL).....	122
4.2.4	Splenisches Marginalzonen-Lymphom (SMZL).....	123
4.2.5	Kleinzelliges B-Zell-Lymphom (SBL).....	125
4.2.6	Akute myeloische Leukämie mit morphologischer Ausreifung (AML).126	
4.2.7	Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom (Prä-T LBL).....	126
4.3	Tumorinduktion durch Akv und Akv-Mutanten	128
4.3.1	Charakterisierung der Pathogenität von Akv λ -623	128
4.3.2	Charakterisierung der Pathogenität von Akv1-99.....	129
4.3.3	Bedeutung der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für die Pathogenität.....	130
5	Zusammenfassung	135
6	Englische Zusammenfassung	136
7	Literaturverzeichnis	137
8	Anhang	152
8.1	Abkürzungsverzeichnis	152
8.2	Abbildungsverzeichnis	153
8.3	Tabellenverzeichnis	154
8.4	Danksagung	155

1 Einleitung und Literaturübersicht

Die Einleitung gliedert sich in drei Abschnitte. Zunächst werden grundlegende Informationen über Retroviren sowie detaillierte Angaben über das murine Leukämievirus Akv (Akv MLV) abgehandelt. Im zweiten Abschnitt werden morphologische und histologische Eigenschaften lymphatischer Organe der Maus beschrieben. Abschließend erfolgt eine kurze Übersicht über die Entwicklung der Klassifikationen hämatopoietischer Erkrankungen sowie eine Einführung in die Klassifizierung ausgewählter Tumore des hämatopoietischen Systems der Maus.

1.1 Retroviren

1.1.1 Taxonomie und Struktur von Retroviren

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) umfasst sieben Genera: *Alpharetrovirus* (z.B. aviäres Leukosevirus), *Betaretrovirus* (z.B. murines Mammatumovirus), *Gammaretrovirus* (z. B. murines Leukämievirus), *Deltaretrovirus* (z.B. bovines Leukämievirus), *Epsilonretrovirus* (z. B. dermales Sarkomvirus des Glasaugenbarsches), *Lentivirus* (z.B. humanes Immundefizienzvirus 1) und die apathogenen Retroviren des Genus *Spumavirus* (z.B. Schaumvirus des Schimpansen). Bevor die Einteilung nach verwandtschaftlicher Genomstruktur erfolgte, wurden Wirtsspezifität, Virionmorphologie und Morphogenese als Einteilungskriterien herangezogen (56). Abbildung 1 stellt die Struktur eines Retrovirus schematisch dar. Retroviren sind behüllte, positiv diploide Einzelstrang-RNA-Viren mit einer Genomgröße von sieben bis elf Kilobasen (kb). Sie besitzen spezielle Oberflächenproteine, mit denen sie an zelluläre Rezeptoren binden, die das Eindringen des Virus in die Zelle vermitteln. Essentielle Enzyme für die Replikation befinden sich in einer kernähnlichen Struktur, die "Kapsid" oder auch "Core" genannt wird.

1.1.2 Tumorinduktion durch endogene und exogene Retroviren

Die meisten Retroviren infizieren somatische Zellen. Diese sogenannten "exogenen Retroviren" werden nach der Integration in die zelluläre DNA im Wirtorganismus stark exprimiert, sodass eine horizontale Übertragung möglich ist. Retroviren, die in das Genom von Keimzellen integriert sind, werden vertikal übertragen und als "endogene Retroviren" bezeichnet (56). Für gewöhnlich liegen endogene Retroviren still im Genom und erzeugen keine Tumore. Die Expression endogener Retroviren kann durch hormonale oder immunologische Stimuli, durch chemische Noxen oder durch Strahlung, beispielsweise Alpha-Strahlung, induziert werden (188). Nur wenige endogene Retroviren, wie z. B. einige murine Leukämieviren, sind in der Lage, sichtbare Veränderungen von bestimmten Zellen in Zellkultur zu erzeugen (71). Viele exogene Retroviren hingegen transformieren Zellen in Zellkultur.

Cis-agierende Retroviren interagieren direkt mit zellulären Genen (9, 132):

1. Integriert das Virus in gleicher Transkriptionsrichtung und in unmittelbarer Nachbarschaft zum zellulären Gen, so kann der virale Promoter zur Transkription des zellulären Gens führen (sogenannte „Promotor- Insertionsmutagenese“). Bei einem so entstandenen Tumor handelt es sich in der Regel um klonale Zellpopulationen.
2. Integriert das Virus in größerem Abstand zum zellulären Gen, so kann unabhängig von der Transkriptionsrichtung der virale Enhancer zur Transkription des zellulären Gens führen (154). Kommt es zur Tumorentstehung, ist dieser in der Regel ebenfalls klonal.
3. Bei der Transkription des viralen Genoms kann es zum sogenannten „Read-Through“ kommen, bei dem das stromabwärtsgelegene zelluläre Gen transkribiert wird.
4. Bei einer Integration innerhalb eines zellulären Gens kann es durch eine virale "Splice-Donor-Site" und eine zelluläre "Splice-Acceptor-Site" zur Expression eines Virus-Gen-Fusionsproduktes kommen, welches unter der Kontrolle des viralen Promotors steht.

Trans-aktivierende Retroviren beeinflussen die Transkription eines zellulären Gens nicht direkt durch einen viralen Promotor oder Enhancer sondern sie verfügen über

ein Gen (z. B. codiert HTLV-1 für ein Gen namens *tax*), welches als Transkriptionsfaktor für zelluläre und virale Gene agieren kann.

Akut transformierende (transduzierende) Retroviren verfügen über ein virales Onkogen (*v-onc*). Hierbei handelt es sich um ein komplettes oder partielles, zelluläres Protoonkogen, welches sie nach der Integration in die zelluläre DNA durch genetische Rearrangierungen und Rekombinationen hinzugewonnen haben. Fast immer büßen sie dabei Teile ihres eigenen Genoms ein, was sie i. d. R. replikationsunfähig macht. Für die Replikation sind sie daher auf Helferviren, meist andere Retroviren, angewiesen. Durch die Integration in die zelluläre DNA fügen sie das virale Onkogen in das Wirtsgenom ein, was bereits nach wenigen Tagen zur Tumorgenese führen kann. Diese Tumore zeichnen sich durch Poly- oder Oligoklonalität aus.

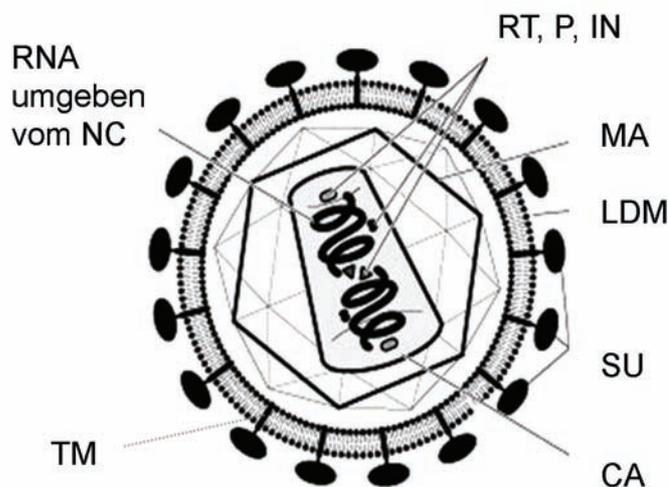


Abbildung 1: Struktur des HI Virus 1

Abbildung nach Greene (61); Einzelstrang-RNA umgeben vom Nukleokapsid (**NC**); innerhalb des Kapsids (**CA**) befinden sich unter anderem tRNA, Integrase (**IN**), reverse Transkriptase (**RT**) und Protease (**P**); Lipid-Doppelmembran (**LDM**) zellulären Ursprungs umgibt die Matrix (**MA**); transmembranständige Glykoproteine (**TM**); Oberflächenglykoproteine (**SU**).

1.1.3 Einteilung muriner Leukämieviren (MLVs)

Die meisten Mausstämme der Spezies *Mus musculus musculus* und *Mus musculus domesticus* tragen einzelne oder multiple Kopien von endogenen murinen Leukämieviren in ihrem Genom (26, 70, 85, 86, 109, 117, 178, 179, 184, 205). Die Bezeichnung der MLVs geht oftmals auf die Namen ihrer Erstbeschreiber zurück, wie z. B. Ab MLV (H. T. Abelson (2)) RV (F. J. Rauscher (181)), MoMLV (J. B. Moloney (135)), FV (C. Friend (52)) oder Gross MLV (L. Gross (63)). MLVs gehören dem Genus *Gammaretrovirus* an und zählen aufgrund ihres Wirtsspektrums und ihres halbmondförmigen Nukleokapsids zu den Säugetier-Typ-C (crescent-shaped) Retroviren. MLVs sind sogenannte "einfache Retroviren". Für die Proteinsynthese einfacher Retroviren wird eine einfach gespleißte Hüll-RNA aus der Vorläufer-RNA produziert. Nach neueren Erkenntnissen wird jedoch bei einfachen, replikationskompetenten Retroviren eine zweite gespleißte RNA translatiert (31). Bei komplexen Retroviren entstehen vielfach gespleißte mRNA (25). Das Hüllgen *env* (envelope von MLVs), beziehungsweise die daraus entstehenden Hüllproteine fungieren als ein weiteres Unterscheidungsmerkmal. Je nachdem welchen Rezeptor ein Virus für die Infektion einer Mauszelle nutzt, wird zwischen ecotropen, amphotropen, polytropen und xenotropen MLVs unterschieden (221). Ecotrope Viren binden an den Rec-1 (replication ecotropic MLV) Rezeptor, auch mCAT-1 (murine cationic amino acid transporter 1) genannt, der nur auf der Oberfläche von Mauszellen vorkommt (3, 78, 216). Polytrope und amphotrope MLVs können murine und nicht murine Zellen infizieren, wobei sie aber jeweils andere Rezeptoren als die ecotropen Viren für den Eintritt in die Wirtszelle nutzen. Xenotrope Vertreter der MLVs hingegen binden an Rezeptoren, die nicht von murinen Zellen exprimiert werden.

1.1.4 Infektionszyklus muriner Leukämieviren

Eine Skizze eines Infektionszyklus stellt Abbildung 2 dar. Nach Bindung von Oberflächenglykoproteinen (SU) eines Virions an Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle, erfolgt die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und das Kapsid gelangt in das Zytoplasma. Bei MLVs bleibt das Core nach dem Zelleintritt noch einige Zeit intakt. Vermutlich schützt es die viralen Faktoren, die für die Bildung des Präintegrationskomplexes (PIC) notwendig sind. Der PIC, auch Reverser Transkriptionskomplex (RTC) genannt, besteht aus viralen und zellulären Proteinen,

welche die reverse Transkription des Virusgenoms ermöglichen (11). Hierbei wird die Einzelstrang-RNA mittels der viralen reversen Transkriptase, einem Enzym, das als Polymerase und RNase fungiert, in Doppelstrang-DNA umgeschrieben (25). Die endständigen sogenannten "long terminal repeats" (LTRs) spielen bei der Replikation aller Retroviren eine zentrale Rolle. Sowohl am 5' als auch am 3' Ende der LTRs befinden sich Integrationssignale. Enhancer- und Promotorbereiche liegen ebenfalls in den LTRs. Durch nicht-kovalente Bindungen zwischen endständigen LTRs werden auch ringförmige DNA Moleküle gebildet (190, 197). PICs können nur während oder nach der Mitose die Kernmembran passieren. Genaue Mechanismen hierzu sind noch nicht bekannt, aber es scheint ein aktiver, energieabhängiger Vorgang zu sein (190). Als Provirus integrieren ein oder mehrere virale DNA-Doppelstränge an verschiedenen Orten in die zelluläre DNA. Die Transkription neuer Virion-RNA wird durch die zelluläre RNA-Polymerase ermöglicht. Durch Spleißen der Virion-RNA kommt es zur Bildung von mRNAs. Auf der 35S mRNA befinden sich die Informationen der *gag* (group specific antigens) und durch Umstellen des offenen Leserahmens (open reading frame) auch der *pol* (polymerase) Gensequenz. Bei der Übersetzung des *env* (envelope) Gens wird eine 25S mRNA generiert. Nach posttranslationärem Spalten entstehen aus Hauptpolyproteinen funktionale, virale Proteine. Virale Oberflächenglykoproteine sowie transmembranständige Glykoproteine ordnen sich in und an der Zellmembran an. Das Kapsid bildet sich an der Innenseite der Zellmembran aus. Für das korrekte Zusammensetzen des Viruspartikels ist das *gag* Gen essentiell (25). Das Kapsid schließt zwei virale positive Einzelstrang-RNA-Moleküle, tRNA, zelluläre RNA, virale Protease, reverse Transkriptase sowie Integrase ein. Ein bestimmter RNA-Gehalt scheint Voraussetzung für das sogenannte "Budding" zu sein (147). Beim Budding eines Nachkommenvirions findet ein Stück der Zellmembran als Virushülle Verwendung. Nach einem abschließenden Reifungsprozess, bei dem die restlichen Polyproteine von der viralen Protease in die einzelnen funktionalen Proteine gespalten werden (208), erlangt das Virus seine Infektiosität.

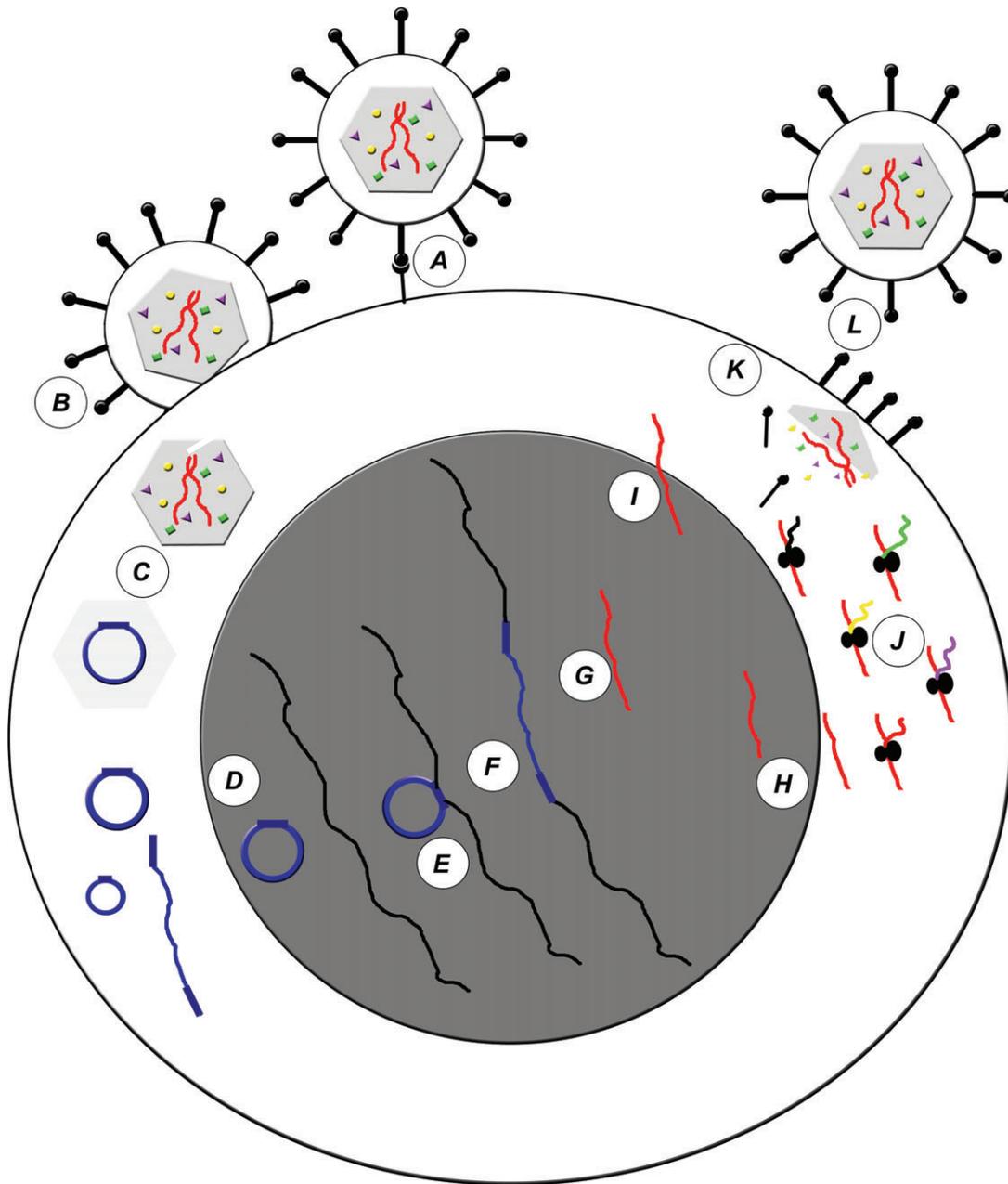


Abbildung 2: Retroviraler Infektionszyklus

A, Bindung von Oberflächenproteinen an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle; **B**, Fusion von Virushülle und Zellmembran; **C**, Auflösung des Nukleokapsids, reverse Transkription und Abbau des Kapsids; **D**, Übertritt viraler DNA (blauer Strang/blaue Ringe) in den Zellkern; **E**, **F**, durch LTRs und Integrase vermittelte Integration des Provirus in das Wirtsgenom (schwarzer Strang); **G**, **H**, zelluläre RNA Polymerase synthetisiert virale Tochter-RNA, aus der durch Spleißen mRNAs hervorgehen; **I**, RNA des Nachkommenvirions (roter Strang) verlässt den Zellkern; **J**, Translation viraler mRNA und Synthese viraler Proteine (schwarz: Oberflächenproteine und transmembranständige Proteine; violett: Protease; gelb: Integrase; grün: reverse Transkriptase); **K**, Zusammensetzung vom Nachkommenviruspartikel; **L**, Budding und anschließende Virusreifung; im Kapsid befinden sich neben zellulärer tRNA Enzyme wie Protease (Dreiecke), reverse Transkriptase (Vierecke) und Integrase (Kreise).

1.1.5 Das murine Leukämievirus Akv

Zwischen 1928 und 1936 legte J. Furth den Grundstein zur Zucht von AKR-Mäusen. Dieser Mausstamm zeichnet sich durch die Entwicklung von spontan entstehenden lymphatischen Neoplasien aus. Aus den lymphatischen Tumoren gelang 1979 die Klonierung eines infektiösen, endogenen murinen Leukämievirus, dem Akv λ -623 (118). Es folgte die Isolierung von weiteren Akv-Klonen und ihre sequenzielle Beschreibung (74). Im Genom von AKR- und AKR-eng-verwandten-Mäusen wurden Bereiche identifiziert, innerhalb derer zahlreiche retrovirale Sequenzen als vollständige oder unvollständige Proviren kodiert waren (21, 26, 123, 178, 185, 205). Akv ist ein komplettes endogenes Retrovirus, das über keine viralen Onkogene verfügt. Als parentales Virus formt es nach Rekombination mit zwei weiteren MLVs (einem polytropen und einem xenotropen) in der AKR-Maus ein "mink cell focus forming" (MCF) Virus (26). Diese Rekombinante ist hoch leukämogen und bei den AKR-Mäusen für die hohe Inzidenz, an Lymphomen und Leukämien zu erkranken, verantwortlich. Eine Akv-Expression in AKR-Mäusen ist bereits am Tag der Geburt festzustellen. Diese virämische Phase ermöglicht die Rekombination des Akv mit den anderen beiden endogenen MLVs. Das MCF-Virus wird bei AKR-Mäusen ab einem Alter von 10 bis 14 Wochen im Thymus detektiert. Was die starke Expression des Akv in den Neugeborenen verursacht, ist bislang nicht geklärt (145). Bevor dem Akv lymphomogene Potenz zugeschrieben worden ist (115, 168, 199, 203, 212), fanden wichtige Variablen der Pathogenese, wie z.B. Infektionsweg, Mausstamm und Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion, zu wenig Beachtung, was zu der Fehlinterpretation führte, dass Akv generell apathogen sei (72, 75, 91, 158, 227).

1.1.6 Genomstruktur und Transkription von Akv

Eine Übersicht über das provirale Akv-Genom stellt Abbildung 3 dar. Das Akv-Genom umfasst etwa 8.374 Basen. Die beiden identischen RNA-Einzelstränge entsprechen dem allgemeinen Aufbau aller Retroviren. An beiden Enden des revers transkribierten DNA-Strangs sind die LTRs kodiert. Im Zentrum befinden sich die Nukleotidsequenzen für drei virale Gene.

Abbildung 4 veranschaulicht die komplexen Vorgänge der reversen Transkription. Die Replikation eines viralen RNA-Plusstrangs beginnt mit Bindung eines an eine tRNA gekoppelten Primers an eine sogenannte "Primer-Bindungsstelle" (PBS). Danach synthetisiert die reverse Transkriptase die komplementäre Minusstrang-DNA

bis zum 5' Ende der Matrize und baut anschließend das 5' Ende der RNA bis zur Primer-Bindungsstelle ab. Der neu entstandene DNA-Abschnitt dissoziiert von der Matrize ab und lagert sich an den redundanten Bereich am 3' Ende der RNA an. Dort nimmt die Polymerase ihre Aktivität wieder auf und führt die DNA-Synthese bis zum 5' Ende fort. Anschließend erfolgt ein fast kompletter RNA-Abbau. Nur eine kurze Sequenz, der sogenannte "Polypurintrakt" (PPT) bleibt vorerst erhalten. Hier beginnt die Synthese der Plusstrang-DNA in Richtung 3' Ende. Danach werden restliche RNA-Bereiche sowie der an die tRNA gebundene Primer abgebaut. Der kurze, neu synthetisierte DNA-Plusstrang lagert sich um, sodass der Primer-Bindungsbereich (PBS) des Plusstrangs gegenüber dem PBS des Minusstrangs zu liegen kommt. Beide DNA-Stränge werden anschließend komplettiert.

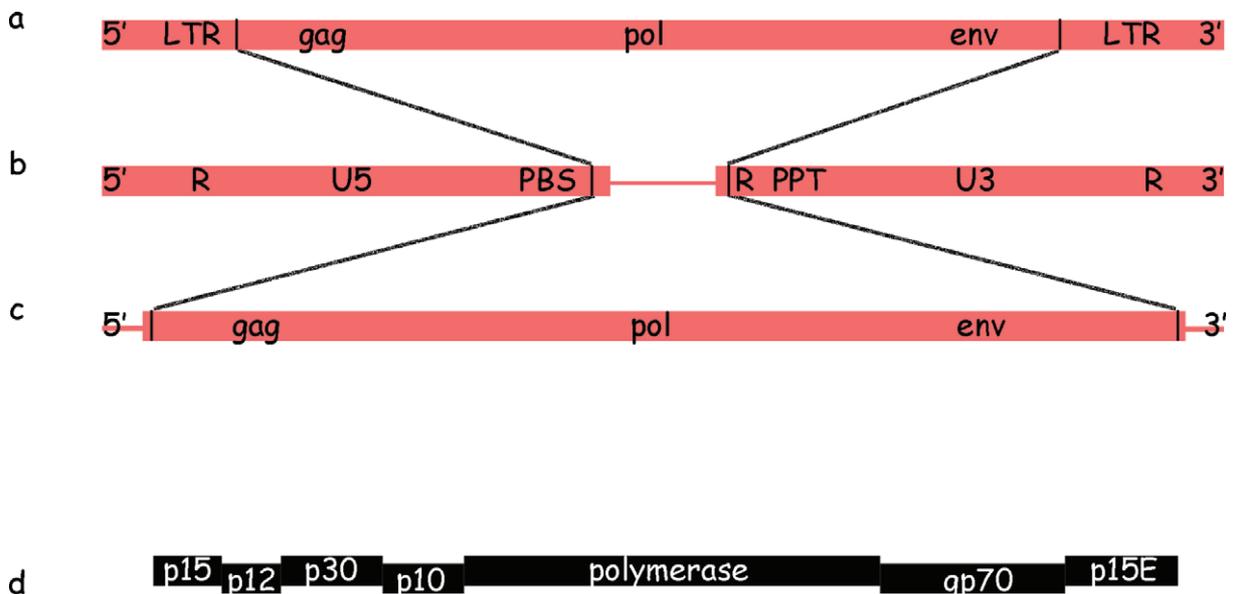


Abbildung 3: Schematische provirale Genomstruktur des Akv

a-c, schematische Darstellung eines Akv Provirus; **b**, das "long terminal repeat" (LTR) am 5' Ende ist 144 Basenpaare (bp) lang, das LTR am 3' Ende ist mit 550 bp fast viermal so groß; **b**, innerhalb der LTRs befinden sich redundante Bereiche (R) und Akv-spezifische Sequenzen, die als U5 ("unique 5' sequence") beziehungsweise U3 ("unique 3' sequence") bezeichnet werden; stromabwärts von U5 liegt der Primer-Bindungsbereich (PBS); stromaufwärts von U3 befindet sich der Polypurintrakt (PPT), eine benachbarte kurze redundante Sequenz begrenzt zusammen mit U5 die kodierenden Sequenzen für die viralen Gene; **c, d**, das "group specific antigen" (gag) kodiert für die Proteine p15, p12, p30 und p10; das pol Gen kodiert für die reverse Polymerase und Integrase; das Virushüllgen env kodiert für das Glykoprotein gp70 (SU) und das Protein p15E (TM).

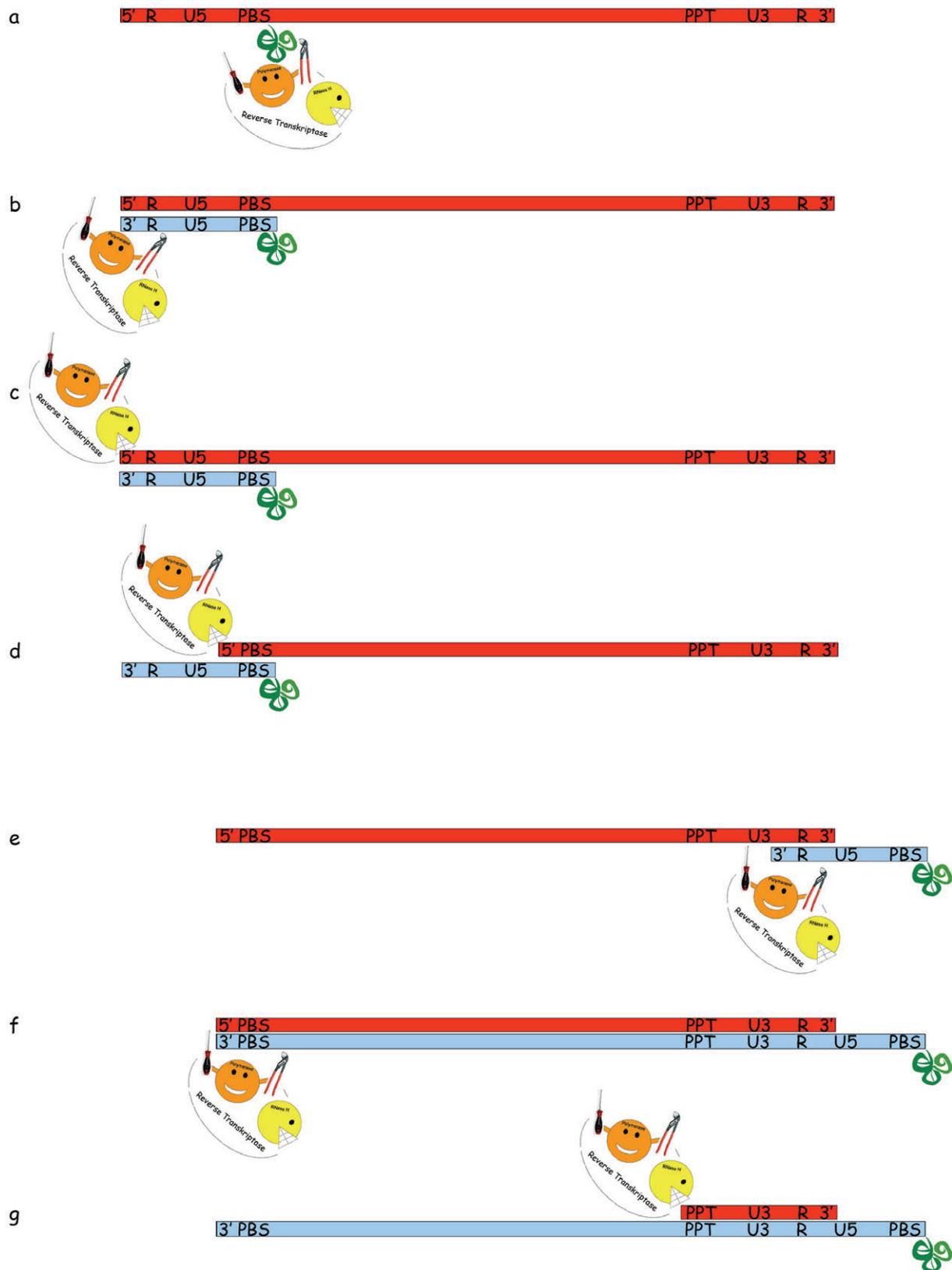


Abbildung 4: Schematische Darstellung der reversen Transkription

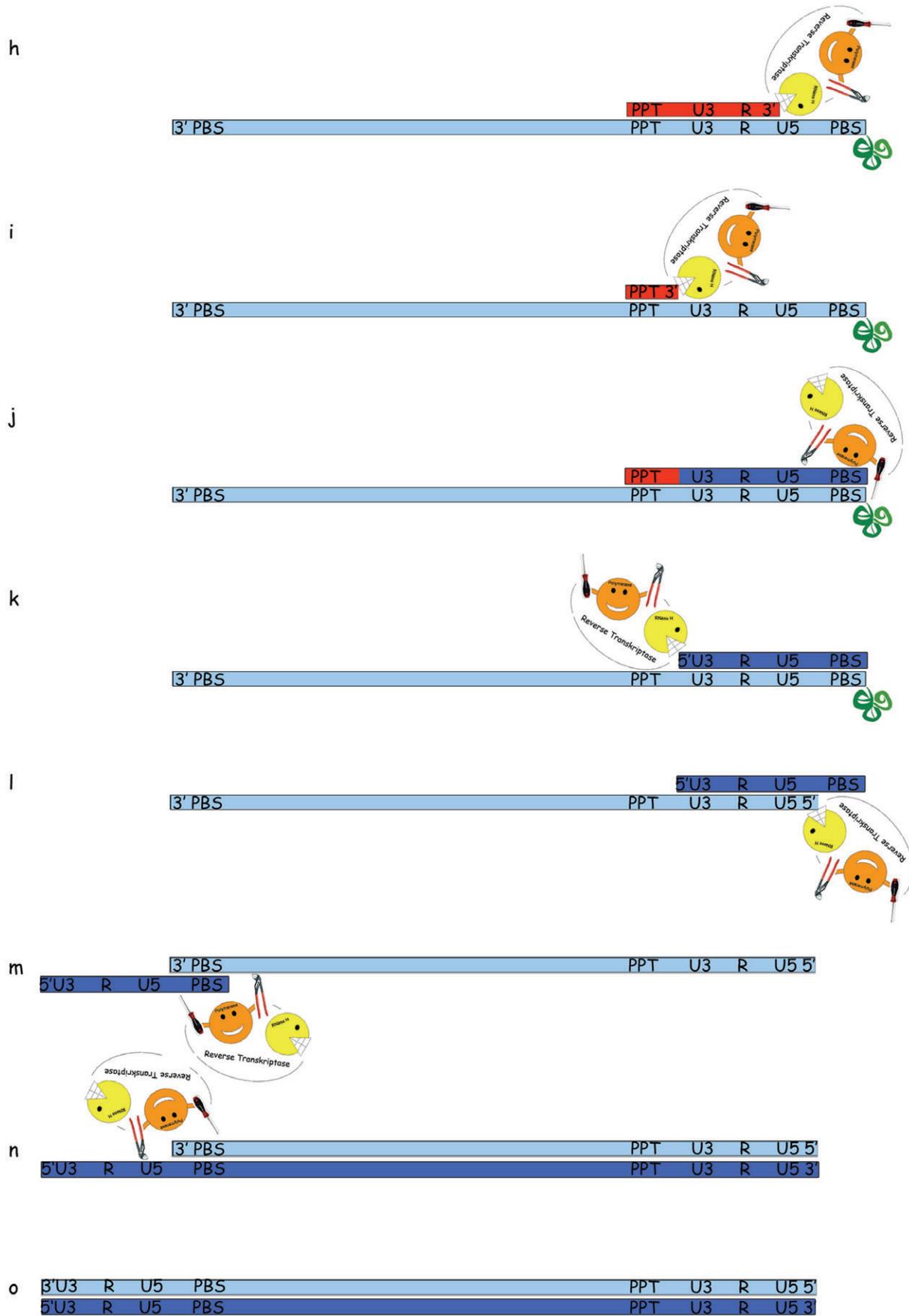


Abbildung 4: Schematische Darstellung der reversen Transkription

Die reverse Transkription wird durch ein spezielles Enzym, die reverse Transkriptase ermöglicht. Dieses Enzym verfügt über einen katabolen RNase-H-Bereich (gelb) und einen anabolen Polymerase Bereich (orange); **a**, Bindung des Primers an den Primer-Bindungsbereich (PBS) des positiven RNA-Strangs (rot); Primer ist an tRNA (grünes Kleeblatt) gebundenen; **b**, Teilsynthese des korrespondierenden DNA-Minusstrangs (hellblau); **c, d**, partieller Abbau des positiven RNA-Strangs; **e**, Translokation eines kurzen, negativen DNA-Fragments; **f**, Fortführung der DNA-Synthese; **g-i**, weiterer Abbau des RNA-Strangs; **j**, Synthese vom 3' Ende des positiven DNA-Strangs (dunkelblau); **k**, Entfernung übrig gebliebener RNA; **l**, Abbau von tRNA und vom Primer; **m**, Translokation einer kurzen positiven DNA-Sequenz und Vervollständigung des positiven DNA-Strangs; **n**, Komplettierung der fehlenden Sequenz am 3' Ende des Minusstrangs; **o**, Endprodukt der reversen Transkription von einer Einzelstrang-RNA-Matrize ist ein DNA Doppelstrang.

1.1.7 Transkription viraler und zellulärer Gene

Die Transkription von Proviren wird, genau wie die der zellulären Gene, durch Protein-DNA-Interaktionen ermöglicht. Zelluläre RNA-Polymerase-II benötigt in der Regel mehrere Transkriptionsfaktoren um an einen Promotor zu binden und die Transkription zu initiieren. Des Weiteren variieren die Nukleotidsequenzen der Promotoren, was in unterschiedlich starker Bindungsaffinität der RNA-Polymerase resultiert. Regulatorproteine, die die Transkription beeinflussen, sind Repressoren oder Aktivatoren. Repressoren binden an bestimmte Nukleotidsequenzen (Silencer) und verhindern im aktivierten Zustand die Bindung oder die Aktivität der RNA-Polymerase. Aktivatoren binden entweder an promotornahe Aktivatorbindungsstellen oder promotorferne Enhancer und fördern im aktivierten Zustand die Bindung und/oder Aktivität der RNA-Polymerase.

Die Transkriptionskontrolle von Akv ist noch nicht vollständig untersucht. Allgemein gilt für MLVs, dass die transkriptionsregulierenden Sequenzen im U3-Bereich des LTR stromaufwärts des Promotors liegen (25). Der Enhancer von Akv besteht aus einer sich einmal wiederholenden Sequenz von 99 bp. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich zahlreiche Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren. Zunächst wiesen Studien darauf hin, dass die bestimmenden Faktoren für die Leukämogenese von MLVs im *env* und/oder im U3-Bereich determiniert wären (123). Nachdem für Akv und das ihm sehr ähnliche SL3-3 Virus ausgeschlossen werden konnte, dass die leukämogenen Fähigkeiten durch das *env* Gen bestimmt werden (107), konzentrierte sich die Forschung auf das 5' LTR. Schließlich wurde der Enhancer im U3-Bereich als wesentlicher Faktor für leukämogenen Eigenschaften

dieser Viren ermittelt (20, 106). Der Aufbau des Enhancers ist innerhalb der MLVs konserviert, weshalb vom "Enhancer Framework" gesprochen wird (59).

1.1.8 Transkriptionsfaktoren und ihre Bindungsstellen im Akv-Enhancer

Unter Transkriptionsfaktoren werden Proteine verstanden, die die Gentranskription aktivieren (sogenannte "Aktivatoren") oder inhibieren (sogenannte "Repressoren") können. Sie binden an genomische DNA (sogenannte "Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen"), an RNA-Polymerasen und an andere Proteine, die im Zusammenhang mit der Regulation der Transkription eine Rolle spielen.

Abbildung 5 zeigt schematisch das 5' LTR und den Enhancer von Akv. In Kapitel "Material und Methoden" ist der Enhancer mit seiner genauen Basensequenz aufgeführt (siehe Seite 61, Abb. 8). Da noch nicht sehr viele Daten über die Bedeutung der einzelnen Bindungsstellen im Enhancer Framework spezifisch für das Akv vorliegen, werden im Folgenden Ergebnisse aus Studien mit Akv und mit Akv-ähnlichen MLVs (SL3-3, MoMLV, RFB MLV) aufgeführt.

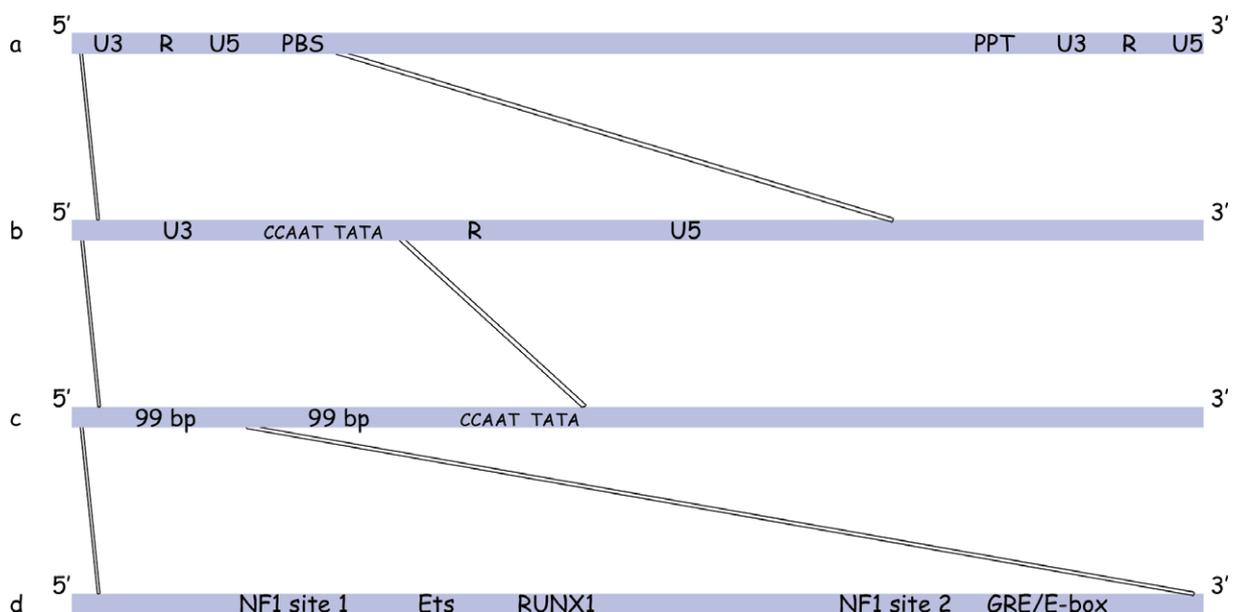


Abbildung 5: Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Akv-Enhancer

a, schematische Darstellung des proviralen Akv-Plusstrangs; **b**, Ausschnittsvergrößerung des LTR am 5' Ende des Provirus; **c**, Ausschnittsvergrößerung des U3 am 5' Ende des Provirus; eine 99 bp lange Sequenz wiederholt sich einmal; **d**, im Enhancer von Akv finden sich sechs Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

1.1.8.1 NF1 (Nukleärer Faktor 1)

Die NF1-Familie umfasst vier Proteine (A, B, C, X). Um in ihre aktive Form überzugehen, bilden sie Homo- oder Heterodimere. Zwischen Maus und Mensch herrscht eine große Homologie zwischen diesen Regulatorproteinen. Sie werden ubiquitär in Geweben exprimiert und regulieren die Expression einer Vielzahl von Genen. NF1-Proteine können als Repressoren oder Aktivatoren agieren. Eine Überexpression von c-myc und Ha-ras resultierte in einem Verlust der regulatorischen Fähigkeiten von NF1 (149). Der Bindungsbereich besteht aus einer Konsensussequenz mit dem Motiv 5'-tgga/c(n5)gccaa-3' (62).

Im Akv-Enhancer finden sich in einer 99 bp Sequenz zwei Bindungsbereiche für NF1. Eine Arbeit beschreibt (anhand vergleichender Homologien der Bindungssequenzen) drei weitere mögliche Bindungsbereiche außerhalb des direkten Repeats im U3-Bereich von Akv (163).

Expressionsstudien mit einem Reportergen zeigten, dass die vollständig vorhandene NF1-Bindungsstelle 2 im Akv-Enhancer für die Expression nicht so bedeutend ist wie die NF1-Bindungsstelle 1 (163). Induzierte Plasmozytome durch Akv1-99 (Akv λ -623 mit nur einfacher 99 bp Enhancer-Sequenz (115)) bei NMRI-Mäusen entwickelten sich unabhängig davon, ob die NF1-Bindungsstellen mutiert worden waren oder nicht (199). Für SL3-3 wurde gezeigt, dass der NF1-Bereich die Transkription in T-Zellen herunterreguliert (38). Eine Mutation im NF1-Bereich bei MoMLV geht mit einem Pathogenitätsverlust einher (202). Die NF1-Bindungsgebiete scheinen sowohl bei Akv als auch bei SL3-3 von großer Bedeutung für die Induktion von Osteopetrose zu sein (40, 199). Hinweise, dass die NF1-Bindungsstellen von Akv und Akv1-99 möglicherweise einen Einfluss auf die Entwicklung von B- oder T-Zell-Lymphomen haben könnten, stammen aus einer Studie von Lovmand et al. (115).

1.1.8.2 Ets (E26 transformations-spezifische Sequenz)

Im Ets-Bereich binden Ets-Proteine, die zur Familie der Ets-Proteine zählen (161, 162). Dieser Familie werden knapp 30 Mitglieder zugeschrieben, die als Monomer an die DNA binden. Ets-Proteinsequenzen sind im Tierreich hoch konserviert, wie z.B. Ets-1, das zwischen Huhn und Mensch eine 95%ige Homologie aufweist (34). Ets-Transkriptionsfaktoren spielen für die Differenzierung von myeloischen und erythroiden Zellen eine wichtige Rolle (58). Sie fungieren überwiegend als schwache Aktivatoren. Für das Ets-1 konnte gezeigt werden, dass es zusammen mit MafB

(musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B) als Repressor agiert und so die Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen unterdrückt (193, 194). Alle Ets-Proteine erkennen die kanonische Sequenz 5'-ggaa/t-3'.

Die Bedeutung der Ets-Bindungsstelle für Akv ist weitgehend unbekannt. Bei SL3-3 scheinen Mutationen der Ets-Bindungsstelle geringe Auswirkungen auf die Enhanceraktivität *in vitro* und die Fähigkeit zur T-Zell-Lymphom-Induktion *in vivo* zu haben (157). Vorläufige Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Mutationen im Ets- und E_{AS}-Bereich die Pathogenität von SL3-3 erheblich reduzieren [Mortensen et al. Manuskript in Vorbereitung]. Ähnliches gilt für das Ets-Analogon vom MoMLV, die LVb-Bindungsstelle. Sie ist von essentieller Bedeutung für die Enhanceraktivität und die Induktion von T-Zell-Lymphomen. Eine Mutation in diesem Bereich hat Einfluss auf das Tumorspektrum von MoMLV. Anstelle von T-Zell-Lymphomen kam es *in vivo* zur Entwicklung von Erythroleukämien (201).

1.1.8.3 RUNX1 (Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 1)

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 ist beim Mausembryo für die Entwicklung der Hämatopoese und bei der adulten Maus für die Megakaryopoese und die Differenzierung von lymphatischen Zellen von essentieller Bedeutung (83, 84). RUNX1, auch bekannt als AML1 (akutes myeloisches Leukämieprotein 1), CBFA-2 (Kernbereich-Bindungsfaktor- α -2), PEBP-2 α B (Phosphatidylethanolamine-Bindungsprotein-2 α B), PEA2 (Polyomavirus-Enhancer-Aktivator-2), PEBP2 (Polyomavirus-Enhancer-Bindungsprotein-2) und SEF1 (SL3-3-Enhancer-Faktor-1), zählt zusammen mit RUNX2 und RUNX3 zur Familie der RUNX-Transkriptionsfaktoren. In der aktiven Form wird das Heterodimer von einer α -Untereinheit vom RUNX1 und einer β -Untereinheit vom CBF β (Kernbereich-Bindungsfaktor- β) gebildet. RUNX1-Aminosäuresequenzen weisen bei Säugetieren eine große Homologie auf. Exprimiert wird RUNX1 vor allem in T-Lymphozyten (66) und hämatopoietischen Zellen. Ohne Kofaktor ist RUNX1 ein relativ schwacher Transkriptionsregulator. Als verstärkende Koaktivatoren fungieren MYB, ETS und CBP, als verstärkende Korepressoren z. B. TLE1 und mSin3A (164). In retrovirusinduzierten Leukämien der Maus konnte gezeigt werden, dass *runx1* eine bevorzugte Integrationsstelle ("common integration site", CIS) für Retroviren ist (111). *Runx1* ist beim Menschen ein häufiger Translokationsbruchpunkt mit TEL-AML1 t(12,21)-Fusion bei akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) und mit AML1-ETO

t(8;21)-Fusion bei akuten myeloischen Leukämien (AML) (113). RUNX1 hat Eigenschaften eines Tumorsuppressors und eines Protoonkogens (14). Alle RUNX Familienmitglieder binden an die Konsensussequenz 5'-tgt/cggt-3' (122).

Für Akv ist bislang nicht bekannt, wie sich eine Mutation im RUNX1-Bindungsereich auswirkt. SL3-3 verfügt über zwei RUNX1-Bindungsstellen. Dort eingefügte Mutationen vermindern die Pathogenität, wobei sich der Verlust stärker auswirkt, wenn der RUNX1-Bereich-II modifiziert wird (66). Werden beide Bereiche modifiziert, nimmt die Expression des Virus *in vitro* um das drei- bis sechsfache ab (213) und verliert *in vivo* seine Pathogenität (66). Eine Modifikation von RUNX1 im MoMLV-Enhancer führt zu einer Verschiebung von T-Zell-Lymphomen hin zu Erythroleukämien (201). Eine zweifache Reduktion der Transkriptionsfaktor-Bindungsfähigkeit konnte für SL3-3 nachgewiesen werden, nachdem der RUNX1-Bindungsereich von SL3-3 mit dem RUNX1-Bindungsereich von Akv substituiert worden war (228). Eine drei- bis vierfach geringere Expression des gleichen Virus wurde in verschiedenen T-Zelllinien gefunden (229). SL3-3 induziert fast ausschließlich T-Zell-Lymphome. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass SL3-3 mit mutierten RUNX1-Bereichen B-Zell-Lymphome, akute myeloische Leukämien und Erythroleukämien induzierte (198).

1.1.8.4 GR (Glukokortikoid Rezeptor)

An das "glucocorticoid response element" (GRE) bindet die aktive Form (Homodimer) des Glukokortikoid-Rezeptors. Durch Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren wird die Transkription spezifischer Gene aktiviert. Die Konsensussequenz für GRE ist 5'-agaaca(n)₃tgttct-3'.

In Zellkultur konnte für SL3-3, Akv und das dem Akv ähnlichen Reilly-Finkel-Biskis MLV (RFB MLV) eine Enhanceraktivitäts-Steigerung durch Zugabe eines steroidalen Antiphlogistikums (Dexamethason) erzielt werden (17, 57, 65). Da beim Akv GRE mit der E-Box überlappt, wirkt sich eine Mutation der E-Box supprimierend auf die GRE-Bindungsfähigkeit und damit auf die Enhanceraktivität aus (156).

1.1.8.5 bHLH Proteine (Basische Helix-Loop-Helix Proteine)

Die Familie der Transkriptionsfaktoren, die an die E-Box, den E_{GRE}- und den E_{A/S}-Bindungsereich binden, umfasst über 200 Mitglieder. Es sind basische Helix-Loop-Helix Proteine, die als Dimer in ihrer aktiven Form vorliegen und vor allem bei

Lymphopoese, Hämatopoese, Myo- und Neurogenese eine regulatorische Funktion haben. Einigen Familienmitgliedern werden Tumorsuppressor-Eigenschaften zugeschrieben (z.B. E2A). Die Faktoren binden an die Konsensussequenz 5'-ncanntgn-3'.

In lymphatischen Zelllinien durchgeführte Expressionsstudien zeigten, dass nicht mutierte E-Box-Sequenzen von essentieller Bedeutung für die Enhanceraktivität von Akv sind (155). Das gilt jedoch nicht für analoge Studien mit NIH-3T3- oder HeLa-Zellen (155). Für die provirale Transkription in T-Zellen, aktiviert durch den Transkriptionsfaktor ALF1, scheinen beide E_{GRE}-Bereiche im Enhancer von Akv gleichermaßen von Bedeutung zu sein. In B-Zellen ist die promotornahe Box von größerer Bedeutung für die Enhanceraktivität als die promotorferne. Um als Aktivator fungieren zu können, benötigt ALF1 mindestens einen nicht-mutierten E_{GRE}-Bereich. Eine Bindung von ALF1 an die E_{AS}-Bindungsstelle aktiviert den Enhancer nicht (155). *In vivo* Studien zeigten, dass die Latenzzeit bis zur Entwicklung von T-Zell-Lymphomen bei Mäusen durch das MoMLV mit mutierten E_{GRE}-Bereichen verdoppelt wird (201).

1.2 Hämatopoietische und lymphatische Organe der Maus

Im Folgenden werden Merkmale von hämatopoietischen und lymphatischen Organen dargestellt, die bei der klinischen und pathologischen Untersuchung einer Maus im Vergleich zum Menschen wichtig sind und für die spätere Interpretation der makroskopischen, histologischen und immunhistochemischen Befunde eine besondere Bedeutung haben.

1.2.1 Die Milz

Abbildung 6 skizziert die mikroskopische Anatomie der murinen Milz. Selbst durch tiefe Palpation kann die gesunde Milz einer Maus i. d. R. nicht ertastet werden. Das Organ eines adulten Tieres ist je nach Mausstamm 10 bis 20 mm lang. Im Gegensatz zum Menschen findet bei der Maus während der gesamten Lebensdauer eine mehr oder weniger starke, extramedulläre Hämatopoiese in der Milz statt (112). Eine extramedulläre Hämatopoiese in der menschlichen Milz stellt immer einen pathologischen Befund dar. Die Milz ist von einer bindegewebigen Kapsel umgeben. Von der Milzkapsel ziehen kurze Septen aus glatten Muskelzellen und Bindegewebszellen in die Milzpulpa ein. Die für gewöhnlich geringe Granulopoiese bleibt auf die unmittelbare Umgebung dieser Septen begrenzt. Bei entzündlichen und leukämischen Prozessen finden sich Myeloblasten und Granulozyten in der gesamten roten Pulpa. Thrombozytopoiese und Erythropoiese sind meist diffus in der roten Pulpa zu erkennen und stärker als die Granulopoiese ausgeprägt. Die Tatsache, dass bei Mäusen die Milz neben dem Knochenmark lebenslang wesentliches Blutbildungsorgan bleibt (126), ist bei der Diagnostik leukämischer Erkrankungen von besonderer Bedeutung (94).

Der Vergleich von weißer Milzpulpa bei Maus und Mensch ist schwierig, da Bezeichnungen und Nomenklatur von Mikrovaskularisation und anderen Strukturen in der humanen Milz uneinheitlich sind (87, 207). Ursache hierfür mag sein, dass die meisten Erkenntnisse über Funktion und histologische Architektur aus Studien an Maus- und Rattenmilzen gewonnen und auf die humane Milz übertragen worden sind, obwohl es deutliche Unterschiede zwischen den Spezies gibt. Steiniger et al. (206) stellten vier wesentliche Unterschiede heraus:

1. Die humane weiße Pulpa besteht hauptsächlich aus primären B-Zell-Follikeln. Bei der Maus wird der Hauptanteil der weißen Pulpa von periarteriolen lymphatischen Scheiden (PALS) gebildet (139). Die PALS umgeben exzentrisch die sogenannten "Zentralarteriolen" und bestehen hauptsächlich aus CD3-positiven T-Lymphozyten. Da sich beim Menschen weniger, unregelmäßig angeordnete, polymorphe, CD4-exprimierende Lymphozyten um die Arteriolen befinden, sollte nicht von einer lymphatischen Scheide gesprochen werden (87).
2. Humane Marginalzonen (MZ) sind in der Milz und in den Lymphknoten Bestandteile der sekundären Lymphfollikel. In der Nähe von Milzarteriolen finden sich nur vereinzelt B-Lymphozyten. Nach Morse et al. (139) befinden sich bei der Maus MZ ausschließlich um die PALS in der Milz. Die Marginalzone ist je nach Mausstamm unscheinbar bis deutlich ausgebildet. Älteren Beschreibungen nach soll es auch bei der Maus MZ im Sekundärfollikel geben (218). In eigenen Untersuchungen waren MZ im Lymphknoten lichtmikroskopisch nicht darstellbar. In der Milz liegt zwischen MZ und PALS eine weitere Schicht aus B-Lymphozyten, die sogenannte "Mantelzone".
3. Bei der Maus und stärker noch bei der Ratte, ist in der Milz eine schmale Zone zwischen MZ und Mantelzone lichtmikroskopisch erkennbar. Diese Zone heißt Marginalsinus und nimmt Blut aus Zentralarteriolen auf (49). MZ und Mantelzone der Sekundärfollikel sind beim Menschen lichtmikroskopisch nicht durch einen Marginalsinus getrennt.
4. Beim Menschen wird eine sogenannte "perifollikuläre Zone" beschrieben, die sowohl am Übergang von MZ zur roten Pulpa als auch am Übergang von T-Lymphozytenaggregationen nahe der Arteriolen zur roten Pulpa liegt. In dieser Zone befinden sich umscheidete Kapillaren, in denen die Blutfiltration stattfindet. Nachdem das Blut die am Ende dieser Kapillaren konzentrisch angeordneten Makrophagen passiert hat, gelangt es in die Sinus der roten Pulpa und ist ab dort *per definitionem* venös. Eine perifollikuläre Zone gibt es bei der Maus nicht; sie verfügt dennoch über die umscheideten Kapillaren, die meist als Hülsenkapillaren bezeichnet werden.
5. Die murinen Sekundärfollikel der Milz sind anhand ihrer Keimzentren leicht zu erkennen, ganz im Gegenteil zu den Primärfollikeln, die sich ohne immunhistochemische Färbungen selten deutlich darstellen, da sie meist an und teils in der Marginalzone lokalisiert sind (218).

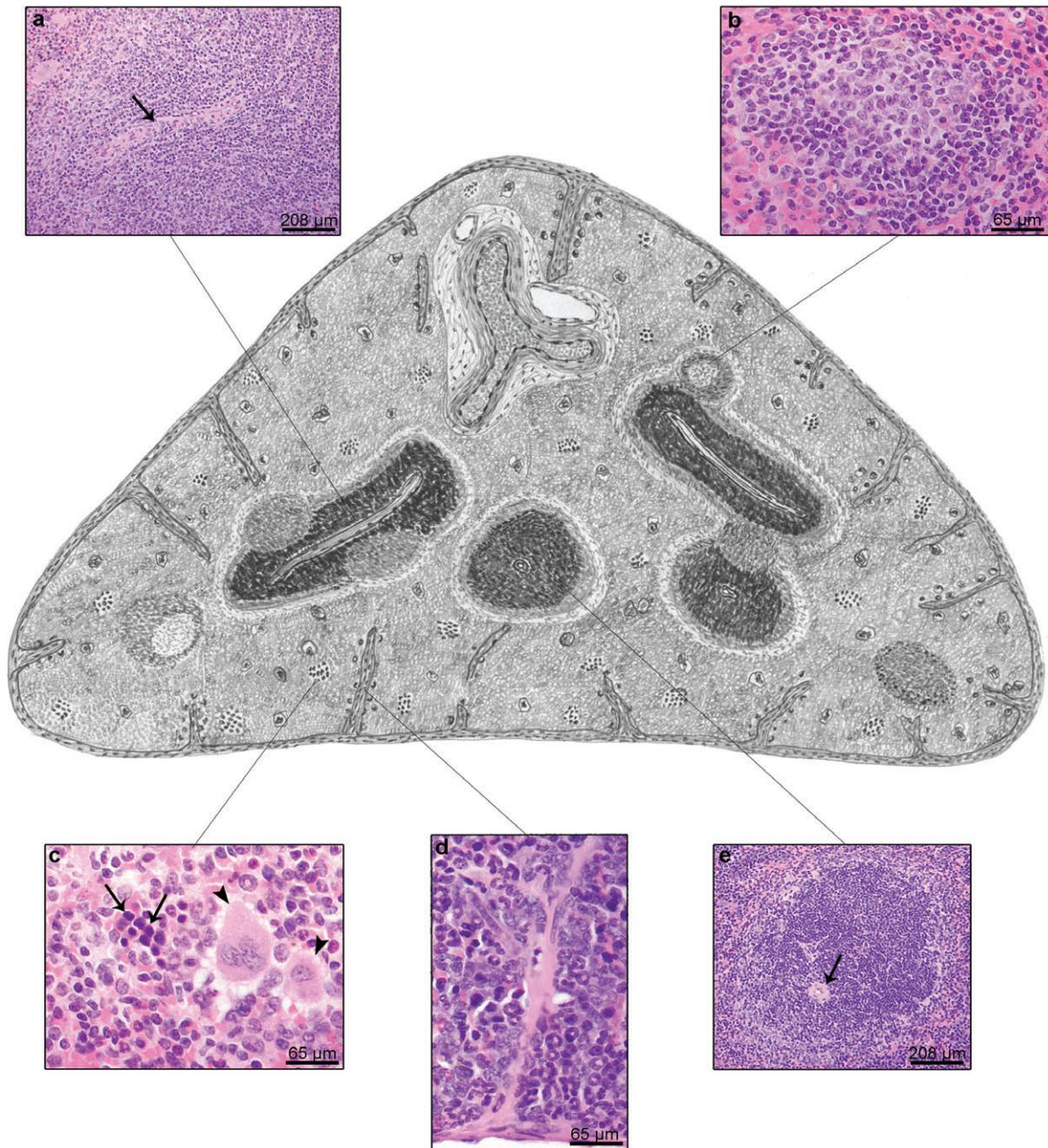


Abbildung 6: Mikroskopische Anatomie der murinen Milz

a, e, zentralständige Arteriole (Pfeil) mit periarteriolarer lymphatischer Scheide im Längsschnitt (**a**) und Querschnitt (**e**); **b**, Sekundärfollikel ohne Begleitung einer Arteriole; **c**, rote Milzpulpa mit Zellen der erythroiden Blutlinie (Pfeile) und zwei Megakaryozyten (Pfeilspitzen); **d**, von der Kapsel ins Milzparenchym ziehendes Trabekel mit umgebenen Zellen der granulopoietischen Linie.

1.2.2 Der Thymus

Makroskopisch unterteilt sich der Thymus bei der Maus in zwei Thymuslappen. Junge Mäuse haben einen größeren Thymus als alte Tiere, wobei er während der ersten 14 Tage postnatal das höchste relative Gewicht erreicht. Im Alter von 35 Tagen lässt sich das höchste absolute Gewicht verzeichnen (196). Die altersbedingte Involution ist bei der Maus niemals komplett (140). Ein hyperplastischer Thymus beansprucht Platz in der Brusthöhle und kann bei entsprechender Größe zu Atembeschwerden führen.

Mikroskopisch ist die Medulla gut vom Kortex abgegrenzt. Die Thymozyten reifen bei Mensch und Maus während ihrer Migration von der Peripherie in Richtung Mark zu reifen T-Zellen heran. Frühe Thymozyten (zytoplasmatisch positiv für CD3) sind in der äußeren Rinde lokalisiert und entwickeln sich zu intermediären Thymozyten (nukleär positiv für Tdt, membranös positiv sind für CD1, CD4 und CD8) und schließlich zu reifen Thymozyten (Tdt-negativ, membranös CD3- und entweder CD4- oder CD8-positiv). Bedingt durch einen höheren Zytoplasmagehalt sind die reifen Thymozyten des Markes etwas größer als die unreifen Thymozyten der Rinde. Es lassen sich ebenfalls B220-positive B-Lymphozyten im Mark nachweisen, die bei der Maus gelegentlich als hyperplastische, deutlich erkennbare B-Zell-Knötchen hervortreten und mitunter sogar Keimzentren aufweisen.

Ein weiterer Unterschied zwischen dem murinen und humanen Thymus besteht in der epithelialen Komponente. Bei beiden Spezies wird zwischen kortikalen und medullären, epithelialen Zellen unterschieden, wobei die medullären, epithelialen Zellen deutlicher zu erkennen sind. Wenn medulläre, epitheliale Zellen aggregieren, formieren sie sich zu sogenannten "Hassall'schen Körperchen". Morphologisch unterscheiden sich diese zum einen in der Anzahl der Zellen - bei der Maus sind es nur zwei bis drei Zellen, beim Menschen acht bis zwölf - und zum anderen in ihrem Keratingehalt. Bei der Maus erfolgt i. d. R. keine Keratinisierung (41); beim Menschen weisen die Hassall'schen Körper auffallende, zentralständige Keratineinlagerungen auf.

1.2.3 Die Lymphknoten

Die Untersuchung von Lymphknoten war für diese Studie von erheblicher Bedeutung. Lage und Anzahl wichtiger Lymphknoten (LK) bei der Maus stellt Abbildung 7 dar. Bei einer gesunden Maus sind die Lymphknoten nicht tastbar. Der

Umfang vergrößerter Hals-LK kann durch Spannen der Halshaut im Nackenbereich sichtbar gemacht werden. Durch tiefe Palpation des Abdomens ist ein vergrößerter Mesenterial-LK tastbar. Nur vergrößerte Popliteal-LK sind einer äußeren Untersuchung zugänglich.

In ihrer mikroskopischen Architektur ähneln die Lymphknoten der Maus denen anderer Säugetiere. Die morphologische Einteilung von murinen Lymphfollikeln unterscheidet Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel (218). Nach dieser Beschreibung sind murine Primärfollikel ruhende Aggregate von kleinen, naiven B-Lymphozyten, die zentral vereinzelt größere Zellen aufweisen. Nach Antigenstimulation bilden sich Sekundärfollikel mit Keimzentren und Mantelzone aus. Die Keimzentren setzen sich aus Zentroblasten, Zentrozyten, Makrophagen und follikulär-dendritischen Zellen zusammen. Die beim Menschen nicht beschriebenen Tertiärfollikel gehen aus den Sekundärfollikeln beim Abklingen einer Antigenreaktion hervor und enthalten weniger Zentroblasten, Zentrozyten und Makrophagen im Keimzentrum als Sekundärfollikel. Mitotische Keimzentrumzellen sind in humanen Sekundärfollikeln überwiegend im dunklen Keimzentrumsbereich lokalisiert. Die follikulär-dendritischen Zellen finden sich in der hellen Keimzentrumzone. Bei der Maus ist eine Unterscheidung zwischen heller und dunkler Seite eines Keimzentrums meist schwierig, da Mitosen und Apoptosen diffus im Keimzentrum vorkommen (19). Extramedulläre Hämatopoiese kommt mitunter im Mesenterial-LK von gesunden Mäusen vor und findet in den Marksträngen statt (218).

Eine Lymphadenitis resultiert meist aus der Drainage von Hautläsionen oder Tumorgewebe und geht vor allem in den Marksträngen mit einer Infiltration von Neutrophilen, Eosinophilen, Myeloblasten und Plasmazellen einher. Beispielsweise proliferieren extrafollikuläre B-Zellen nach einer murinen Mammatumovirus-Infektion mit einem Gipfel am Tag sechs und differenzieren sich anschließend zu Plasmablasten und reifen Plasmazellen (47).

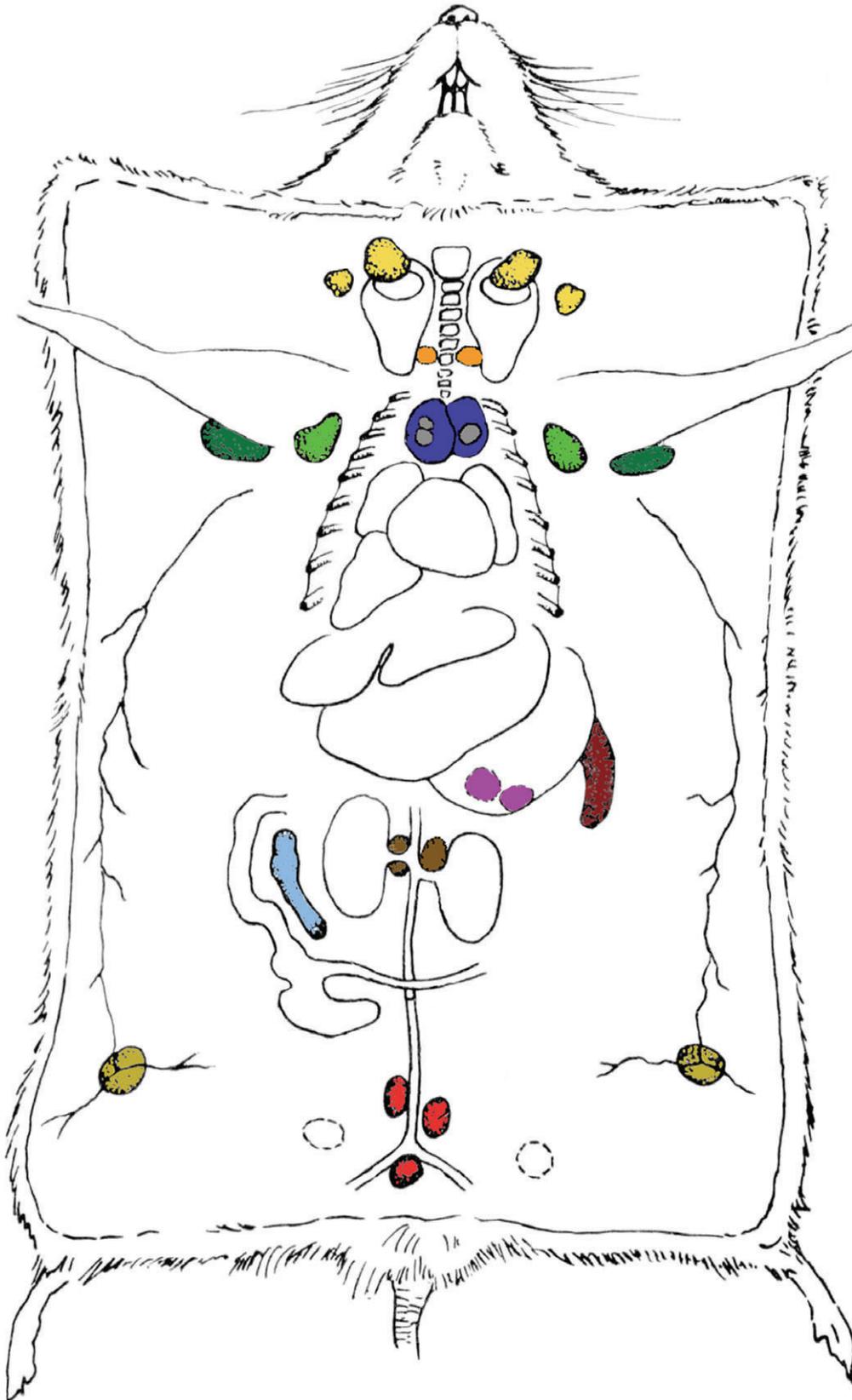


Abbildung 7: Lage von Lymphknoten, Thymus und Milz der Maus

Abbildung nach Dunn (35); Bei einer gesunden Maus sind die Lymphknoten sehr klein (1-3 mm) und oft unscheinbar. Die Größe der Lymphknoten ist in dieser Abbildung nicht maßstabsgetreu eingezeichnet. Im Halsbereich liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Speicheldrüsen mittlere

und äußere oberflächliche Halslymphknoten (Nodi lymphatici (NII.) cervicales superficiales medii und laterales; **gelb**). Weiter kaudal liegen tiefe Halslymphknoten (NII. cervicales profundi; **orange**). Im kranialen Bereich der Brusthöhle befindet sich der zweilappige Thymus (**dunkelblau**). Ihm liegen dorsal thorakale Aortenlymphknoten (NII. thoracii aortici; **grau**) auf. Achsellymphknoten (NII. axillares; **hellgrün**) und Armlymphknoten (NII. brachiales; **dunkelgrün**) sind im Durchmesser etwa 2 mm groß. Die murine Milz (**dunkelrot**) ist ca. 15 mm lang und 2 bis 4 mm breit. Unregelmäßig in ihrer Anzahl vorkommende Bauchspeicheldrüsen-Duodenal-Lymphknoten (NII. pancreaticoduodenales; **lila**) liegen im Gekröse der Bauchspeicheldrüse. Nierenlymphknoten (NII. renales; **dunkelbraun**) können ebenfalls in verschiedener Anzahl vorkommen. Im Grimmdarmgekröse liegt der gut sichtbare, längliche Mesenteriallymphknoten (NI. mesentericus; **hellblau**). Paraortal liegende Lymphknoten (NII. lumbales und der NI. caudalis; **rot**) sind bei einer gesunden Maus sehr klein und unscheinbar. Subkutan liegende Inguinallymphknoten (NII. inguinales; **hellbraun**) sind bei der Sektion leicht zugänglich.

1.3 Klassifikation humaner hämatopoietischer Tumore

Die Namensgebung hämatopoietischer Erkrankungen und ihre Einordnung in ein Klassifizierungsschema führten und führen immer wieder zu neuen, erweiterten oder abgeänderten Klassifikationen. Durch molekularbiologische und genetische Untersuchungen werden stetig neue Erkenntnisse über Entwicklung und Funktionsweise des hämatopoietischen Systems gewonnen. Je umfassender und detaillierter dieses Wissen ist, desto erfolgreicher können annehmbare und diagnostisch wertvolle Vorschläge für eine Klassifizierung von Erkrankungen des hämatopoietischen Systems erarbeitet werden. Die rasante Evolution der Klassifikationen führte mitunter sogar bei Onkologen und Pathologen zu Unsicherheiten (45). In einem Lehrbuch heißt es: "As one reflects upon this tortuous history [der Entwicklung der Klassifikationen für lymphatische Erkrankungen] and browses over the current scheme, one cannot help but smile when remembering the caustic comment of Rupert Willis in 1948 to the effect that "nowhere in pathology has a chaos of names so clouded clear concepts as in the subject of lymphoid tumours" and his criticism of the "artificial distinctions ... created by naming tumours merely according to the degree of differentiation attained by their cells". What would he think, one wonders, if he were alive today?" (90).

Nachdem eine Reihe von Klassifikationen vorgeschlagen, weiterentwickelt und zum Teil wieder verworfen worden sind (1, 4, 7, 68, 103-105, 119-121, 127, 137, 180, 183, 204) wurde 2001 von Hämatopathologen in Zusammenarbeit mit der "European Association for Haematopathology" und der "Society for Haematopathology" die neue WHO-Klassifikation publiziert (89). Sie umfasst neben lymphatischen Neoplasien auch Leukämien, myeloproliferative Erkrankungen und myelodysplastische Syndrome. Gestützt auf histopathologische und genetische Kriterien sollte mit dieser Klassifikation eine von Pathologen, Onkologen, Immunologen und Genetikern weltweit anerkannte Nomenklatur geschaffen werden. Der Einteilung wurde die Linienzugehörigkeit der neoplastischen Zellen zugrunde gelegt, sodass myeloische, lymphatische, histiozytäre/dendritische und mastozytäre Tumore/Erkrankungen unterschieden werden. In Tabelle 1 (siehe Seite 36 ff) sind alle in dieser Klassifikation aufgeführten Erkrankungen zusammengestellt.

1.4 Klassifikationen muriner hämatopoietischer Tumore

Die Veterinärpathologie orientiert sich, insbesondere seit der zunehmenden Anzahl von Mausmodellen für menschliche Erkrankungen, häufig an humanpathologischen Erkenntnissen. Es verwundert nicht, dass sich die Komplexität der Klassifizierung humaner hämatopoietischer Tumore in der Maushämatopathologie widerspiegelt. Thelma Dunn kommentierte bereits 1954: "The terminology of neoplastic diseases of the reticular systems in the mouse shares in (and is indeed a reflection of) the confusion that has beset the naming of these conditions in man. ... The pathologist must sometimes wonder whether a histogenetic classification of tumors may not obscure more than it illuminates". Tatsächlich ist diese "histogenetische" Tumoreinteilung in der Hämatopathologie nicht mehr wegzudenken. Der Einsatz von Mausmodellen zu Erforschung humaner hämatopoietischer Erkrankungen macht es unabdingbar, Einteilungskriterien über die histomorphologischen Befunde hinaus zu suchen. Die beiden sogenannten "Bethesda Proposals" für murine hämatopoietische Neoplasien (94, 138) sind aus dieser Notwendigkeit heraus entstanden. Speziell durch den Einsatz genetisch veränderter Mäuse ist in den letzten 15 Jahren versucht worden, humane Erkrankungen im Mausmodell nachzustellen. Allgemein anerkannte, umfassende, mausspezifische Richtlinien für die Diagnostik dieser induzierten Läsionen waren nicht vorhanden; ein Mangel, der dazu führte, dass mitunter identische Erkrankungen mit unterschiedlichen Namen belegt wurden. Auf der anderen Seite kam es vor, dass für Läsionen, die humanen Neoplasien lediglich ähnelten, die humane Terminologie übernommen wurde. Manche Arbeitsgruppen umgingen diese Problematik und beließen es bei der Diagnose "Leukämie" oder "Lymphom", ohne eine genauere Einteilung vorzunehmen. Ein Vergleich von Ergebnissen verschiedener Studien war und ist dadurch nicht immer einfach.

Wie in der Humanhämatopathologie sind auch die wenigen Klassifikationen für Mauslymphome und -leukämien einem ständigen Entwicklungsprozess unterworfen. Eine Erarbeitung und Weiterentwicklung dieser erfolgte jedoch immer von Einzelpersonen oder kleinen Arbeitsgruppen, die sich auf die Mauspathologie spezialisiert hatten (35, 48, 53-55, 166, 167, 177, 219). Die "Bethesda Proposals" (94, 138) sind, wie auch die meisten anderen Klassifizierungsvorschläge, in Anlehnung an die jeweils aktuelle Klassifikation der Humanmedizin entstanden.

Einzigartig ist sie unter den Mausklassifikationen in vielerlei Hinsichten. Zum einen hat sich erstmals eine große internationale Gruppe von Mauspathologen, Humanhämatopathologen und Molekularbiologen für die Erarbeitung einer Klassifikation zusammengefunden. Zum anderen enthalten die "Bethesda Proposals" neben morphologischen Kriterien der Tumore auch Daten über Blutuntersuchungen, Immunphänotypisierungen, Zytologie, genetische Besonderheiten und klinischen Verlauf. Zusätzlich werden umfassende Informationen auf der Internetseite der Zeitschrift "Blood" bereitgestellt (142), die allgemeine Hinweise zur Fixierung und Untersuchung von Tumorgewebe sowie eine detaillierte Auflistung aller diskutierten Mausmutanten enthält. In Tabelle 1 (siehe Seite 36 ff) sind alle in den "Bethesda Proposals" angesprochenen Erkrankungen aufgeführt. Im Verlauf der Untersuchungen der vorliegenden Studie stellte sich heraus, dass es nicht immer einfach war, den "Bethesda Proposals" zu folgen. Auf der einen Seite traten Tumorformen auf, die nicht in den "Bethesda Proposals" genannt werden; auf der anderen Seite werden Tumore beschrieben, die ausschließlich bei ganz speziellen, genetisch veränderten Mauslinien beobachtet wurden. Dennoch werden nachfolgend einzelne Tumorarten wegen ihrer besonderen Bedeutung für diese Studie kurz vorgestellt.

1.4.1 Lymphatische Neoplasien und verwandte Erkrankungen

Bei den lymphatischen Neoplasien unterscheiden die "Bethesda Proposals" Lymphome und Leukämien, die auf B-Zellen sowie solche, die auf T-Zellen zurückgehen. Weiterhin werden Tumore unterschieden, die aus unreifen und solche, die aus reifen Lymphozyten hervorgegangen sind. Im Unterschied zu Leukämien werden unter Lymphomen lokalisierte Proliferationen von lymphatischen Tumorzellen verstanden.

1.4.1.1 Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom (Prä-T LBL)

Ein Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom gehört zu der Gruppe von Erkrankungen, die auf unreife Lymphozyten, die sogenannten "Lymphoblasten" zurückgehen. Als Ursprungszelle dieses Tumors wird ein unreifer Thymozyt angenommen. Tumorzellen sind von mittlerer Größe, morphologisch monoton, verfügen über einen runden, blastischen Kern mit ein bis drei auffälligen

Kernkörperchen und enthalten wenig Zytoplasma. Neoplastische Zellen lassen sich mit Antikörpern gegen CD3 und Tdt markieren. Sie sind je nach individuellem Entwicklungsstand CD4-/CD8-negativ, CD4-/CD8-positiv oder einfach positiv. Molekularbiologisch weist die Zellpopulation ein monoklonal rearrangiertes T-Zell-Rezeptor- β Gen (TCR β) auf. Tumöröse Zellen proliferieren stark und infiltrieren nahezu alle Organe. Bei geringer Vergrößerung lässt sich im histologischen Schnitt bereits ein sogenanntes "Sternenhimmelmuster" erkennen, welches durch zahlreiche Makrophagen verursacht wird, die Zellreste apoptotischer Tumorzellen phagozytieren. Makroskopisch finden sich eine Lymphadenopathie, Splenomegalie und ein vergrößerter Thymus. Dieses Lymphom scheint bei Maus und Mensch identisch zu sein.

1.4.1.2 Kleinzelliges B-Zell-Lymphom (SBL)

Als Ursprungszelle des kleinzelligen B-Zell-Lymphoms wird eine reife, rezirkulierende, naive B-Zelle oder B-Gedächtniszelle postuliert. Die kleinen runden Zellen verfügen über wenig basophiles Zytoplasma, runde Nuklei mit einem hohen Heterochromatinanteil sowie über unscheinbare Nukleoli. Als reife B-Zellen tragen sie Oberflächen-Immunglobuline und exprimieren B220 und CD19 Antigene. Die Zellpopulation verfügt sowohl über monoklonal rearrangierte IgH- als auch Igk-Genbereiche. Die Proliferationsrate ist nicht sehr hoch. Zytologisch weist es Ähnlichkeiten mit der humanen chronisch lymphoblastischen Leukämie (CLL) bzw. kleinzellig lymphozytischen Leukämie (SLL) auf, unterscheidet sich aber im histologischen Bild, im Immunphänotyp und in der Organmanifestation. Im Gegensatz zum humanen CLL ist das murine Knochenmark bei diesem Lymphom selten stark betroffen. Makroskopisch lässt sich in erster Linie eine Splenomegalie feststellen. In schweren Fällen kommt es auch zur Lymphadenopathie und Hepatomegalie.

1.4.1.3 Splenisches Marginalzonen-Lymphom (SMZL)

Das splenische Marginalzonen-Lymphom geht auf eine entartete Marginalzonenzelle zurück (siehe Kapitel 1.2.1). Die Zellen sind mittelgroß und verfügen in der HE-Färbung über reichlich gräulich-, bis blassrosafarbenes Zytoplasma. Ihre Kerne sind rund oder oval und haben vesikuläres oder gesprenkeltes Chromatin. Die Kernkörperchen sind selten deutlich zu erkennen. Nach den "Bethesda Proposals"

lassen sich immunhistochemisch Oberflächen-IgM, B220 und CD19 nachweisen. Im Untersuchungsmaterial des Instituts für Pathologie der GSF sind jedoch auch splenische Marginalzonen-Lymphome analysiert worden, die B220-negativ waren. Der B-Zell-Charakter dieser Fälle konnte jedoch durch CD79acy-Positivität nachgewiesen werden. Die Tumorzellpopulation verfügt über monoklonal rearrangierte IgH- und Igκ-Gene. Der Tumor wächst langsam; mitotische Zellen sind eher rar. Anfangs sind die Tumorzellen ausschließlich in den Marginalzonen der Milz lokalisiert, können aber in fortgeschrittenem Stadium die umliegende weiße und rote Pulpa infiltrieren. Im späten Stadium ähneln die Zellen Zentroblasten und Mitosen können zahlreich sein. Da der Tumor meist auf die Milz begrenzt bleibt, ist makroskopisch in der Regel nur eine Splenomegalie zu verzeichnen. Teilweise kann der Milz-LK beteiligt sein. Das humane und murine SMZL weisen morphologische Ähnlichkeiten auf.

1.4.1.4 Follikuläres B-Zell-Lymphom (FBL)

Das folliculäre B-Zell-Lymphom wurde in früheren Klassifikationen als "small follicular center cell lymphoma; FCC – small type" oder als "mixed follicular center cell lymphoma; FCC - mixed type" bezeichnet (54, 166). Als Ursprungszellen dieses Tumors kommt eine folliculäre Keimzentrumszelle in Frage. Die Zellpopulation setzt sich aus Zentrozyten und Zentroblasten zusammen. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist bei beiden Zellarten relativ groß. Mehr als 50% der Tumorzellen sind Zentrozyten. Zentrozyten haben einen gespaltenen Zellkern und unscheinbare Nukleoli. Sie sind reife B-Zellen, exprimieren Oberflächen-IgM, B220 sowie CD19 und verfügen über monoklonale Rearrangierung vom IgH- und Igκ-Gen. Zentroblasten stellen die proliferierende Zellfraktion dar. Sie verfügen über runde Zellkerne und zwei bis drei exzentrisch angeordnete Nukleoli. Die Anzahl an Mitosen ist von dem Anteil der Zentroblasten an der Tumorzellpopulation abhängig. In der Milz zeigt das folliculäre B-Zell-Lymphom ein noduläres, in den Lymphknoten hingegen ein überwiegend diffuses Wachstum. Infiltrierende, reaktive T-Zellen können in großer Menge vorkommen. Bereits makroskopisch lassen sich neoplastische Follikel als weiße Knötchen in der Milz von der roten Pulpa abgrenzen. Neben Splenomegalie findet sich oftmals ein vergrößerter Mesenterial-LK. Mitunter liegen vergrößerte Peyersche Plaques vor.

Beim Menschen weisen fast alle folliculären B-Zell-Lymphome zytogenetische Abnormalitäten auf. Eine der häufigsten Abnormalitäten ist die 14;18 Translokation, bei der das *bcl-2* Gen vom Chromosom 18 auf das Chromosom 14 verlagert wird und dort unter der Transkriptionskontrolle des IgH-Gens dauerhaft exprimiert wird. Der anti-apoptotische Einfluss des BCL-2-Proteins führt zu einer übermäßigen Akkumulation von tumorösen B-Zellen und so zum Tumorwachstum. Diese Translokation wurde bis dato noch nicht für spontane, folliculäre B-Zell-Lymphome bei der Maus beschrieben, was darauf hindeutet, dass es sich möglicherweise bei Mensch und Maus um zwei verschiedene Lymphome handelt.

1.4.1.5 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)

In älteren Klassifikationen für Mauslymphome wurde davon ausgegangen, dass das diffus großzellige B-Zell-Lymphom ausschließlich aus Keimzentrumzellen hervorgehen würde. Es wurde daher als "large follicular center cell lymphoma; FCC - large type" bezeichnet (54, 166). Nach den "Bethesda Proposals" hingegen kann das diffus großzellige B-Zell-Lymphom von verschiedenen Ursprungszellen ausgehen (Zentroblasten, Marginalzonenzellen, Immunoblasten). Die Zentroblasten sind mittelgroß bis groß, haben einen runden Kern mit offenem Chromatin, zwei bis drei randständige Kernkörperchen und viel Zytoplasma. Immunoblasten sind große Zellen mit reichlich Zytoplasma, einem rundem Nukleus, offenem Chromatin und einem zentralständigen, pinkfarbenen Nukleolus, welcher manchmal stäbchenförmig ist. Tumorzellen sind IgM-, B220- und CD19-positiv und zeigen monoklonale Rearrangierungen vom IgH- und Igk-Gen. Mitosen sind zahlreich. Das Wachstum ist in den meisten Fällen diffus, sodass die Architektur befallener Organe nach und nach zerstört wird. Splenomegalie lässt sich makroskopisch immer nachweisen; zum Teil gibt es Lymphadenopathie sowie Infiltration von nicht-lymphatischen Geweben. Morphologisch können DLBCL bei der Maus in drei Varianten unterteilt werden: das zentroblastische DLBCL, das immunoblastische DLBCL und das histiozyten-assoziierte DLBCL. Beim zentroblastischen DLBCL machen die Zentroblasten mindestens 50% und Immunoblasten maximal 10% der Tumorzellpopulation aus. Mehr als 10% Immunoblasten und bis zu 50% Zentroblasten finden sich bei der immunoblastischen Variante. Diese ist bei der Maus eher selten und hat neben einer hohen Mitoserate auch eine hohe Apoptoserate, sodass ein deutliches "Sternenhimmelbild" erkennbar ist. Eine dritte Variante zeichnet sich durch das hohe

Vorkommen von Histozyten, Fremdkörperriesenzellen, kleinen infiltrierenden T-Zellen und einer Mischung von Zentroblasten und Immunoblasten aus. Im Untersuchungsgut des Instituts für Pathologie der GSF kam diese Variante am häufigsten vor. Der Anteil an Histozyten war nie höher als 70%. Manche T-Zell-reiche DLBCL wiesen wenige bis gar keine Histozyten auf. Für die T-Zellen ließen sich mitunter monoklonale Rearrangierungen für den TCR β nachweisen. Ein ähnliches Lymphom ist beim Menschen nicht bekannt. Da sowohl bei der Maus als auch beim Menschen eine exakte Zuordnung zu einer der morphologischen DLBCL-Varianten nicht immer möglich ist und sie auch keinen prognostischen oder therapeutischen Wert hat, wird die weitere Unterteilung von DLBCL sowohl von den Autoren der WHO-Klassifikation als auch von den Autoren der "Bethesda Proposals" als optional angesehen.

In der Humanpathologie werden alle diffus großzelligen B-Zell-Lymphome auf unterschiedliche Differenzierungsstadien von Keimzentrumzellen zurückgeführt. Molekularbiologisch werden drei, wahrscheinlich prognostisch aussagefähige, Gruppen unterschieden (8, 67). Eine Gruppe von Tumorzellen zeigt das Expressionsmuster von Keimzentrum-B-Zellen. Eine Zweite zeigt das Expressionsmuster von aktivierten, postgerminalen B-Zellen und eine Dritte ein Expressionsmuster, das Ähnlichkeiten mit beiden Gruppen aufweist und als Typ 3 oder intermediärer Typ beschrieben wird. Eine molekularbiologische Unterteilung der DLBCL existiert für die Maus nicht.

1.4.1.6 Plasmozytom (PCT)

Das Plasmozytom geht auf eine periphere reife Plasmazelle zurück. Die Zellen sind mittelgroß, haben einen exzentrischen Kern mit einem prominenten zentralen Kernkörperchen. Sie verfügen über die charakteristische Radspeichenformation des Chromatins. Das Zytoplasma ist in der HE-Färbung blassrosa bis basophil. Immunhistochemisch lässt sich Ig nur zytoplasmatisch nicht aber zellmembranständig nachweisen. Neoplastische Plasmazellen sind CD138- und Ly6D- (lymphocyte antigen 6 complex-) positiv und haben ein monoklonal rearrangiertes IgH- und Igk-Gen. Die Proliferationsrate ist sehr variabel. In der Milz infiltrieren die Tumorzellen vor allem die weiße Pulpa und im Lymphknoten herrscht eine diffuse Infiltration vor. Eigene Untersuchungen ergaben vor allem eine sinusoidale Verteilung im LK. Das Knochenmark ist in der Regel nicht infiltriert.

Neben den reifen Plasmazellen treten vereinzelt unreifere Formen auf. Makroskopisch liegt eine Splenomegalie und/oder Lymphadenopathie vor.

1.4.1.7 Murines erworbenes Immundefizienz Syndrom (MAIDS)

Unter dem Stichwort "Grenzfälle von B-Zell Neoplasien" wird in den "Bethesda Proposals" das murine AIDS diskutiert (143). Ursache für diese Erkrankung ist ein Retrovirus (ein sogenanntes "mink cell focus forming" (MCF) MLV), welches sowohl Mauszellen als auch Zellen anderer Spezies infiziert. Es ist replikationsunfähig und bedarf eines Helferretrovirus für die Vermehrung im Wirtsorganismus. Ursprünglich aus einer strahleninduzierten Retikulumzellneoplasie Typ B (RCN - Typ B) isoliert (100), wurde die Zelllinie RCN-BM5 (Bone Marrow 5) etabliert (64). Nach dieser Zelllinie erfolgte die Namensgebung der viralen Mixtur als LP-BM5 MuLV, wobei LP für "lymphoproliferativ" steht (144). Das frühe Stadium der Erkrankung ist durch prominente hyperplastische Keimzentren mit einer großen Anzahl von Plasmazellen, vereinzelt Zentroblasten und Immunoblasten charakterisiert. Die stark expandierende Lymphozyten (meist B-Zellen) sind anfangs polyklonal, entwickeln sich dann zu einer oligoklonalen Population, die im Spätstadium monoklonal wird. Zellwucherungen des Spätstadiums lassen sich auf immundefiziente Empfängermäuse übertragen und führen in diesen Tieren eindeutig zur Entwicklung von Lymphomen, die als DLBCL klassifiziert worden sind. Laut den "Bethesda Proposals" ist es nicht möglich, das Erkrankungsstadium im Spendertier und die Einflussfaktoren durch die Transplantation auf Morphologie und Phänotyp zuzuordnen, sodass diese Erkrankung nicht als Lymphom klassifiziert werden konnte. Um diese Erkrankung besser verstehen zu können, werden weitere Studien als notwendig angesehen.

1.4.2 Nicht-lymphatische hämatopoietische Neoplasien und verwandte Erkrankungen

Bei den nicht-lymphatischen hämatopoietischen Neoplasien unterscheiden die "Bethesda Proposals" (94) vier Hauptgruppen:

1. Nicht-lymphatische Leukämien;
2. Nicht-lymphatische hämatopoietische Sarkome;
3. Myeloische Dysplasien;
4. Myeloische nicht-reaktive Proliferationen.

In den folgenden Abschnitten werden nicht-lymphatische Leukämien, myeloische Dysplasien und nicht-reaktive myeloische Proliferationen näher beschrieben. Die hier nicht weiter vorgestellten hämatopoietischen Sarkome entstehen primär als lokalisierte, solide Tumorzellwucherung.

1.4.2.1 Nicht-lymphatische Leukämien

Nicht-lymphatische hämatopoietische Neoplasien sind durch den schnellen, tödlichen Krankheitsverlauf und die Verteilung der Tumorzellen im ganzen Körper gekennzeichnet. Für myeloische Leukämien haben die "Bethesda Proposals" fünf Leitkriterien festgelegt:

1. Milz und Knochenmark müssen diffus involviert sein.
2. Die Mäuse müssen eine Anämie, Neutropenie und/oder Thrombozytopenie aufweisen.
3. Nicht-lymphatische, hämatopoietische Zellen müssen in der Milz vermehrt vorhanden sein.
4. Neoplastische Zellen müssen entweder vermehrt in nicht-hämatopoietischen Organen vorkommen oder es liegt eine Leukozytose vor, bei der mehr als 20% der nicht-lymphatischen Zellen Blasten sind.
5. Eine myeloische Leukämie wird dann als akut bezeichnet, wenn mindestens 20% der nicht-lymphatischen Zellen unreife Formen/Blasten sind und nach dem Auftreten der Tumorzellen im Blut die erkrankte Maus innerhalb von vier Wochen verstirbt und/oder eine Transplantation des Tumors zum Tod des Empfängertieres (Maus) innerhalb von acht Wochen führt.

Myeloische Leukämien, die als Folge auf eine Behandlung entstehen, werden als "therapiebedingte, myeloische Leukämien" bezeichnet. Beim Vorliegen einer Dyserythropoiese, Dysgranulopoiese und/oder Dysmegakaryozytopenie wird von "myeloischen Leukämien mit Dysplasie mehrerer Zelllinien" gesprochen. Myeloische Leukämien werden in fünf Gruppen unterteilt, wobei nur die ersten beiden Formen für die vorliegende Studie von Bedeutung sind und deshalb kurz erläutert werden:

1. Myeloische Leukämie ohne morphologische Ausreifung;
2. Myeloische Leukämie mit morphologischer Ausreifung;
3. Myeloproliferativer-Erkrankung-ähnliche myeloische Leukämie;
4. Myelomonozytäre Leukämie;
5. Monozytenleukämie.

Myeloische Leukämie ohne morphologische Ausreifung

Bei einer myeloischen Leukämie ohne morphologische Ausreifung sind die neoplastischen Zellen nicht differenziert. In hämatopoietischen Geweben müssen mindestens 20% aller Zellen und mindestens 90% der granulopoietischen Zellen Blasten sein. Bei einer myeloischen Leukämie ohne Reifung liegt keine monozytäre Komponente vor.

Myeloische Leukämie mit morphologischer Ausreifung

Bei der myeloischen Leukämie mit morphologischer Ausreifung zeigen die Tumorzellen eine moderate Differenzierung. In hämatopoietischen Geweben sind mindestens 20% der Zellen, aber weniger als 90% der granulopoietischen Zellen Blasten. Es liegt keine monozytäre, jedoch eine neutrophile Komponente vor.

1.4.2.2 Myeloische Dysplasien

Myeloische Dysplasien der Maus ähneln dem humanen myelodysplastischen Syndrom. Der Verwendung eines anderen Terminus (myeloische Dysplasie statt myelodysplastisches Syndrom) soll verdeutlichen, dass es sich hierbei um verschiedene Erkrankung handeln könnte. Die Vergleichbarkeit beider Tumorformen wird durch die Tatsache limitiert, dass es kaum Beschreibungen von murinen myeloischen Dysplasien gibt.

Nach dem Ausschluss einer nicht-lymphatischen Leukämie, sollten die beiden folgenden Kriterien für eine myeloische Dysplasie in Betracht gezogen werden:

1. Im Blutbild liegen eine oder mehrere Zytopenien vor.
2. Dysplastische Erythropoiese, Granulopoiese und/oder Thrombozytopoiese treten mit oder ohne erhöhte Anzahl an nicht-lymphatischen Blasten auf.

Die morphologische Beschreibung von dysplastischen, hämatopoietischen Zellen bei der Maus hat aufgrund der sehr wenigen Publikationen zu dieser Erkrankung einen eher spekulativen Charakter. Solange es keine gesicherten Kriterien für dysplastische, murine Blutzellen gibt, ist es nur möglich, sich an morphologischen Kriterien, wie sie bei Mensch, Hund und Katze beschrieben worden sind, zu orientieren:

Dysplastische Erythropoiese: Durch eine unproportional schnellere Reifung des Zytoplasmas im Vergleich zum Kern, entstehen Megaloblasten. Fragmentierte Kerne, Kerne mit unregelmäßiger Kontur, Doppelkernigkeit, abnorme Mitosefiguren und Ringsideroblasten gelten in der Humanmedizin als Indizien für dysplastische Erythropoiese.

Dysplastische Megakaryozytopoiese: Bei der Reifung von Megakaryozyten findet keine vollständige Kernteilung statt. Separat lokalisierte Kerne sind ein Hinweis auf eine abnorme Entwicklung der Zelle. Sogenannte "Mikromegakaryozyten" verfügen über ausgereiftes Zytoplasma, jedoch über nur einen oder mehrere sehr kleine Zellkerne. Weitere dysplastische Formen sind große Zellen mit bisweilen bizarrer Hypersegmentierung sowie große Zellen mit nicht-lobulierten Kernen.

Dysplastische Granulopoiese neutrophiler Granulozyten: Ein morphologisches Merkmal für Dyspoiese ist ein reifer Kern, der von blass-basophilem Zytoplasma umgeben ist. Das Gleiche gilt für reife Kerne, die über eine offene Chromatinstruktur verfügen. Ein reifer, junger Granulozytenkern hat bei der Maus eine ringähnliche Struktur. Die Morphologie normal lobulierter, humaner Granulozyten scheint bei der Maus eine abnorme Entwicklung der Zelle darzustellen.

1.4.2.3 Myeloische nicht-reaktive Proliferationen

Myeloische nicht-reaktive Proliferationen der Maus ähneln den humanen myeloproliferativen Erkrankungen. Wiederum wurde hier bei der Mausklassifikation ein anderer Terminus verwendet, um zu verdeutlichen, dass noch nicht sicher ist, ob es sich wirklich um die gleiche Erkrankung handelt.

Reaktive und nicht-reaktive Proliferationen muriner hämatopoietischer Zellen sind morphologisch kaum voneinander abgrenzbar. Zu den Ursachen für reaktive

Myeloproliferationen zählen Blutentnahme, Mangelernährung, Infektionen, Intoxikationen, Autoimmunerkrankungen, nicht-lymphatische Tumore oder eine gestörte Regulation des lymphatischen Systems. Für die Diagnose "Myeloische nicht-reaktive Proliferation" sollten zuvor reaktive Prozesse ausgeschlossen werden. Außerdem erfüllt die myeloische nicht-reaktive Proliferation keines der Kriterien für nicht-lymphatische Leukämien und myeloische Dysplasien. Merkmale für die myeloische nichtreaktive Proliferation sind erhöhte Zellzahlen im Blut und/oder in hämatopoietischen Geweben wie der Milz und dem Knochenmark.

WHO-KLASSIFIKATION (MENSCH)	BETHESDA KLASSIFIKATION (MAUS)
Chronisch myeloproliferative Erkrankungen	
Chronisch myeloische Leukämie Chronisch neutrophile Leukämie Chronisch eosinophile Leukämie/ hypereosinophiles Syndrom Polycytaemia vera Chronisch ideopathische Myelofibrose Essentielle Thrombozytämie Chronisch myeloproliferative Erkrankung, unklassifizierbar	Myeloische Leukämie mit Ähnlichkeit zur myeloproliferativen Erkrankung
Myelodysplastische/Myeloproliferative Erkrankungen	Nicht-reaktive myeloische Proliferationen
Chronisch myelomonozytäre Leukämie Atypische chronisch myeloische Leukämie Juvenile myelomonozytäre Leukämie Myelodysplastische/myeloproliferative Erkrankung, unklassifizierbar	Myeloproliferative Erkrankung genetische Myeloproliferation
Myelodysplastische Syndrome	Myeloische Dysplasie
Refraktäre Anämie Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie Refraktäre Anämie mit Blastenkrise Myelodysplastisches Syndrom assoziiert mit isolierter del(5q) Chromosomenaberration Myelodysplastisches Syndrom, unklassifizierbar	Myelodysplastisches Syndrom Zytopenie mit erhöhtem Blastengehalt
Akute myeloische Leukämien (AML)	Akute/chronische myeloische Leukämien
AML mit definierten zytogenetischen Aberrationen AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO) AML mit inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) Akute Promyelozytenleukämie (AML mit t(15;17)(q22;q22), (PML/RARα) und Varianten) AML mit 11q23 (MLL) Aberrationen AML mit multilineärer Dysplasie: mit vorausgehendem myelodysplastischen Syndrom ohne vorausgehendes myelodysplastisches Syndrom Therapie-induzierte AML und myelodysplastische Syndrome durch alkylierende Agenzien durch Topoisomerase II Inhibitoren AML ohne weitere Einordnung AML mit minimaler myeloischer Differenzierung AML ohne morphologische Ausreifung AML mit morphologischer Ausreifung Akute myelomonozytäre Leukämie Akute Monoblastenleukämie und Monozytenleukämie	Zusatzbezeichnung: mit Viellinien-Dysplasie optionale Zusatzbezeichnung: therapiebedingt ML ohne morphologische Ausreifung ML mit morphologischer Ausreifung Myelomonozytäre Leukämie Monozytenleukämie

WHO-KLASSIFIKATION (MENSCH)	BETHESDA KLASSIFIKATION (MAUS)
Akute Erythroleukämie Akute Megakaryoblastenleukämie Akute panmyeloische Myelofibrose Myeloisches Sarkom Akute Leukämie mit ungeklärter Linienzugehörigkeit	Erythroleukämie Megakaryozytenleukämie Biphenotypische Leukämie
B-Zell Neoplasien	B-Zell Neoplasien
Präkursor-B-Zell Neoplasien:	Präkursor-B-Zell Neoplasien:
Vorläufer-B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom	Vorläufer-B-Zell lymphoblastische Leukämie/Lymphom
Reife B-Zell Neoplasien:	Reife B-Zell Neoplasien:
B-zellige chronisch lymphatische Leukämie/kleinzelliges lymphozytäres Lymphom B-zellige Prolymphozytenleukämie Lymphoplasmozytäres Lymphom Splenisches Marginalzonen-B-Zell-Lymphom Haarzell-Leukämie Plasmazell-Myelom Solitäres Plasmazytom im Knochen Extraossäres Plasmazytom Extranodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) Nodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom Follikuläres Lymphom Mantelzell-Lymphom Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom Morphologische Varianten: zentroblastisch, immunoblastisch, reich an T-Zellen/reich an Histiocyten Mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zell-Lymphom Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom Primäres intrakavitäres B-Zell-Lymphom mit Erguss Burkitt-Lymphom/Leukämie	Kleinzelliges B-Zell-Lymphom Splenisches Marginalzonen-Lymphom Plasmazytom Anaplastisches Plasmazytom Extraossäres Plasmazytom Follikuläres B-Zell-Lymphom Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom Morphologische Varianten: zentroblastisch, immunoblastisch, histiozytenassoziiert Primäres mediastinales (thymisches) diffus großzelliges B-Zell-Lymphom Klassisches Burkitt-Lymphom Burkitt-ähnliches Lymphom Natürliches Killerzell-Lymphom (B-Zell-Typ)
B-Zell Proliferation mit unbekanntem malignem Potential:	
Lymphomatoide Granulomatose Posttransplantäre lymphoproliferative polymorphe Störung	

WHO-KLASSIFIKATION (MENSCH)	BETHESDA KLASSIFIKATION (MAUS)
<p>T-Zell und NK-Zell Neoplasien</p> <p>Präkursor-T-Zell Neoplasien: Vorläufer-T-lymphoblastische Leukämie/Lymphom Blastisches NK-Zell-Lymphom</p> <p>Reife T-Zell und NK-Zell Neoplasien: T-Zell prolymphozytäre Leukämie Aggressive NK Zell Leukämie Adulte T-Zell Leukämie/ Adultes T-Zell-Lymphom Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasale Form Enteropathieform des T-Zell-Lymphoms Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom Subkutanes Panniculitis-ähnliches T-Zell-Lymphom Mykosis fungoides Sezary Syndrom Primäres kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom Peripheres T-Zell-Lymphom, unspezifiziert Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom Anaplastisches großzelliges Lymphom</p> <p>T-Zell Proliferation mit unbestimmtem malignen Potential: Lymphomatoide Papulosis</p>	<p>T-Zell Neoplasien</p> <p>Präkursor-T-Zell Neoplasien: Vorläufer-T-Zell lymphoblastische Leukämie/Lymphom</p> <p>Reife T-Zell Neoplasien: Kleinzelliges T-Zell-Lymphom Natürliches Killerzell-Lymphom (T-Zell-Typ)</p> <p>T-Zell Neoplasien unbestimmten Charakters</p> <p>Großzelliges anaplastisches Lymphom</p>
<p>Hodgkin Lymphom</p> <p>Noduläres lymphozytäres prädominantes Hodgkin-Lymphom Klassisches Hodgkin-Lymphom Nodulär sklerosierendes klassisches Hodgkin-Lymphom Lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom Klassisches Hodgkin-Lymphom mit gemischter Zellularität Lymphozytendepletiertes klassisches Hodgkin-Lymphom</p>	
<p>Histiozytäre und dendritische Zellneoplasien</p> <p>Makrophagozytäre/histiozytäre Neoplasien: Histiozytäres Sarkom</p> <p>Dendritische Zellneoplasien: Langerhanszell-Histiozytose Langerhanszell-Sarkom Sarkom/Tumor der interdigitierenden dendritischen Zellen Sarkom/Tumor der folliculären dendritischen Zellen Sarkom der dendritischen Zellen, nicht anderweitig spezifiziert</p>	<p>Nicht-lymphatische hämatopoietische Sarkome</p> <p>Histiozytäres Sarkom</p> <p>Granulozytäres Sarkom</p>

WHO-KLASSIFIKATION (MENSCH)	BETHESDA KLASSIFIKATION (MAUS)
Mastozytose	
Kutane Mastozytose	
Indolente systemische Mastozytose	
Systemische Mastozytose mit assoziierter klonaler, hämatologischer, nicht-Mastzelllinien-Erkrankung	
Aggressive systemische Mastozytose	
Mastzell-Leukämie	
Extrakutanes Mastozytom	Mastzellsarkom

Tabelle 1: Vergleich der WHO-Klassifikation mit den "Bethesda Proposals"

Wenn es sich um identische Erkrankungen handelte, haben die Autoren der "Bethesda Proposals" für Tumore bei der Maus die gleiche Nomenklatur wie in der Humanhämatopathologie verwendet. Freie Felder symbolisieren, dass die Erkrankung bis dato nur für jeweils eine Spezies beschrieben wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

2.1.1 Tierversuchsgenehmigung

Die Tierversuche waren nach §8 des Tierschutzgesetzes genehmigungspflichtig und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Experimente wurden in der Abteilung für Vergleichende Medizin, GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, in Neuherberg durchgeführt.

2.1.2 Behandlung der Versuchstiere

Für Pathogenitätsstudien wurden Virusmutanten neugeborenen Mäusen intraperitoneal inokuliert. Insgesamt wurden 333 weibliche Mäuse, verteilt auf dreizehn Versuchsgruppen, eingesetzt. Mindestens zehn Mäuse bildeten eine Versuchsgruppe. Es handelte sich um NMRI-Inzuchtmäuse aus dem Naval Medical Research Institut, die von der Swiss-Linie des National Institute of Health (NIH) abstammten und bereits seit mehr als zehn Generationen in der GSF gezüchtet worden waren. NMRI- und NIH-Swiss-Mäuse sind frei von endogenen, ecotropen Proviren (101, 102, 184). Beim Absetzen der behandelten Jungtiere vom Muttertier erfolgte eine Blutentnahme (250 µl). Das Blut wurde in ein vorbereitetes Reaktionsröhrchen gegeben (0,5 ml Dulbeccos Medium, versetzt mit 10 % FKS, 2 % Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, München) und 4 µg/ml Polybrene (Sigma-Aldrich, München) und auf infektiöse Retroviren untersucht (187). Zur eindeutigen Identifizierung der Mäuse wurden sie an den Ohrrändern mit einem Lochcode markiert. Pro Käfig (Makrolonwannen der Normgröße 2 mit Gitterdeckel) wurden ein bis fünf Tiere gehalten. Den Mäusen standen Altromin-Pellets 1320 und frisches Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. Der Wechsel der Einstreu fand einmal wöchentlich statt. Eine allgemeine Untersuchung der Mäuse erfolgte mindestens dreimal pro Woche. Bei der Adspektion und Palpation wurde neben dem Allgemeinzustand insbesondere auf die Atemtätigkeit sowie auf Umfangsvermehrungen unter der Haut und tastbar vergrößerte Organe in der Bauchhöhle geachtet. Die Versuchsdauer wurde auf maximal zwei Jahre festgelegt.

Mäuse mit vergrößerten Lymphknoten (Durchmesser >10 mm) und/oder vergrößerter Milz (Länge >30 mm) oder in allgemein schlechtem Gesundheitszustand wurden aus dem Versuch genommen, getötet und einer pathologischen Untersuchung unterzogen. Das Töten der Mäuse erfolgte in einer kleinen mit CO₂ gefluteten Plexiglasbox. Die Hygieneüberwachung im Versuchsterraum erfolgte durch eine regelmäßige Untersuchung von männlichen CD-1 Sentinel-Tieren nach den Richtlinien der GV-Solas (Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science) (153).

2.2 Pathologie

2.2.1 Sektion und makroskopische Untersuchung

Bei deutlich gestörtem Allgemeinbefinden oder Auftreten von spezifischen Krankheitssymptomen wurden die Mäuse getötet. Nach Erfassung des Körpergewichts wurde der Tierkörper auf einer Korkplatte in Rückenlage mittels Stecknadeln an den Pfoten aufgespannt. Vom Beckenbereich bis zum Unterkiefer erfolgte ein medianer Hautschnitt, der dann in Richtung der Pfoten verlängert wurde. Die Haut wurde weitgehend vom Tierkörper gelöst und die Haut der Halsregion mit Stecknadeln aufgespannt. Anschließend erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle durch einen medianen Schnitt. Unter Schonung der Bauchorgane wurden die Bauchorta und die Hohlvene aufgesucht, angeritzt und das austretende Blut aufgesaugt. Die Muskelverbindungen zwischen den Vorderextremitäten und dem Rumpf wurden gelöst. Nach dem brustkorbnahen Abtrennen des Zwerchfells, wurden die Rippen wirbelsäulennah in Richtung des Schlüsselbeins durchtrennt. Brustbein und ventraler Teil der Rippen wurde abgeklappt, so dass eine Besichtigung der Brusthöhle erfolgen konnte. Der Durchmesser vergrößerter Lymphknoten, die Größe der Thymuslappen sowie Maße von Milz und Leber wurden notiert. Nach der Entnahme vergrößerter Organe für die histologischen und molekulargenetischen Untersuchungen wurden diese zugeschnitten und entweder in eine Einbettkapsel gelegt und in Formalin fixiert oder in einem separaten Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte entweder in einem Stickstofftank in der Gasphase oder in einer -80 °C Tiefkühltruhe.

2.2.2 Histologie

Die Organproben wurden mindestens 48 Stunden bei Raumtemperatur in 4%igem, gepuffertem Formalin (pH 7,4) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Microm, Walldorf) wurden 2-4 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Standardfärbung Hämalaun-Eosin wurde bei Bedarf durch zusätzliche Färbungen wie der Periodsäure-Schiff-Reagenz-Reaktion (PAS), der Giemsa-Färbung oder der Chlorazetatesterase-Färbung (CAE) ergänzt. Alle histochemischen Färbungen erfolgten nach Romeis (182).

2.2.3 Immunhistochemie

In Tabelle 2 sind alle verwendeten Antikörper aufgeführt. Immunhistochemische Färbungen erfolgten manuell mit einem Avidin-Biotin-Complex (ABC) Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) oder maschinell mit einem NexEs Färbeautomaten (Ventana Medical Systems, Tucson, AR, USA). Zunächst wurden 1 bis 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach der Entparaffinierung mit Xylol wurden die Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und gründlich unter fließendem Leitungswasser gespült. Bei Färbungen mit dem ABC-Kit erfolgte vor dem Rehydrierungsschritt mit 70%igem Ethanol eine zwanzigminütige Blockierung der endogenen Peroxidase mittels Methanol und H₂O₂ (180 ml Methanol gemischt mit 3 ml einer 30%igen Wasserstoffperoxidlösung) bei Raumtemperatur. Zur Antigendemaskierung erfolgte eine Hitzevorbehandlung. Hierzu wurden die Schnitte in einen mit 10 mM Zitratpuffer (pH 6, versetzt mit 0,1 % TWEEN 20) gefüllten Mikrowellendampfdruckkochtopf verbracht und 30 Minuten bei 1000 Watt erhitzt. Zur Herstellung von 3 l eines TBS-Puffers wurden 300 ml einer NaCl-Lösung (250 g NaCl gelöst in 3 l destilliertem Wasser) mit 300 ml Tris-Puffer (181,7 g Tris gelöst in 3 l destilliertem Wasser (pH 7,6)) und 2,4 l destilliertes Wasser vermischt. Im Anschluss an die Antigendemaskierung wurden die Präparate in mit TBS-gepuffertem 3%igem Ziegenserum resp. Kaninchenserum für 20 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers zu blockieren. Danach wurden die Objektträger mit jeweils 100 µl des verdünnten Primärantikörpers (Gebrauchsverdünnungen siehe Tabelle 2) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Verdünnung wurde Antibody Diluent (Ventana Medical Systems, Tucson, AR, USA) verwendet (PBS, pH 7,3). Diese Lösung enthielt 0,3 %

Protein in 0,1 M Phosphat gepufferter Salzlösung und 0,05 % ProClin 300 als Konservierungsmittel.

Nach einem weiteren Spülvorgang wurden am folgenden Tag bei der manuellen Färbung 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers (Gebrauchsverdünnungen siehe Tabelle 2) aufgetragen und für 32 min inkubiert. Nach wiederholtem Spülen erfolgte eine dreißigminütige Inkubation mit dem ABC-Reagenz. Das ABC-Reagenz bestand aus 100 µl eines sogenannten "Reagenz A" (Avidin DH) und 100 µl eines sogenannten "Reagenz B" (biotinylierte Meerrettichperoxidase-H) gelöst in 10 ml PBS-Puffer (10 mM 0,9%iges Natriumphosphat (pH 7,5)). Diese Mischung musste vor der Anwendung auf dem Gewebeschnitt 30 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert werden.

Nach der Inkubation mit dem Gewebe erfolgte ein weiterer Spülvorgang. Für die Farbreaktion wurde ein SIGMA FAST DAB Peroxidase Substrate Tablet Set (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Für 1 ml gebrauchsfertige Lösung wurden eine Diaminbenzidin-Tablette (Chromogen) und eine Urea-Hydrogenperoxid-Tablette (Substrate) in 1 ml destillierten Wasser gelöst. Mit jeweils 0,2 ml dieser Lösung wurden die Objektträger überschichtet und bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert (ca. 6 min). Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Objektträger mit PBS-Puffer (siehe oben) gespült. Nach gründlicher Spülung unter fließendem Leitungswasser erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun. Nach der Dehydrierung des Gewebes über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Objektträger 10 min in Xylol belassen und anschließend mit Eukitt eingedeckt.

Bei Verwendung des Immunfärbeautomaten erfolgten nach der Inkubation des Primärantikörpers alle weiteren Schritte bei 37 °C in der Maschine. Nach mehreren Spülschritten wurde zunächst die endogene Peroxidase durch ein vierminütiges Einwirken eines sogenannten "i-View-Inhibitors" (3%ige Hydrogenperoxid-Lösung) blockiert. Einem weiteren Spülvorgang folgte die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers (Ziege anti Maus-Ig und Ziege anti Kaninchen-IgG (jeweils 200 µg/ml) in Phosphatpuffer und Konservierungsmittel) für 8 min. Nach wiederholtem Spülen wurden die Schnitte mit Avidin-HRPO oder SA-HRP, einem Avidin- oder Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex, (300 µg/ml in einem Proteinstabilisator und Konservierungsmittel) wiederum für 8 min inkubiert und anschließend gespült. Als Chromogen wurde Diaminbenzidin (2 g/l in einer

Stabilisierungs- und Konservierungslösung) verwendet. Nach achtminütigem Einwirken des Chromogens und des Substrats (0,04%iges bis 0,08%iges H₂O₂ in einer Stabilisierungslösung) wurden bei der automatisierten Färbung die Schnitte vor der Gegenfärbung mit Hämalaun 4 min mit einer gepufferten Kupfersulfatlösung (5 g/l versetzt mit einem Konservierungsmittel) inkubiert. Wie bei der manuellen Färbung wurden die Schnitte nach der Färbeprozedur in einer Seifenlauge und anschließend ausgiebig unter fließendem Leitungswasser gespült. Es folgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol. Als Eindeckmedium wurde Eukitt verwendet.

Antikörper	Immunogen (Klon)	Verdünnung	Kreuz-reaktivität	Hersteller und Bestellnr.	Lokalisation	Kontroll-gewebe
monoklonales Ratten-IgG	murines B220/CD45R (RA3-6B2)	1:50	unbekannt	BD PharMingen, Heidelberg, Germany; 550286	Zellmembran	murine Milz
polyklonales Kaninchen-IgG	murines BCL-2	1:1000	Ratte (schwach)	BD PharMingen, Heidelberg, Germany; 554279	ER, nukleäre Membran, mitochondriale Membran	murine Milz, muriner LK
polyklonales Kaninchen-IgG	humanes CD3	1:200	Maus, Koala	DakoCytomation, Hamburg, Germany; A0452	Zellmembran	humane Tonsille
monoklonales Maus-IgG	humanes CD79α (HM57)	1:50	Maus	DakoCytomation, Hamburg, Germany; M7051	Zellmembran	murine Milz, muriner Lymphknoten
monoklonales Ratten-IgG	murines CD138 (281-2)	1:50	unbekannt	BD PharMingen, Heidelberg, Germany; 553712	Zellmembran	muriner Lymphknoten mit Plasmozytose
monoklonales Ratten-IgG	murines CD138 (281-2)	1:500	unbekannt	RDI Research Diagnostics, New Jersey, USA; RDI-mcD138-2812	Zellmembran	muriner Lymphknoten mit Plasmozytose
polyklonales Kaninchen-IgG	humane kappa Kette	1:2000	Maus	DakoCytomation, Hamburg, Germany; A0191	Zytoplasma	humaner Lymphknoten
monoklonales Ratten-IgG	murines Ki-67 (Tec-3)	1:200	unbekannt	DakoCytomation, Hamburg, Germany; M7249	Nukleus	murine Milz
polyklonales Kaninchen-IgG	humane lambda Kette	1:2000	Maus	DakoCytomation, Hamburg, Germany; A0193	Zytoplasma	humaner Lymphknoten
polyklonales Kaninchen-IgG	humane MPO	gebrauchsfertige Lösung	Maus, Ratte	NeoMarkers (via Dunn Labortechnik, Asbach, Germany; RB-373-R7)	Granula	murine Milz mit Granulopoiese
monoklonales Maus-IgG	humanes Wildtyp p53 (DO-7)	1:100	unbekannt	DakoCytomation, Hamburg, Germany; M7001	Nukleus	humane Tonsille
polyklonales Kaninchen-IgG	bovines Tdt	1:10	Maus, Ratte, Katze, Huhn	DakoCytomation, Hamburg, Germany; A3524	Nukleus	muriner Thymus
Kaninchen-IgG (biotinyliert)	Ratten-IgG	1:300	keine	DakoCytomation, Hamburg, Germany; E0468		

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Analysen

Alle immunhistochemischen Färbungen erforderten eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung mit 10 mM Zitratpuffer (pH 6, versetzt mit 0,1 % TWEEN 20).

2.2.4 Klassifizierung hämatopoietischer Tumore

Die Klassifizierung der retrovirusinduzierten Tumore erfolgte nach den "Bethesda Proposals" (94, 138). Ein Lymphknoten wurde als vergrößert angesehen, wenn er größer als 5 mm war. Ein Lymphknoten >10 mm und Milzen mit Splenomegalie (Länge von über 30 mm) wurden als lymphomverdächtig angesehen (187).

2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.1 Southern Blot

Die Southern Blot Analysen wurden von unseren dänischen Kollegen durchgeführt. Einen kleinen Teil der Untersuchungen konnte ich dort unter ihrer Anleitung während meiner einmonatigen Hospitanz selbst vornehmen.

2.3.1.1 DNA-Extraktion aus gefrorenem Gewebe

Von dem gefrorenen Tumormaterial wurden zunächst ca. 8 mm³ große Proben nach dem DNeasy-Tissue-Kit-Protokoll (Qiagen, Albertslund, DK) lysiert und die DNA nach Angaben des Herstellers extrahiert. Für den Verdau von RNA wurden den Proben jeweils 4 µl RNase-A (Roche A/S, Hvidovre-Copenhagen, DK) mit einer Konzentration von 10 mg/ml zugesetzt. Die Konzentration der DNA in dem Lösungsmedium wurde mit einem Spektroskop (Spectra Chrom, Shimadzu, Duisburg) bei 260 λ bestimmt.

2.3.1.2 DNA-Aufbereitung, -Transfer, -Hybridisierung, -Sonden

Jeweils 30 µg genomischer DNA wurden mit dem Restriktionsenzym *Hind* III (Invitrogen, Leek, NL), für die Analyse des Igk Locus bzw. *Eco*R I (BioLabs, Beverly, MA, USA) für die Analyse des IgH-Lokus den Empfehlungen des Herstellers folgend, gespalten. Für die Gelelektrophorese wurde ein 0,8%iges Agarosegel (aus 2,4 g Agarose und 300 ml TAE (engl. Tris acetate EDTA) Puffer) hergestellt. Um die DNA-Proben auf ein gleiches Endvolumen zu bringen, wurden sie vor der Resuspension in 45 µl TE (Tris EDTA) Puffer präzipitiert. Dazu wurde die DNA bezogen auf das Volumen mit einer 0,1fachen Menge an Natriumacetat und einer 2,5fachen Menge

an 96%igem Ethanol, bzw. 0,7fache Menge an 96%igem Isopropanol über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach 30minütiger Zentrifugierung bei maximaler Leistung wurden der Überstand abpipettiert und dem Pellet 1 ml 70%igem Ethanol zugesetzt. Nach wiederholter 30minütiger Zentrifugierung wurden der Überstand verworfen und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Vor dem Laden eines Agarosegels wurden 18 µg DNA 10 µl Ladepuffer zugesetzt (Endvolumina entsprachen 50 µl je Geltasche). Als DNA Molekulargewichtsmarker kamen Marker I und II (Boehringer Ingelheim, Ingelheim) zum Einsatz. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 Volt und 400 mA über Nacht. Nach der Gel-Dokumentation am Folgetag wurde das Gel zugeschnitten und an einer Ecke markiert. Die Transfermembran (Zeta-Probe, BioRad, Kopenhagen, DK) wurde auf die gleiche Größe zugeschnitten. Als Ansaugpapier wurde Chromatographiepapier (Whatman-Paper, Whatman, Middlesex, GB) verwendet. Der alkalische Kapillar-DNA-Transfer erfolgte über Nacht mittels Natronlauge (0,4 M) und einem 7 cm hohen, mit einer Platte beschwertem Stapel Filterpapier. Nach dem Transfer wurde die Transfermembran für einige Sekunden in 0,2fach konzentrierte SCC (engl. sodium chloride sodium citrate) Lösung gegeben und anschließend luftgetrocknet. Die Membran wurde zweimal für mindestens eine Stunde bei 65 °C in einem Thermo-HybAid-Glas (Thermo HybAid, Ashford, GB) prähybridisiert (je 30 ml 7 % Na₂HPO₄, 0,25 M NaOH). Mithilfe der Klenowpolymerase-I wurde das Phosphat aus den Proben gegen radioaktiv markiertes Phosphat mittels ATP-³²P ausgetauscht. Die radioaktiv markierte Probe wurde mit 20 ml des Hybridisierungspuffers vermischt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C in einem Thermo-HybAid-Glas. Um unspezifisch gebundenes radioaktives Material von der Membran zu entfernen, wurde die Membran am folgenden Tag mindestens zweimal bei 65 °C gespült (jeweils 500 ml 0,1 % SSC, 0,1 % SDS (engl. sodium dodecyl sulfate) für eine Stunde). Die Dokumentation der Hybridisierung erfolgte mit dem Phosphor Imaging-System der Firma BioRad oder durch Exposition der Radioaktivität auf einen Röntgenfilm (min. 5 Tage bei -80 °C). Um die Membran ein weiteres Mal für eine Hybridisierung mit einer anderen Probe verwenden zu können, wurde sie in einer Lösung aus 0,1fach konzentriertem SSC und 0,35fach konzentriertem SDS bei 90 °C für 30 min gewaschen.

Die Igk-Sonde wurde mittels PCR aus genomischer DNA gewonnen. Folgende Primer lieferten eine 460 bp große Sonde: 5'-ggctgactgcaggtagcgtggtcttct-3' und 5'-cgttcctacagagtctctcatttgacat-3' (115). Die Sonden für das virale *env* wurden durch

Verdau eines Akv-Plasmids mittels *Sma*I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) (6) und die Sonde IgH J11 durch Verdau der Joining-Region des murinen IgH-Gens mittels *Eco*R I und *Bam*H I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) hergestellt (125). Dieser Verdau führte zu einer Sondengröße von 330 bp bzw. 1900 bp. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Elektrophoresegel ausgeschnitten und mithilfe des GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die Southern Blot Analyse mit der *eco env* Sonde stellt eine indirekte Möglichkeit dar, monoklonale Zellpopulationen nachzuweisen. Die Integrationsorte der Proviren im Wirtsgenom sind sehr variabel. Bei einer retrovirusinfizierten Zellpopulation führt die Hybridisierung mit der *eco env* Probe zu keiner sichtbaren Bande, es sei denn, die Zellpopulation ist aus einer Ursprungszelle hervorgegangen, die durch Zellteilung das neu integrierte Retrovirus an exakt der gleichen Lokalisation im Genom an alle ihre Tochterzellen weitergegeben hat. Bei einer oligoklonalen Population sind mehrere Banden sichtbar.

2.3.2 PCR mit anschließender Fragmentanalyse

Die Etablierung der DNA-Extraktion für Mausgewebe aus Paraffinschnitten und der PCR-Amplifikation von IgH-Fragmenten erfolgte während meines Praktikums im Institut für Pathologie der Technischen Universität München.

2.3.2.1 DNA-Extraktion aus dem Paraffinschnitt

Zur DNA-Extraktion wurden zwei 10 µm dicke Schnitte vom Paraffingewebeblock abgetragen und in ein Zentrifugenröhrchen (1,5 ml) gegeben. Für die Entparaffinierung wurde 1 ml Xylol hinzugegeben und kurz gemischt. Nach Zugabe von 250 µl 70%igem Ethanol wurden die Gewebestücke 5 min bei Raumtemperatur und bei 13000 revolutions per minute (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gewebe vollständig in einem Konzentrator vom Lösungsmittel befreit. Mit 5 µl Proteinase K (Roche, Grenzach-Wyhlen) und 100 µl Extraktionspuffer (Lösung aus 50 ml 1 M Tris-HCL (pH 8,3) und 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8) und destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt, zweimal filtriert und autoklaviert) wurden über Nacht in einem Thermoschüttler bei 55 °C und 550 rpm die Proteinbestandteile verdaut. Am folgenden Tag wurde das Enzym in einem Heizbad

10 min bei 100 °C inaktiviert. Der DNA-Gehalt wurde mit dem Nanodrop ND-100 Spektrophotometer (G Kisker, Steinfurt) bei 260 λ bestimmt.

2.3.2.2 DNA-Amplifizierung, Gene-Scan

Fragmente des IgH-Lokus wurden mit folgenden Primern von MWG (Ebersberg) nach dem Protokoll von Kawamoto (92) amplifiziert:

5'-agggatcctgtgaaggatctactactgtg-3' und 5'-aaagacctgcagaggccattctacc-3'

Der Rückwärtsprimer wurde am 5' Ende mit 6-FAM markiert. Das PCR-Produkt wurde mit "high performance liquid chromatography" (HPLC) Wasser verdünnt (1:100). Der Größenstandard Gene Scan LIZ Size Standard (Applied Biosystems Deutschland, Darmstadt) wurde mit HI-DI-Formamid (Applied Biosystems) in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt und gründlich gemischt. Jeweils 12 μ l dieser Mischung wurden pro Probe in 96 Well Platten (Applied Biosystems) vorgelegt. Anschließend wurde jeweils 1 μ l der verdünnten PCR-Produkte hinzugefügt. Die Platte wurde mit einem speziellen Septum aus Gummi (Applied Biosystems) verschlossen. In einem GeneAmp PCR System 9700 Thermozykler ohne Deckelheizung (Applied Biosystems) wurde die DNA bei 95 °C für 2 min denaturiert. Eine Renaturierung der DNA wurde durch sofortiges Kühlen auf Eis verhindert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die 96 Well Platte in eine spezielle Kassette (Applied Biosystems) für die Analyse eingelegt. Die Fragmentanalyse erfolgte mit dem Genetic Analyzer ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Für die Auswertung der Elektropherogramme wurde das Programm GeneMapper, Version 3.5 (Applied Biosystems) verwendet. Signale mit einer Fluoreszenzintensität unter 150 und über 10.000 "relative fluorescence units" (rfu) wurden als zu schwach bzw. als überladen interpretiert und nicht ausgewertet. Eine Gaußsche Verteilungskurve wurde als polyklonale Zellpopulation interpretiert. Vor einem polyklonalen Hintergrund musste ein Gipfel mindestens zwei- bis dreimal so intensiv fluoreszieren, damit die Zellpopulation als kleine monoklonale Population bezeichnet wurde. Große monoklonale Populationen stellten sich als ein einzelner, deutlicher Gipfel dar oder waren in ihrer Fluoreszenz mindestens dreimal so intensiv wie die polyklonale Hintergrundpopulation.

2.4 Plasmide und Virusmutanten

Drei Klone von Akv wurden aus Zellen einer AKR-Maus isoliert (118). Ein infektiöser Klon war Akv λ -623. Die Herstellung der Plasmide und der Virusmutanten für die

vorliegende Arbeit wurde im Rahmen früherer Projekte von unseren dänischen Kollegen durchgeführt und gehen auf Akv λ -623 zurück.

2.4.1 Plasmidkonstruktion

Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht über die Enhancer-Sequenz von Akv und die modifizierten Basen der jeweiligen Virusmutanten. Insgesamt wurden elf Virusmutanten generiert. Akv λ -623 diente in dieser Studie als Referenzvirus und Positivkontrolle. Bevor die Virusmutanten generiert werden konnten, mussten zunächst Plasmide mit den gewünschten Modifikationen hergestellt werden. Die Plasmide pAkv6-cat und pAkv1-99-cat sind bereits ausführlich beschrieben worden (116). Die Vektoren enthielten das LTR der proviralen DNA vom 5' Ende, wobei dem Vektor pAkv1-99 eine 99 bp lange Sequenz des Enhancers fehlte, sodass die 99 bp nur einmal vorlagen. Beide Plasmide enthielten einen kurzen Linker und Fragmente von vier verschiedenen Vektoren, die unter anderem das Reportergen Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) lieferten. Die Basensubstitutionen in den verschiedenen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen innerhalb der 99 bp des Enhancers von pAkv1-99-cat wird an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Sørensen et al., Manuskript in Vorbereitung). Für eine Modifikation wurden zwei Oligonukleotidpaare synthetisiert, die als Primer fungierten. Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente des pAkv1-99cat überlappten sich teilweise. An der sich überlappenden Sequenz enthielt bei dem einen Primerpaar der Rückwärtsprimer, bei dem anderen der Vorwärtsprimer die gewünschte Modifikation. In einem weiteren PCR-Ansatz wurden diese veränderten DNA-Matrizen mit den beiden Akv-komplementären Primern amplifiziert. Durch Restriktionsendonukleasen und Ligasen wurden die veränderten Enhancerbereiche wieder in das pAkv1-99-cat Plasmid eingefügt. Daraus resultierten die Plasmide: p1-99mEts-cat, p1-99mRUNX1-cat, p1-99mE_{GRE}-cat, p1-99mGR-cat und p1-99mE_{AVS}-cat (genaue Angaben zur Sequenz siehe Abb. 8 d-h). Um zwei Bereiche zu modifizieren, wurde zunächst jeder Bereich wie beschrieben verändert und anschließend in einer weiteren PCR die gewünschte Sequenz erzielt, indem die beiden Akv-komplementären Primer genutzt worden sind, die den größten Genombereich umspannten. Nach anschließendem Einfügen der Sequenzen in das pAkv6cat wurden folgende Vektoren erhalten: p1-99mRUNX1+E_{GRE}-cat, p1-99mRUNX1+mGR-cat, p1-99mE_{AVS}+E_{GRE}-cat, p1-99mE_{AVS}+mGR-cat (Angaben zur Basenmodifikation siehe Abb. 8 i-k). Die Synthese

des Plasmids p1-99mNF1mut2-cat erfolgte nach Lovmand (114). Die veränderten Basenpaare sind Abbildung 8 m zu entnehmen.

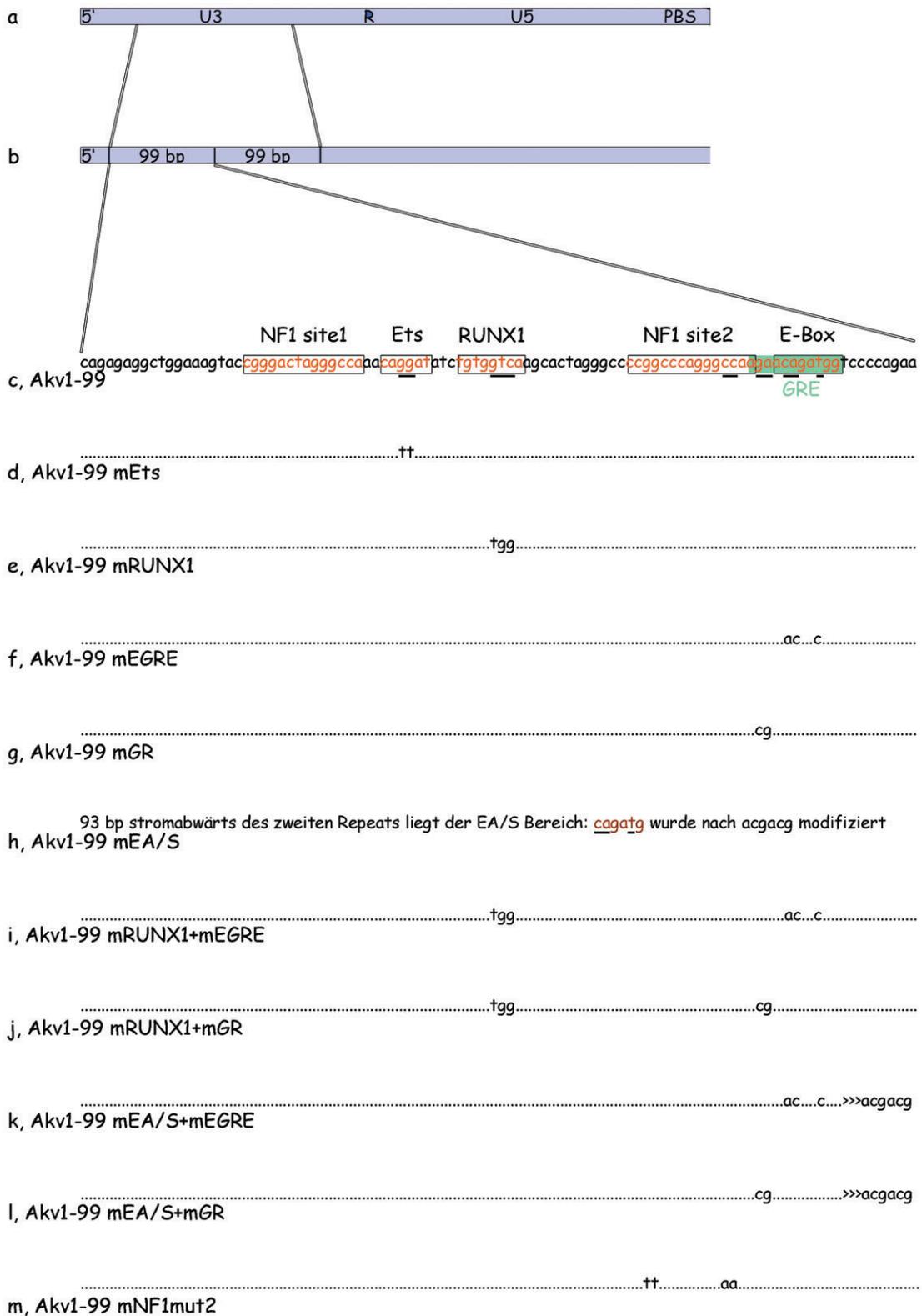


Abbildung 8: Enhancer-Sequenz von Akv und Akv-Mutanten

Akv Enhancer-Sequenz nach Herr (73); **a**, Skizze des LTR am 5' Ende des proviralen Akv-Genoms; **b**, Ausschnittsvergrößerung des 99 bp Repeats; **c**, Sequenz eines 99 bp Bereiches der Mutante Akv1-

99, der die Wiederholungssequenz der 99 bp fehlt; Bindungsbereiche (orange) für Transkriptionsfaktoren; die Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle für GR (grüne Box) überlagert die gesamte E-Box und teilweise den NF1-Bereich-2; ursprüngliche, bei den Mutanten modifizierte Basen, sind unterstrichen; **d**, Mutante mEts; **e**, Mutante mRUNX1; **f**, Mutante mE_{GRE}; **g**, Mutante mGR; **h**, Der E_{AIS}-Bindungsbereich liegt stromabwärts hinter dem 99 bp Repeat im U3-Bereich; **i**, Doppelmutante mRUNX1+mE_{GRE}; **j**, Doppelmutante mRUNX1+mGR; **k**, Doppelmutante mE_{AIS}+mE_{GRE}; Sprung (>) zu weiter stromabwärts liegenden Bereichen im U3 **l**, Doppelmutante mE_{AIS}+mGR; **m**, Mutante mNF1mut2.

2.4.2 Viruskonstruktion

Der Vektor pAkv6-cat (116) enthält das komplette Akv-Genom. Nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Integration der entsprechenden Enhancerstrukturen der modifizierten Plasmide erfolgten eine Spaltung und eine Ligation an ein Konkatamer (66). Die Transfektion von NIH-3T3 Zellen mit den Vektoren erfolgte nach der Kalzium-Phosphat-Technik (60). Transfizierte Zellen wurden bis zur weiteren Untersuchung der Virusproduktion in einem geschlossenen Röhrchen eingefroren. Zellfreie Überstände von virusproduzierenden Zelllinien wurden für die Infektion der Mäuse aufgetaut (s. u.).

2.5 Zellkultur

Das Auftauen der Akv-infizierten und nicht-infizierten Zellen der Maus-Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 (University of Aarhus) erfolgte in dem geschlossenen Röhrchen unter 37 °C warmem, fließendem Leitungswasser. Eine sterile T25-Zellkulturflasche wurde für die Reaktivierung mit 4 ml Medium (80 % Dulbeccos Medium und 20 % fetales Kälberserum (FKS)) beschickt. 1 ml der aufgetauten Zellsuspension wurde dann in die vorbereitete Flasche überführt. Die Beurteilung der Zellmorphologie erfolgte unter einem Inversmikroskop. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und einem CO₂ Druck von 5 %. Bei guter Zellmorphologie wurden die Zellen am folgenden Tag in eine T75-Flasche überführt, die mit 10 ml Dulbeccos Medium (versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum) gefüllt wurde. Eine Kontrolle des Zellwachstums erfolgte an jedem Arbeitstag. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle drei Tage.

2.6 Virustiterbestimmung

Die Ermittlung des Virustiters des Kulturüberstandes erfolgte durch Titration und Infektion von Nachweiszellkulturen sowie durch Immunperoxidase-Färbung (IPF) (151). Vor der Injektion der Mäuse wurde eine 48-Lochplatte mit jeweils 2×10^4 Zellen und 0,5 ml Dulbeccos Medium, versetzt mit 10%igem FKS, gegeben. Zwei Tage später wurde virushaltiger Zellüberstand aus der Zellkulturflasche entnommen und in ein Zentrifugenglas filtriert (Porengröße des Filters war $0,2 \mu\text{m}$). Es folgte die Vorbereitung einer Verdünnungsreihe (0 bis 10^{-7}). Aus jedem Verdünnungsansatz wurden aufsteigend jeweils 0,25 ml pro Kammer in die vorbereitete Lochplatte pipettiert. Zuletzt erfolgte die Übertragung des unverdünnten Kulturüberstandes. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die virushaltige Flüssigkeit abgesaugt und die Zellen erhielten über Nacht frisches Medium (0,5 ml pro Kammer, versetzt mit 10 % FKS). Am darauf folgenden Tag wurde das Medium vollständig entfernt. Mit Methanol-Azeton-Gemisch (1:1) wurden die Zellen fixiert. Unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Lochplatte wurden durch Zugabe einer 1%igen Lösung von bovinem Serumalbumin in MilliQ-Wasser für 15 min blockiert. Beide Antikörper wurden mit einprozentiger BSA-PBS (bovines Serumalbumin in Phosphatgepufferten-Salzlösung) verdünnt. Der Primärantikörper Kaninchen anti Akv-Strukturprotein CA (p30) kam in einer Verdünnung von 1:1200 zum Einsatz. Je Kammer kamen 150 μl Antikörperlösung zur Anwendung. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte für zwei Stunden im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde dreimal mit PBS gewaschen. Bei dem Sekundärantikörper handelte es sich um an Peroxidase gekoppelte Ziege anti Kaninchen-Immunglobuline (Serotec, Düsseldorf). Pro Kammer wurden ebenfalls 150 μl eingesetzt, jedoch in einer Verdünnung von 1:1000. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug zwei Stunden. Der Nachweis der Antikörperbindung am Akv CA erfolgte durch eine Farbreaktion mittels Dimethylformamid (DMFA), Carbazol und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Für einen 50-ml-Ansatz wurden 10 mg Carbazol in 2,5 ml DMFA gelöst und mit 47,5 ml Immunperoxidasefärbungs-Puffer (pH 5) gründlich vermischt und durch einen Papierfilter filtriert. Zuletzt wurden 25 μl H_2O_2 (30%ig) hinzugefügt. Nach dem Absaugen des Sekundärantikörpers erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS. Für die Farbreaktion wurden je Kammer 250 μl der vorbereiteten Farbreaktionslösung verwendet. Die Reaktion wurde nach 5 bis 10 min unter kaltem, fließendem Wasser abgestoppt. Um für die Auszählung der rot gefärbten

virushaltigen Zellen einen besseren Kontrast zu erzielen, wurde etwas destilliertes Wasser in die Kammern gegeben.

Beim Absetzen der Mäuse gewonnene Blutproben wurden ebenfalls mit dieser Methode auf den Gehalt von Viren untersucht. Auf die vorbereitete Lochplatte wurden je Kammer 0,5 ml Blut aus dem Probenröhrchen gegeben. Nach zwei bis drei Stunden erfolgte ein Medienwechsel. Dieses Medium enthielt Dulbeccos Medium, 10 % FKS und 2 % PenStrep (100 IU/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin). Am Folgetag wurde die Immuncytochemie wie oben beschrieben durchgeführt.

2.7 Kontrolle der Transfektion und Infektion

Transfektionskontrollen wurden von unseren dänischen Kollegen, die Infektionskontrollen von Mitarbeitern der Abteilung für Vergleichende Medizin der GSF durchgeführt. Für die Amplifizierung von proviralen LTR-Sequenzen (aus den NIH-3T3 Zellen bzw. den Schwanzspitzen der Mäuse) mittels PCR kamen folgende Primer zum Einsatz:

5'-ttcataaggcttagccagctaactgcag-3' und 5'-gaattcgataatcgatccccggatcatatggg-3'

2.8 Statistische Analysen

Mäuse, die deutlich vergrößerte Lymphknoten oder eine Splenomegalie aufwiesen, wurden euthanasiert. Das Alter einer Maus spiegelt somit die Latenzzeit bis zur Tumormanifestation wider. War eine Tumormanifestation histologisch nicht nachweisbar, wurde der Wert zensiert (13). Latenzzeiten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Nicht-parametrische Daten, die zum Teil einer Zensur unterlagen, wurden mittels Kaplan-Meier Überlebenskurven und dem Log-Rank-Test ausgewertet (EPI 3.2.2). Unzensierte Daten kleiner Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-Test (<http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>) analysiert. Unzensierte Daten großer Gruppen wurden mit dem t-Test (<http://home.clara.net/sisa/t-test.htm>) ausgewertet. Ein Gruppenvergleich erfolgte mit dem Chi-Square Test (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Für die bildliche Darstellung der Ergebnisse (Inzidenzkurven, Punktdiagramme, Kreisdiagramme, Box Plots) wurde SigmaPlot 9.0 verwendet.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung von retrovirusinduzierten Tumoren. Die Diagnosen stützen sich auf morphologische, immunhistochemische und molekularbiologische Daten, die nach den Richtlinien der "Bethesda Proposals" (94, 138) interpretiert worden sind.

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Abschnitt werden (unabhängig von der Versuchsgruppe) die Ergebnisse der makroskopischen, histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen besprochen. Der zweite Abschnitt befasst sich mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Analysen. Der Vergleich der Pathogenität der verschiedenen Virustypen erfolgt im dritten Abschnitt.

3.1 Histologische und immunhistochemische Tumorklassifikation

Für die Analyse standen in Paraffin eingebettete Gewebeproben (darunter Lymphknoten, Milz, Thymus, Leber) von insgesamt 333 weiblichen Mäusen zur Verfügung. Repräsentative Beispiele der retrovirusinduzierten Lymphome und Leukämien sind den Abbildungen 9 bis 11 (Seiten 59 ff) zu entnehmen.

3.1.1 Reaktive folliculäre Hyperplasie, Hyperplasie der Marginalzone und milde Plasmazellproliferation

Von 333 Mäusen waren 10 (3,0 %) histologisch tumorfrei, jedoch lagen hyperplastische Follikel in der Milz und in den Lymphknoten vor, die von einer geringen Plasmazellproliferation (Abb. 10 a,b) und/oder einer Hyperplasie der Marginalzone begleitet wurden. Die Mäuse erreichten ein mittleres Alter von 152 ± 57 Tagen. Histologisch war die Lymphknotenkapsel in allen Fällen unversehrt. Die Organarchitektur von Lymphknoten und Milz war erhalten. Hyperplastische Follikel setzten sich aus morphologisch regelmäßigen Keimzentrumszellen zusammen und waren mit dem Marker Ki-67 darstellbar. Die Zellmorphologie der Plasmazellen war ebenfalls regelmäßig. Es fanden sich keine von Immunglobulin beladenen Mott-

Zellen oder apoptotische Russell-Körperchen in den lymphatischen Geweben. Plasmazellen zeigten eine positive Färbung mit dem Plasmazellmarker CD138. Eine extramedulläre Hämatopoiese in der Milz war in geringem Maße vorhanden. In der Leber fanden sich kleine, unspezifische Infiltrate von Lymphozyten.

3.1.2 Plasmozytom (PCT)

Bei 279 von 333 Mäusen (83,8 %) lag eine massive Plasmazellproliferation vor. Neben einer exzessiven Überflutung der Lymphknoten mit Plasmazellen fanden sich auch in nicht-lymphatischen Geweben mitunter große Infiltrationsareale von Plasmazellen. Die Morphologie dieser Neoplasien ist in den Abbildungen 9 und 10 c-l dargestellt. Die mittlere Latenzzeit betrug 179 ± 32 Tage. Die Lymphknoten waren dabei i. d. R. stärker befallen als die Milz. Ein Verlust der Lymphknoten-Organarchitektur durch massive Infiltration von Plasmazellen führte zur Diagnose Plasmozytom (Abb. 10 c). Bei 43 Mäusen war zusätzlich der Thymus vergrößert. Histologisch waren im verbreiterten Thymusmark hyperplastische Keimzentren ohne eine ausgebildete Mantelzone, sogenannte "nackte Keimzentren", auffällig, die von einer massiven Plasmazellproliferation umgeben waren (Abb. 10 d, e). In den Lymphknoten fanden sich ebenfalls nackte, hyperplastische Keimzentren, die bereits von den Plasmazellen überwuchert worden waren und dadurch lichter aussahen (sogenannter "Mottenfraß"). Keimzentren setzten sich aus Zentroblasten, Zentrozyten, follikulär dendritischen Zellen, Makrophagen und vereinzelt aus T-Zellen zusammen. Apoptotische Zellen und Phagozyten erzeugten das typische "Sternenhimmelmuster" (Abb. 10 f). Proliferierende Plasmazellen glichen reifen Plasmazellen. Zellkerne waren exzentrisch lokalisiert und zeigten das bekannte "Radspeichenmuster". Das reichliche Zytoplasma hatte in der HE-Färbung eine gleichmäßige blassrosa bis bläuliche Farbe. Immunhistochemische Färbungen waren membranös positiv für CD138 und zytoplasmatisch positiv für CD79acy (Abb. 10 i). Der Antikörper B220 markierte Zellen, die in hyperplastische Keimzentren lokalisiert waren.

In 112 von 279 Fällen (40,1 %) war die Morphologie der Plasmozytome sehr einheitlich (Abb. 10 c-l). Demgegenüber hoben sich 167 von 279 Plasmozytomen (59,9 %) morphologisch deutlich von dieser ersten homogenen Gruppe ab (Abb. 9). Die Besonderheiten werden nachfolgend beschrieben. Eine Korrelation lag zwischen

der Plasmazytomvariante "mit großzelliger Komponente" und den Virusgruppen Akv1-99 mE_{AVS} sowie Akv1-99 mE_{ts} vor (Chi-Square-Test: $p < 0,05$).

3.1.2.1 Plasmazytom mit Manifestation eines zweiten Tumors

In der Gruppe der Plasmazytome mit einem morphologisch inhomogenen Erscheinungsbild zeigten 19 von 167 Mäusen (11,4 %) einen weiteren Tumor. Hierbei handelte es sich:

in 11 von 19 Fällen (57,9 %) um ein splenisches Marginalzonen-Lymphom,

in drei von 19 Fällen (15,8 %) um eine akute myeloische Leukämie,

in zwei von 19 Fällen (10,5 %) um ein Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom und in jeweils einem Fall (5,3 %) um ein folliculäres, diffus großzelliges bzw.

kleinzelliges B-Zell-Lymphom. (Für eine ausführliche Beschreibung der Morphologie der Neoplasien, die zusammen mit dem Plasmazytom auftraten, siehe Abschnitte 3.1.5 für das splenische Marginalzonen-Lymphom, 3.1.7 für die akute myeloische Leukämie, 3.1.8 für das Vorläufer-T-Zell lymphoblastische Lymphom, 3.1.4 für das folliculäre B-Zell-Lymphom, 3.1.3 für das diffus großzellige B-Zell-Lymphom und Abschnitt 3.1.6 für das kleinzellige B-Zell-Lymphom.)

3.1.2.2 Plasmazytom mit großzelliger Zellkomponente

In 108 von 167 Fällen (64,7 %) fand sich in den Tumorzellarealen eine Mischung aus reifen Plasmazellen und blastischen, großen Zellen mit viel Zytoplasma (Abb. 9 d). Die großen, euchromatischen Zellkerne verfügten oft über einen zentralständigen deutlichen Nukleolus. Dieses morphologische Bild war unterschiedlich stark ausgeprägt. Beobachtet wurden Fälle mit überwiegender Anzahl an reifen Plasmazellen und, auf der anderen Seite, Fälle mit fast ausschließlich großen, blastischen Zellen. In einigen Fällen war diese Mischung aus reifen Plasmazellen und großen, blastischen Zellen nur fokal ausgebildet, in anderen generalisiert. Nackte hyperplastische Keimzentren waren auch bei Plasmazytomen mit großzelliger Komponente vorhanden. Diese Art des Plasmazytoms scheint eine progressivere Variante darzustellen. In der Gruppe der homogenen Plasmazytome war die Milz in fast allen Fällen deutlich weniger involviert als die Lymphknoten. Plasmazytome mit großzelliger Zellkomponente zeigten jedoch in der Regel einen deutlichen Befall der Milz. Zytologisch ähnelten die großen blastischen Zellen den Tumorzellen beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom. Da im Zusammenhang mit

diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen der Maus bis dato jedoch keine Plasmazellproliferationen beschrieben worden sind, wurde die hier beschriebene Tumorform als Variante des Plasmozytoms angesehen. Statistisch besteht kein Unterschied in den Latenzzeiten der Plasmozytome mit einer großzelligen Komponente gegenüber den Plasmozytomen ohne Zusatzbefunde ($p=0,79$).

3.1.2.3 Plasmozytom mit myeloischer Dysplasie und verstärkter extramedullärer Hämatopoiese

In 34 von 167 Fällen (20,6 %) lag zusätzlich zum Plasmozytom eine myeloische Dysplasie in der Milz vor. Die rote Pulpa war deutlich hyperzellulär (Abb. 9 e-i) und enthielt eine große Menge an Pronormoblasten und basophilen Normoblasten (Linksverschiebung). Polychromatophile Normoblasten wiesen Doppelkernigkeit, abnorme Mitoseformen und unregelmäßige Kernränder auf (Abb. 9 g-i). Das Vorliegen einer erhöhten Anzahl an Erythroblasten sowie die dysplastische Erythropoiese führte zur Diagnose myelodysplastisches Syndrom der Erythrozytenlinie. In 12 von 167 Fällen (7,2 %) war in der Milz und in der Leber eine erhöhte Hämatopoiese zu erkennen (Abb. 9 j-l). Die myeloischen Zellen wiesen keine Dysplasien auf und es lag keine Linksverschiebung vor. Bei diesen Fällen handelte es sich höchstwahrscheinlich um reaktive myeloische Proliferationen. In einem weiteren Fall lag ausschließlich eine starke extramedulläre, entzündungsbedingte Granulopoiese in Milz und Leber vor.

3.1.2.4 Plasmozytom mit Marginalzonenhyperplasie

In 19 von 167 Fällen (11,4 %) wurde in der Milz neben dem Plasmozytom eine zum Teil deutlich verbreiterte Marginalzone beobachtet (Abb. 9 m-o). Die Marginalzonenzellen zeichneten sich durch reichlich, blassrosa gefärbtes Zytoplasma, mittelgroße, blastische Zellkerne und ein sehr monotones Erscheinungsbild aus.

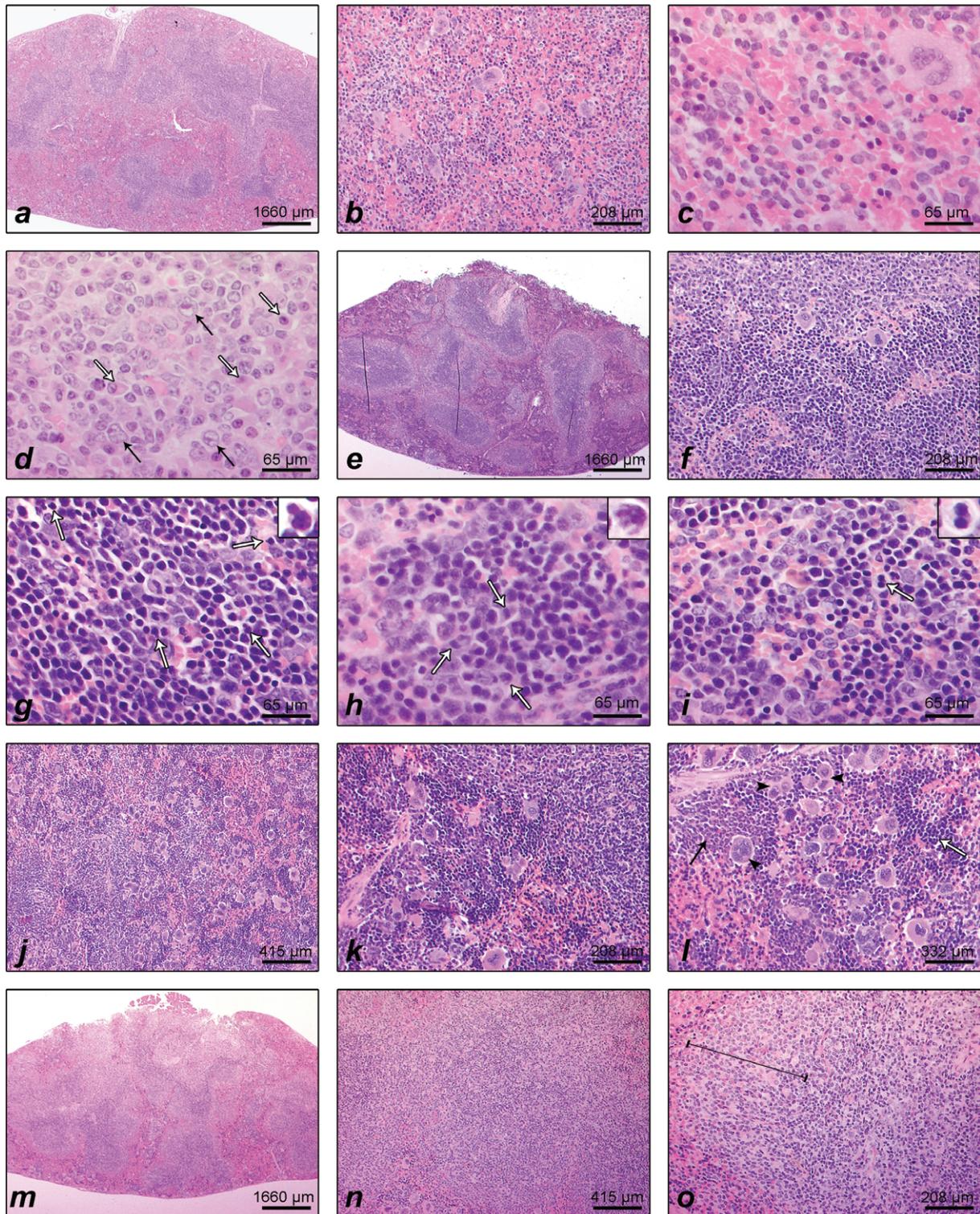


Abbildung 9: Histologie einer Kontrollmilz und von Milzen mit Plasmazytomvarianten

a-c, moderate Blutbildung, rote Färbung der roten Pulpa, schmale Marginalzone und nicht-reaktive weiße Pulpa (Kontrollmaus, HE); **d**, Plasmazytom mit großzelliger Komponente; differenzierte Plasmazellen (weiße Pfeile) und große, blastische Zellen mit ein bis drei deutlichen Kernkörperchen (schwarze Pfeile) (HE); **e-i**, Plasmazytom mit dysplastischer Erythropoiese (HE); **e**, Übersichtsvergrößerung der Milz; beachte dunkle Färbung der roten Pulpa, die durch hohen Gehalt an kernhaltigen

Normoblasten bedingt ist; **f**, Plasmazellproliferation (oberer Bildrand) und von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen angefüllte rote Pulpa (vergleiche 9 b); **g**, Normoblasten (weiße Pfeile) mit Kernen von ungleichmäßiger Morphologie; vergrößerte Darstellung eines lobulierten Kerns (kleines Fenster); **h**, Mischung aus sehr frühen Vorläuferzellen und reiferen Normoblasten; abnorme Mitoseformen (weiße Pfeile); vergrößerte Darstellung einer Mitoseform (kleines Fenster); **i**, Doppelkernigkeit von Normoblasten; vergrößerte Darstellung eines dysplastischen Normoblasten mit Doppelkernigkeit (kleines Fenster); **j-k**, Plasmozytom mit starker Hämatopoiese (HE); **j**, erhöhte Zellularität der roten Pulpa; **k**, Plasmazellproliferation (oberer Bildrand); rote Pulpa ist zellreich und zeigt Erythropoiese, Thrombozytopoiese und Granulopoiese (vergleiche 9 b und 9 f); **l**, geordnete Hämatopoiese; thrombozytopoietische Areale (Pfeilköpfe), granulopoietischer Herd (schwarzer Pfeil) und erythropoietische Zellen (weißer Pfeil); **m-o**, Plasmozytom mit hyperplastischer Marginalzone; (HE); **m**, Übersichtsvergrößerung der Milz, beachte die breiten, hellen Areale am Übergang zur roten Milzpulpa; **n**, Vermehrung von Gedächtniszellen in der Marginalzone (blasse Farbgebung der äußeren Areale der periarteriolen lymphatischen Scheide); **o**, Plasmazellproliferation (rechter oberer Bildrand); Verbreiterung der Marginalzone (schwarzer Balken).

3.1.3 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)

In 23 von 333 Fällen (6,9 %) wurde ein DLBCL diagnostiziert (Abb. 10 o und 11 a-c). Alle drei morphologischen Varianten (histiozytenassoziiertes, zentroblastisches und immunoblastisches DLBCL) waren vertreten, jedoch kamen am weitaus häufigsten DLBCL mit assoziiertem Histiozyteninfiltrat vor. Die mittlere Latenzzeit lag bei 192 ± 19 Tagen. Die Architektur der betroffenen Organe war stets stark beeinträchtigt. In Abbildung 10 m ist das massive Tumorzellinfiltrat in einer Milz dargestellt. Die Tumorzellen machen den Hauptanteil des Organs aus und nur am Rand sind Reste nicht-tumorösen Gewebes erkennbar. Die neoplastischen, großen B-Zellen verfügten in der HE-Färbung über blassrosa gefärbtes Zytoplasma und waren B220-positiv (Abb. 11 g), CD79acy-positiv und CD138-negativ. Die hohe Proliferationsrate ließ sich mit einem immunhistochemischen Nachweis von Ki-67 (Abb. 11 f) darstellen. Die reaktiv vorhandenen kleinen Lymphozyten waren CD3-positiv (Abb. 11 h). Zusätzlich wurde eine deutliche Infiltration von eosinophilen Granulozyten und zahlreichen Histiozyten beobachtet (Abb. 11 e). In einem Fall trat das diffus großzellige B-Zell-Lymphom in Kombination mit einem Plasmozytom auf.

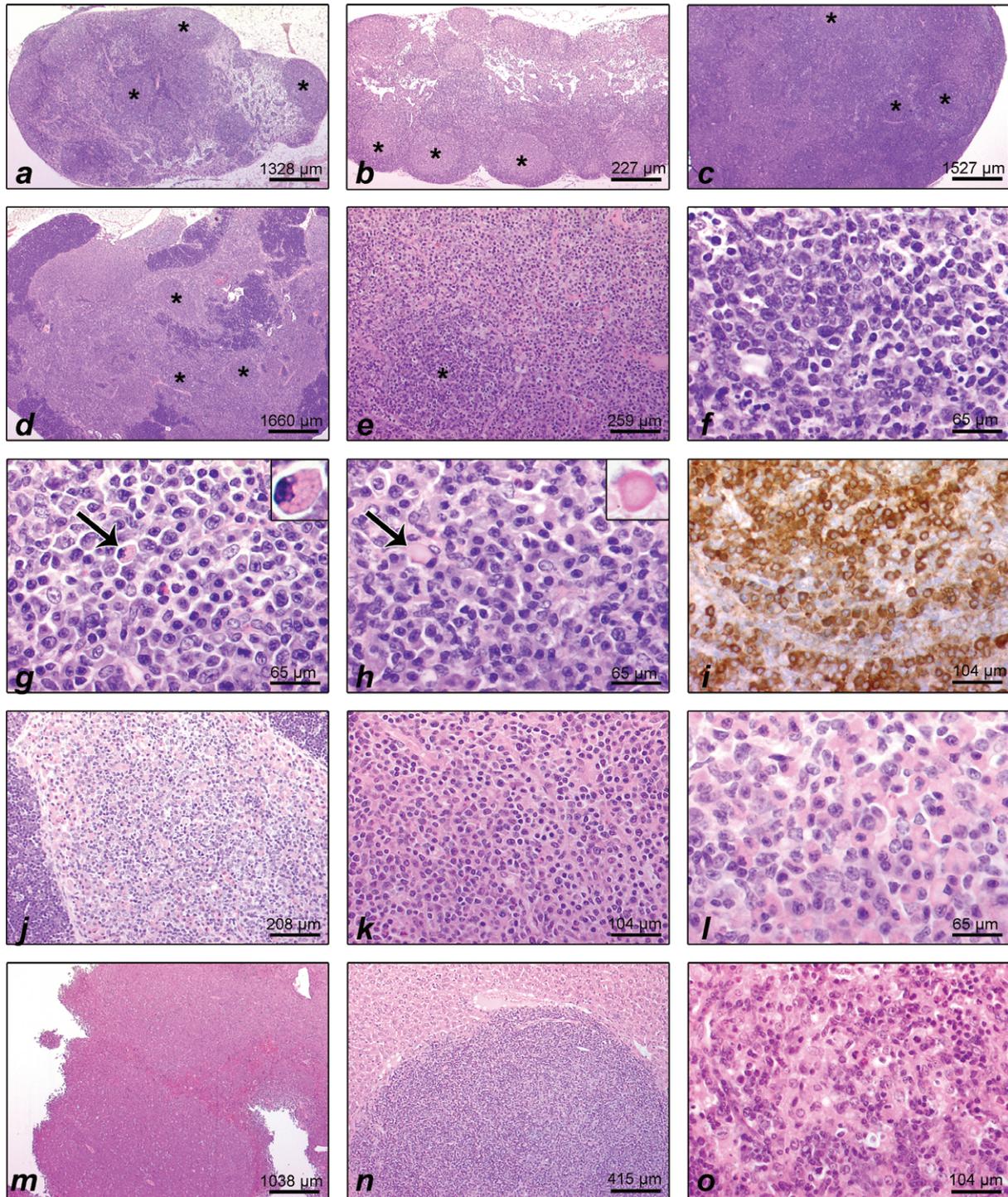


Abbildung 10: Histologie und IHC retrovirusinduzierter folliculärer Hyperplasien, Plasmazytome und diffus großzelliger B-Zell-Lymphome

a, b, hyperplastische Follikel mit klar erkennbaren Keimzentren (Sterne) im Lymphknoten; Sinusoide sind frei, Architektur der Lymphknoten ist erhalten (HE); **c-i**, Plasmazytom; **c**, Lymphknoten zeigt neben nackten, hyperplastischen Keimzentren (Sterne) eine starke Plasmazellproliferation (HE); **d**, vergrößerter Thymus mit schmaler Rinde; Mark ist vollständig von proliferierenden B-Zellen infiltriert; neben nackten Keimzentren (Sterne) liegt eine massive Plasmazellproliferation vor (HE); **e**,

vergrößerte Darstellung eines nackten, hyperplastischen Keimzentrums (Stern) im Thymusmark, das von Plasmazellen umgeben ist (HE); **f**, charakteristische Zellzusammensetzung eines Keimzentrums (HE); **g, h**, Proliferation von Plasmazellen in einem Lymphknoten, Pfeil in g deutet auf eine Mott-Zelle, Pfeil in h auf eine Plasmazelle mit Russell-Körperchen; vergrößerte Darstellung einer Mott-Zelle (kleines Fenster in g) und eines Russel-Körperchen (kleines Fenster in h) (HE); **i**, immunhistochemische Darstellung von Plasmazellen in einem Lymphknoten (CD79acy); **j**, Ansammlung von Russell-Körperchen und Mott-Zellen im Thymusmark (HE); **k**, monotone Plasmazellpopulation und vereinzelte Infiltrate von eosinophilen Granulozyten in einem Lymphknoten (HE); **l**, Ansammlung von Russell-Körperchen im Thymusmark (HE); **m-o**, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; **m**, fast vollständige Infiltration der Milz von neoplastischen B-Zellen, marginal sind noch Reste der roten Pulpa erkennbar (HE); **n**, massive Infiltration von Tumorzellen in der Leber; Manifestationsherde in nicht-lymphatischen Geweben enthalten oft viele reaktive T-Zellen weshalb diese Infiltrate in der HE-Färbung sehr blau erscheinen (HE); **o**, eosinophiles Granulozyteninfiltrat und zahlreiche Histozyten in einem Lymphknoten (HE).

3.1.4 Follikuläres B-Zell-Lymphom (FBL)

Insgesamt entwickelten 15 von 333 Mäusen (4,5 %) ein FBL (Abb. 11 j-o). Die mittlere Latenzzeit lag bei 178 ± 33 Tagen. Das typisch noduläre Wachstumsmuster beim Menschen, wurde bei den Mäusen dieser Studie nicht beobachtet. Die neoplastischen Zellen lagen diffus im Lymphknoten vor. Die bei fast allen humanen FBL beschriebene, durch eine Translokation verursachte erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL-2, konnte bei den hier untersuchten murinen FBL nicht nachgewiesen werden. Diese Umstände sprechen eigentlich gegen eine direkte Vergleichbarkeit von humanen und murinen follikulären B-Zell-Lymphomen. Statt eines Apoptoseblocks war es jedoch möglich, eine erhöhte Proliferation der Tumorzellen mit einer immunhistochemischen Färbung gegen das Ki-67 Protein darzustellen (Abb. 11 o). Trotz bestehender Unterschiede zwischen murinen und humanen follikulären B-Zell-Lymphomen wurde der Name beibehalten, da sich morphologisch die Tumorzellen aus Zentroblasten und Zentrozyten zusammensetzten. Die Kerne der Zentrozyten gaben vielfach den Anschein als wären sie gespalten; sie verfügten über leicht verdichtetes Chromatin und wiesen keine auffälligen Kernkörperchen auf. Neoplastische Zellen waren B220-positiv (Abb. 14 m). Follikuläre B-Zell Lymphome, die sich in ein DLBCL entwickelten, wurden der Gruppe der DLBCL zugeordnet. In einem Fall trat das follikuläre B-Zell-Lymphom in Kombination mit einem Plasmozytom auf.

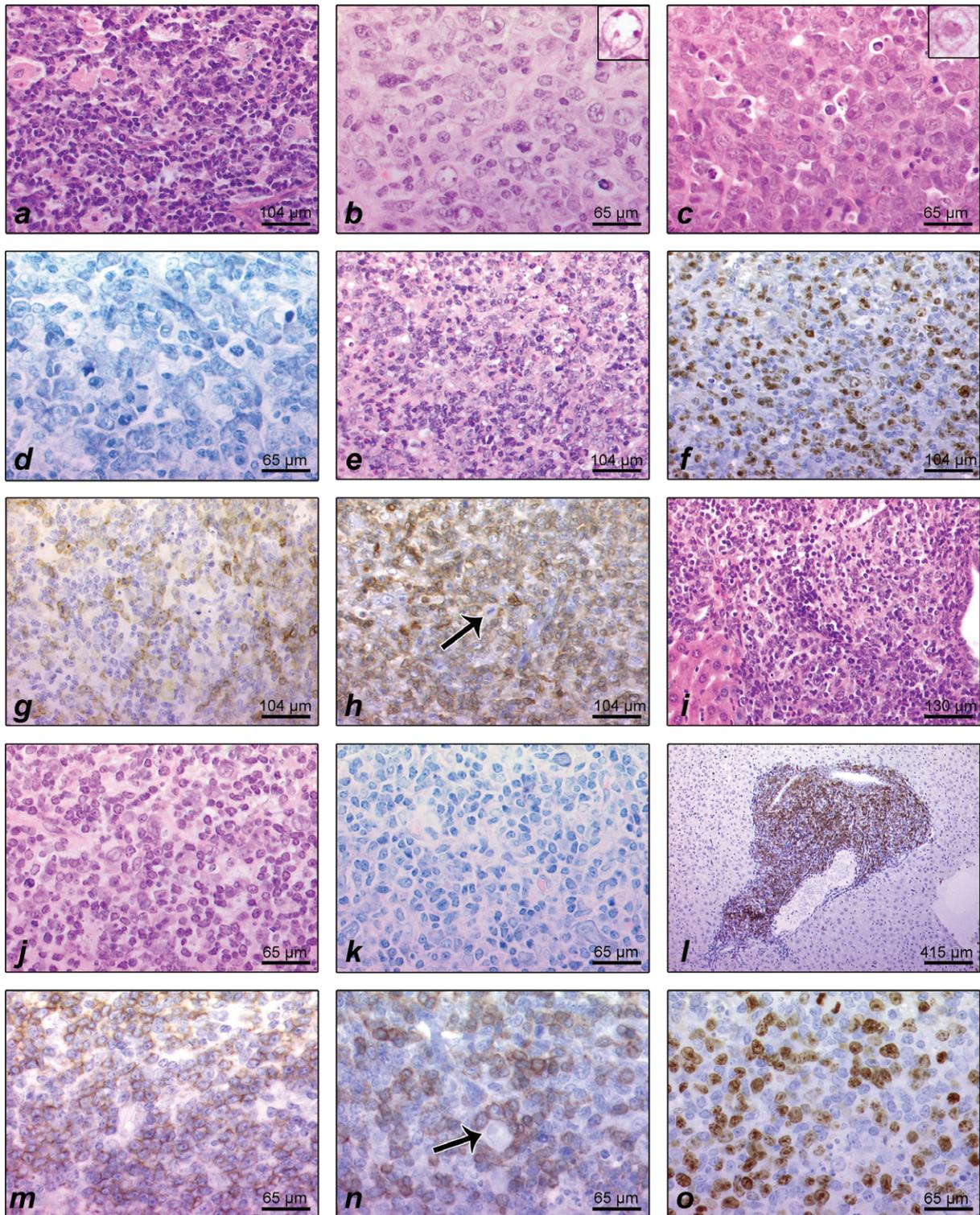


Abbildung 11: Histologie und IHC retrovirusinduzierter diffus großzelliger B-Zell-Lymphome und follikulärer B-Zell-Lymphome

a, histiozytenassoziiertes diffus großzelliges B-Zell-Lymphom mit einer Vielzahl von infiltrierenden Histozyten und kleinen, nicht-neoplastischen T-Lymphozyten in einem betroffenen Lymphknoten (HE); **b**, zentroblastisches diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; zahlreiche Mitosen, Apoptosen und große, zentroblastische Tumorzellen (HE), Ausschnittsvergrößerung eines Zentroblasten (kleines Fenster); **c**, immunoblastisches diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; Sternenhimmelmuster in der Milz,

große Tumorzellen mit zentralständigen Kernkörperchen (HE), Ausschnittsvergrößerung eines Immunoblasten (kleines Fenster); **d-i**, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; **d**, Tumorzellmorphologie in einem Lymphknoten (Giemsa); **e**, Infiltration von eosinophilen Granulozyten in einem Lymphknoten (HE); **f**, immunhistochemische Darstellung proliferativer Zellen in einem Lymphknoten (Ki-67); **g**, große, mitotische B220-positive Zellen; **h**, infiltrierende, reaktive CD3-positive T-Zellen in einem Lymphknoten; die mitotische, neoplastische B-Zelle in der Bildmitte (Pfeil) ist CD3-negativ; **i**, große deutliche Tumorzellinfiltrate in der Leber (HE); **j-o**, follikuläres B-Zell-Lymphom; **j**, Mischung aus Zentroblasten und Zentrozyten (HE); **k**, Mischung aus großen und kleinen B-Zellen in einem Lymphknoten (Giemsa); **l**, Tumorzellinfiltrat in der Leber mit B220-positiven Zellen; **m**, B220-positive Tumorzellen in einem Lymphknoten (HE); **n**, große Tumorzelle in einem Lymphknoten, die von reaktiven CD3-positiven T-Zellen umringt ist (Pfeil); **o**, hohe mitotische Aktivität der Tumorzellen in einem Lymphknoten (Ki-67).

3.1.5 Splenisches Marginalzonen-Lymphom (SMZL)

In 14 von 333 Fällen (4,2 %) wurde ein SMZL klassifiziert (Abb. 12 a-e). Die mittlere Latenzzeit betrug 179 ± 21 Tage. In nur einem Fall befanden sich neoplastische Marginalzonenzellen auch in einem vergrößerten Lymphknoten. Bei sieben Mäusen lag eine Splenomegalie vor (Median der Milzlänge: 37 mm). In der Milz infiltrierten die Marginalzonenzellen hauptsächlich die rote Pulpa, in fortgeschrittenen Stadien aber auch Teile der periarteriolen lymphatischen Scheide (PALS). Das Infiltrationsbild und die Zellmorphologie sind die Hauptkriterien für die Diagnose "splenisches Marginalzonen-Lymphom". Monotone Marginalzonenzellen zeigten in der HE-Färbung reichlich blassrosa gefärbtes Zytoplasma. Die Zellkerne waren rund, verfügten über unterschiedlich viel Eu- und Heterochromatin und wiesen in Stadien geringerer Malignität keine auffälligen Kernkörperchen auf. In einem Fall konnten B-Zellen mit der Morphologie von Marginalzonenzellen in den Sinusoiden der Leber nachgewiesen werden. Immunhistochemisch stellten sich manche Marginalzonenzellen als B220-negativ heraus. Alle untersuchten SMZL-Fälle waren CD79acy-positiv. Von den 14 klassifizierten, splenischen Marginalzonen-Lymphomen kamen 11 in Kombination mit einem Plasmozytom vor.

3.1.6 Kleinzelliges B-Zell-Lymphom (SBL)

In vier von 333 Fällen (1,2 %) wurde die Diagnose SBL gestellt (Abb. 12 f-h). Die mittlere Latenzzeit betrug 160 ± 13 Tage. Alle Mäuse wiesen eine Splenomegalie auf. Tumoröse, kleine, reife B-Zellen mit wenig Zytoplasma und verdichtetem Chromatin, zeigten eine diffuse Infiltration der Milz und der Lebersinusoide (Abb. 12 h). In einem Fall trat das kleinzellige B-Zell-Lymphom in Kombination mit einem Plasmozytom auf.

3.1.7 Akute myeloische Leukämie (AML)

In vier von 333 Fällen (1,2 %) trat eine akute myeloische Leukämie mit morphologischer Ausreifung auf (Abb. 12 i, j). Die mittlere Latenzzeit betrug 145 ± 13 Tage. In der Milz befanden sich mehr als 20% blastische Zellen. Bezogen auf die Fraktion der granulozytären Linie betrug die Anzahl der Blasten weniger als 90%, was zur Diagnose "myeloische Leukämie mit morphologischer Ausreifung" führte. Unterschiedliche Reifungsstadien von neoplastischen Myeloblasten wurden in der Milz, Leber und im Lymphknoten nachgewiesen. Myeloblasten verfügten über einen großen, runden Kern mit fein verteiltem Chromatin und einer geringen Menge an leicht basophilem Zytoplasma. In der HE-Färbung ist der perinukleäre Hof, der kaum angefärbte, neben dem Kern lokalisierte Golgebereich, deutlich erkennbar. Reifere Zellstadien zeigten die typische Doughnut-Form der murinen Granulozyten, fein granuliertes blasses Zytoplasma und waren deutlich MPO-positiv (Abb. 12 j). Die Linienzugehörigkeit konnte des Weiteren durch eine Chlorazetat-Esterase bestätigt werden. Das histologische Bild einer murinen Milz mit reaktiver Granulopoiese ähnelt dem einer murinen myeloisch-leukämischen Milz mit Ausreifung. Bei Proliferationen von myeloischen Zellen muss daher stets abgeklärt werden, ob diese reaktiv oder nicht-reaktiv sind. In einem Fall lag eine starke Proliferation von Granulozyten in der Milz vor, die aber als Reaktion auf einen großen Abszess in der Lunge zurückzuführen war. Demzufolge wurde sie nicht als myeloische Leukämie klassifiziert. In drei von vier Fällen trat die akute myeloische Leukämie in Verbindung mit einem Plasmozytom auf.

3.1.8 Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom (Prä-T LBL)

In drei von 333 Fällen (0,9 %) wurde ein Prä-T LBL diagnostiziert (Abb. 12 k-o). Die mittlere Latenzzeit betrug 131 ± 36 Tage. Bemerkenswert war die starke Beteiligung der Lymphknoten bei einem Tier, welches 15 vergrößerte Lymphknoten aufwies. Sechs davon erreichten eine Größe von über 10 mm. Der Thymus dieser Maus war 10 mm groß. In befallenen Organen zeigten sich bei geringer Vergrößerung großflächige Infiltrationen der Tumorzellen mit dem typischen "Sternenhimmelmuster" (Abb. 12 k, l). Die blastischen Tumorzellen verfügten über wenig Zytoplasma, einen euchromatischen Zellkern und ein bis zwei kleine Kernkörperchen. Mitosen waren sehr zahlreich vorhanden. Bei den Tumorzellen handelte es sich um unreife, Tdt-positive, CD3-positive und B220-negative T-Zellen (Abb. 12 m-o). Wahrscheinlich handelte es sich bei diesen drei Fällen um spontane, sporadisch auftretende und nicht um retrovirusinduzierte T-Zell-Lymphome. In zwei Fällen lag neben dem Vorläufer-T-Zell lymphoblastischem Lymphom zusätzlich ein Plasmozytom vor.

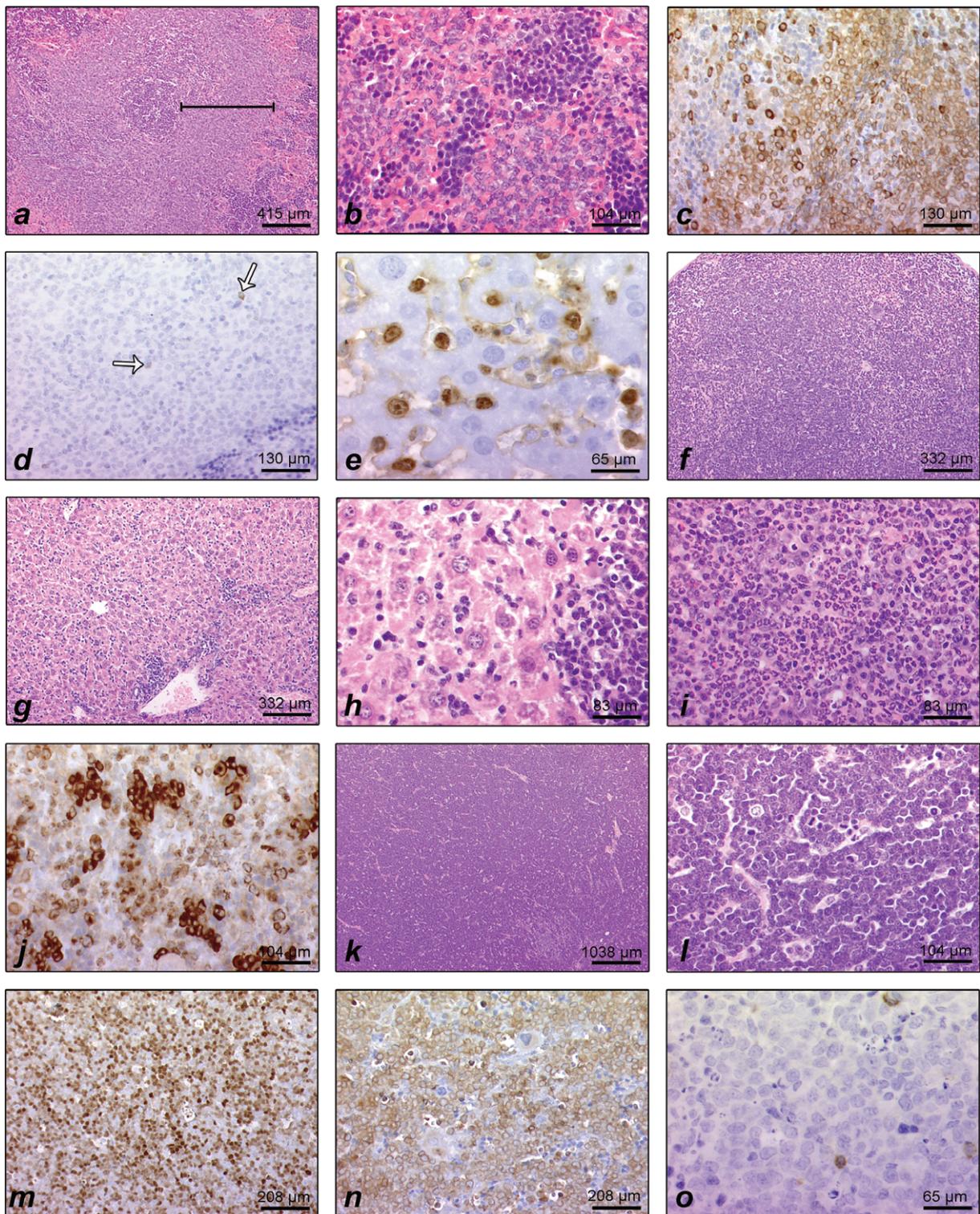


Abbildung 12: Histologie und IHC retrovirusinduzierter splenischer Marginalzonen-Lymphome, kleinzelliger B-Zell-Lymphome, akuter myeloischer Leukämien und Vorläufer-T-Zell lymphoblastischer Lymphome

a-e, splenisches Marginalzonen-Lymphom; **a**, der Balken markiert die extrem verbreiterte Marginalzone (Milz, HE); **b**, blaues, monotones Zellinfiltrat in der roten Milzpulpa (HE); **c**,

infiltrierende Tumorzellen sind BCL-2-positiv, (Milz, HE); **d**, B220-negative Tumorzellen; Pfeile deuten auf reaktive, positiv gefärbte B-Zellen (Milz, HE); **e**, Ki-67-positives Tumorzellinfiltrat in Lebersinusoiden (HE); **f-h**, kleinzelliges B-Zell-Lymphom; **f**, starke Infiltration der Milz (HE); **g**, generalisierte Infiltration der Lebersinusoiden (HE); **h**, Tumorzellen ähneln reifen, kleinen Lymphozyten; sinusoidale und perivaskuläre Infiltrationsherde (Leber, HE); **i, j**, akute myeloische Leukämie mit morphologischer Ausreifung; **i**, Granulozyteninfiltration der roten Milzpulpa (HE); **j**, immunhistochemischer Nachweis der Granula im Zytoplasma neoplastischer Zellen (MPO); **k-o**, Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom; **k**, "Sternenhimmelmuster" in einem stark infiltrierten Thymus (HE); **l**, stärkere Vergrößerung eines betroffenen Lymphknotens (HE); **m**, Tdt-positiv Tumorzellen in einem Lymphknoten; **n, o**, CD3-positiv Tumorzellen in **n** und B220-negative Zellen in **o**.

3.1.9 Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse

3.1.9.1 Plasmozytom als häufigster Tumor

In Abbildung 13 sind die histologischen Befunde anteilmäßig dargestellt. Diese Abbildung ist eine zusammenfassende Darstellung aller festgestellten Tumore und gibt lediglich das Spektrum der durch Akv- und Akv-Mutanten-induzierten Neoplasien wieder. Der Effekt der einzelnen Mutationen von Akv auf das jeweils induzierte Tumorspektrum ist in Kapitel 3.3 beschrieben. Für die histologischen Untersuchungen standen formalinfixierte Gewebeproben von 333 Mäusen zur Verfügung. Bei 19 Mäusen lagen zwei verschiedene Neoplasien gleichzeitig vor, sodass insgesamt 352 Tumore klassifiziert wurden. Tumorkombinationen kamen nur mit Plasmozytomen vor. Die überwiegende Mehrheit der Mäuse entwickelte ein Plasmozytom (279 von 333; 83,8 %). Die zweithäufigste Lymphomart war das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (23 von 333, 6,9 %). Bei 15 von 333 Mäusen (4,5 %) trat ein follikuläres B-Zell-Lymphom auf, das etwa genau so häufig wie das splenische Marginalzonen-Lymphom diagnostiziert wurde (14 von 333; 4,2 %). Zu den unterrepräsentierten Tumorarten gehörten das kleinzellige B-Zell-Lymphom (vier von 333; 1,2 %), die akute myeloische Leukämie (ebenfalls vier von 333; 1,2 %) sowie das Vorläufer-T-Zell lymphoblastische Lymphom (drei von 333; 0,9 %). Insgesamt blieben 10 von 333 Mäusen bis zum Todeszeitpunkt histologisch tumorfrei. Da in diesen Fällen die Lebensdauer nicht mit der Latenzzeit gleichzusetzen ist, wurde das Alter dieser Mäuse für weiterführende statistische Analysen zensiert.

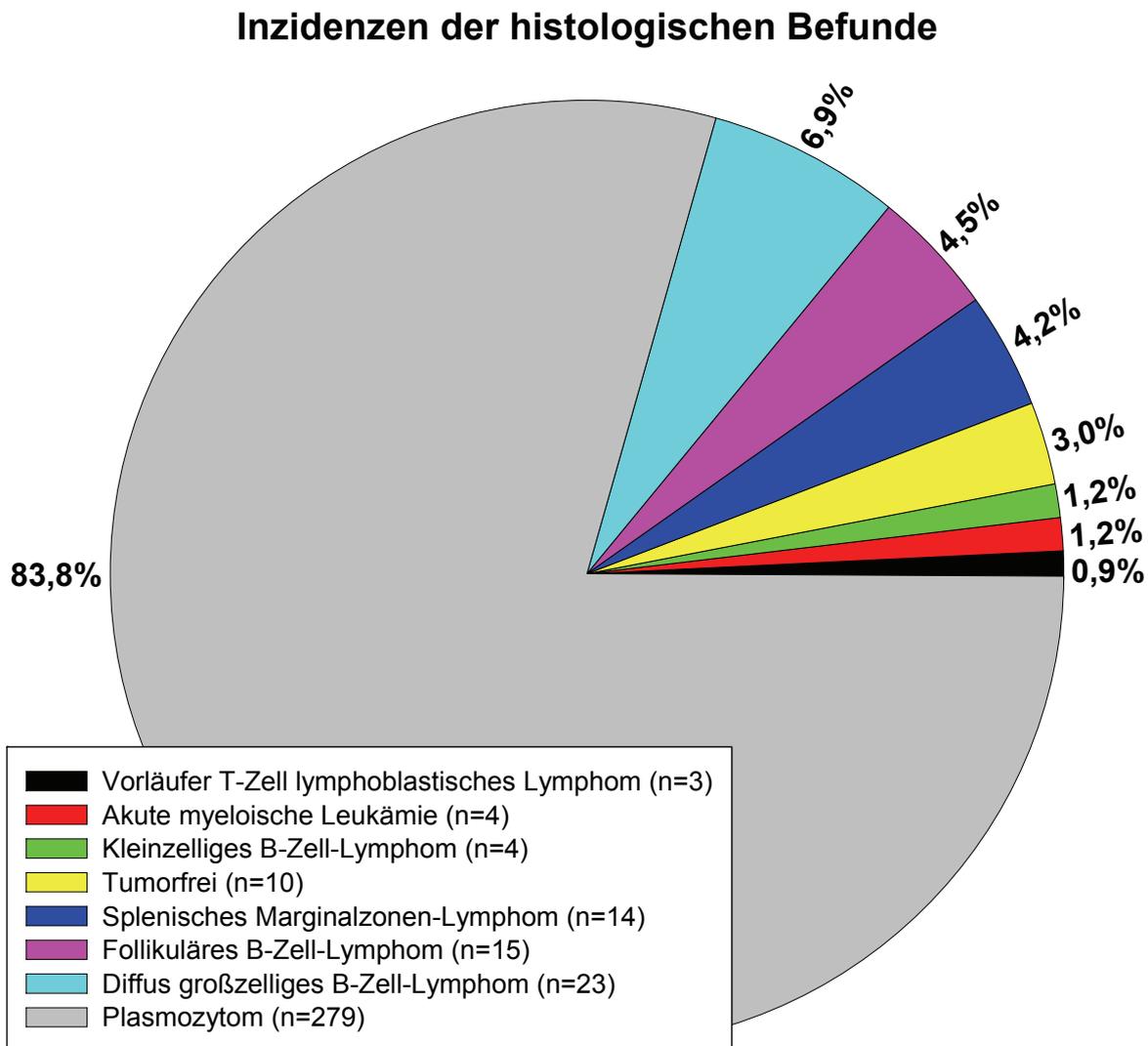


Abbildung 13: Befunde nach Injektion von Akv und Akv-Mutanten bei NMRI-Mäusen

Die Tumorklassifizierung erfolgte in Anlehnung an die "Bethesda Proposals" (94, 138). Der häufigste Befund war das Plasmozytom (83,8 %).

3.1.9.2 Aggressive Neoplasien haben kürzere Latenzzeiten

Während der Untersuchungen im Stall dienten eine vergrößerte Milz (>30 mm) oder ein vergrößerter Lymphknoten (>10 mm) als Leitkriterien für die Verdachtsdiagnose "Lymphom" (187). Kranke Mäuse, die bei der klinischen Untersuchung eines dieser Kriterien erfüllten, wurden euthanasiert. Das erreichte Lebensalter spiegelt demnach die Latenzzeit bis zur Tumormanifestation wider. Die Kinetik der Tumormanifestation für die verschiedenen Tumorarten ist Abbildung 14 zu entnehmen. Auffällig ist, dass kein Tier mit einem hoch infiltrativen Tumor, wie z.B. dem Vorläufer-T-Zell

lymphoblastischen Lymphom, der myeloischen Leukämie oder dem kleinzelligen B-Zell-Lymphom, älter als 168 Tage wurde. Für eine statistische Auswertung waren die Gruppengrößen mit jeweils nur drei bis vier Mäusen zu gering.

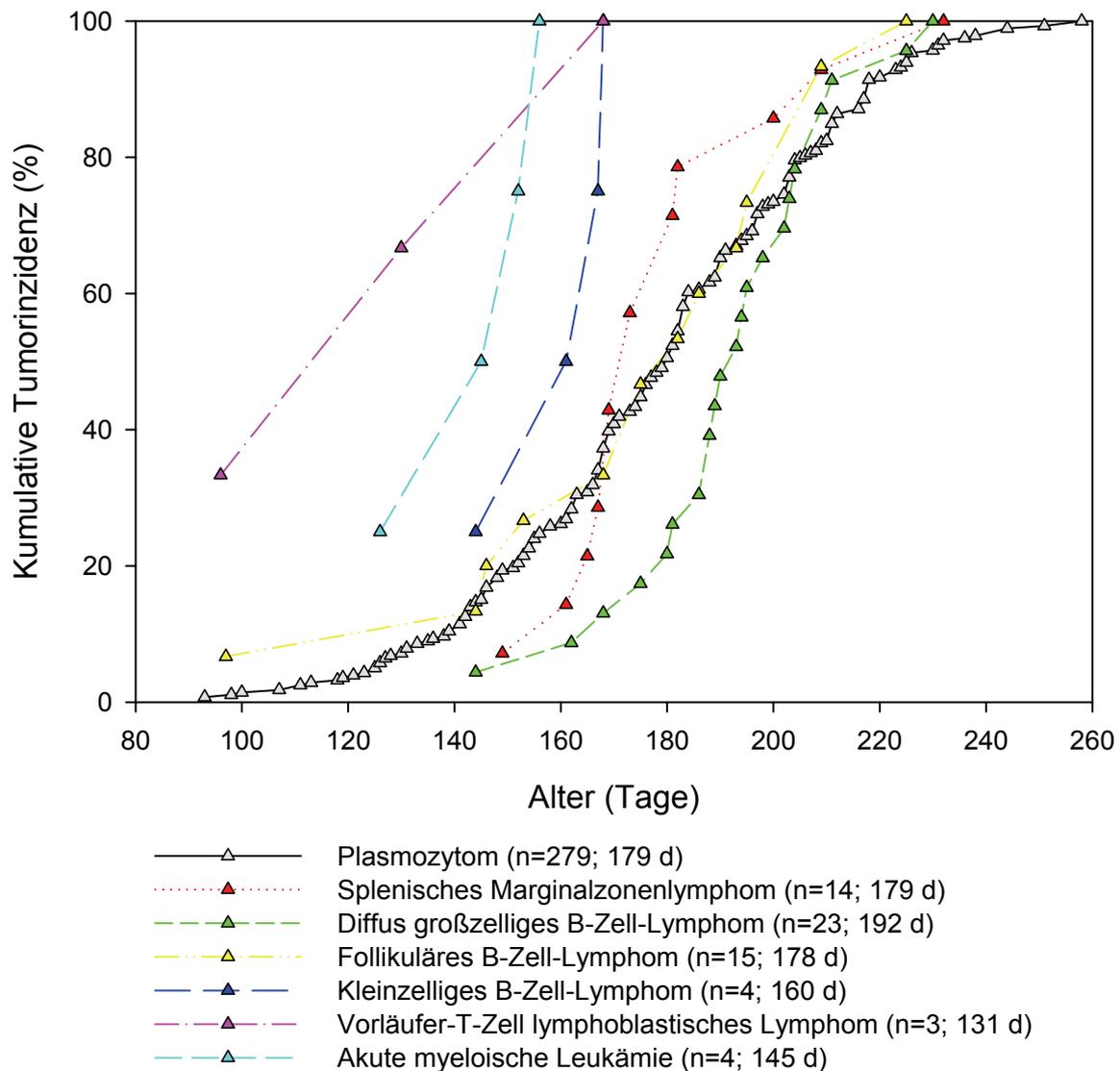


Abbildung 14: Kinetik der Tumormanifestation

In der Legende sind in Klammern die Anzahl der retrovirusinduzierten Tumore sowie die mittleren Latenzzeiten in Tagen angegeben.

3.1.9.3 Kinetik von Plasmozytomvarianten

Morphologische Unterschiede innerhalb der Plasmozytomgruppe (Abb. 9 und 10 c-l) führten zu der Frage, ob sich Plasmozytome mit einem weiteren Tumor, einer großzelligen Komponente, einer erythroiden Dysplasie, starker Hämatopoiese und hyperplastischer Marginalzone in ihrer Kinetik von den Plasmozytomen ohne Zusatzbefunde unterschieden. Die Kinetik der Plasmozytommanifestation ist nach den jeweiligen Zusatzbefunden in Abbildung 15 dargestellt. Plasmozytome ohne Zusatzbefund unterschieden sich in ihrer Kinetik nicht von Plasmozytomen mit einer großzelligen Komponente (paired *t*-Test: $p > 0,5$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne starke Hämatopoiese (Mann-Whitney-Test: $p > 0,1$). Die Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne splenischem Marginalzonen-Lymphom waren ebenfalls nicht signifikant (Mann-Whitney-Test: $p > 0,5$). Ebenso waren die Gruppen mit und ohne Marginalzonenhyperplasie nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-Test: $p > 0,5$). Plasmozytome mit dysplastischer Hämatopoiese entwickelten sich allerdings signifikant schneller als Plasmozytome ohne Zusatzbefunde (Mann-Whitney-Test: $p < 0,05$). Für Gruppen, die weniger als acht Tiere umfassten, wurden keine statistischen Auswertungen durchgeführt.

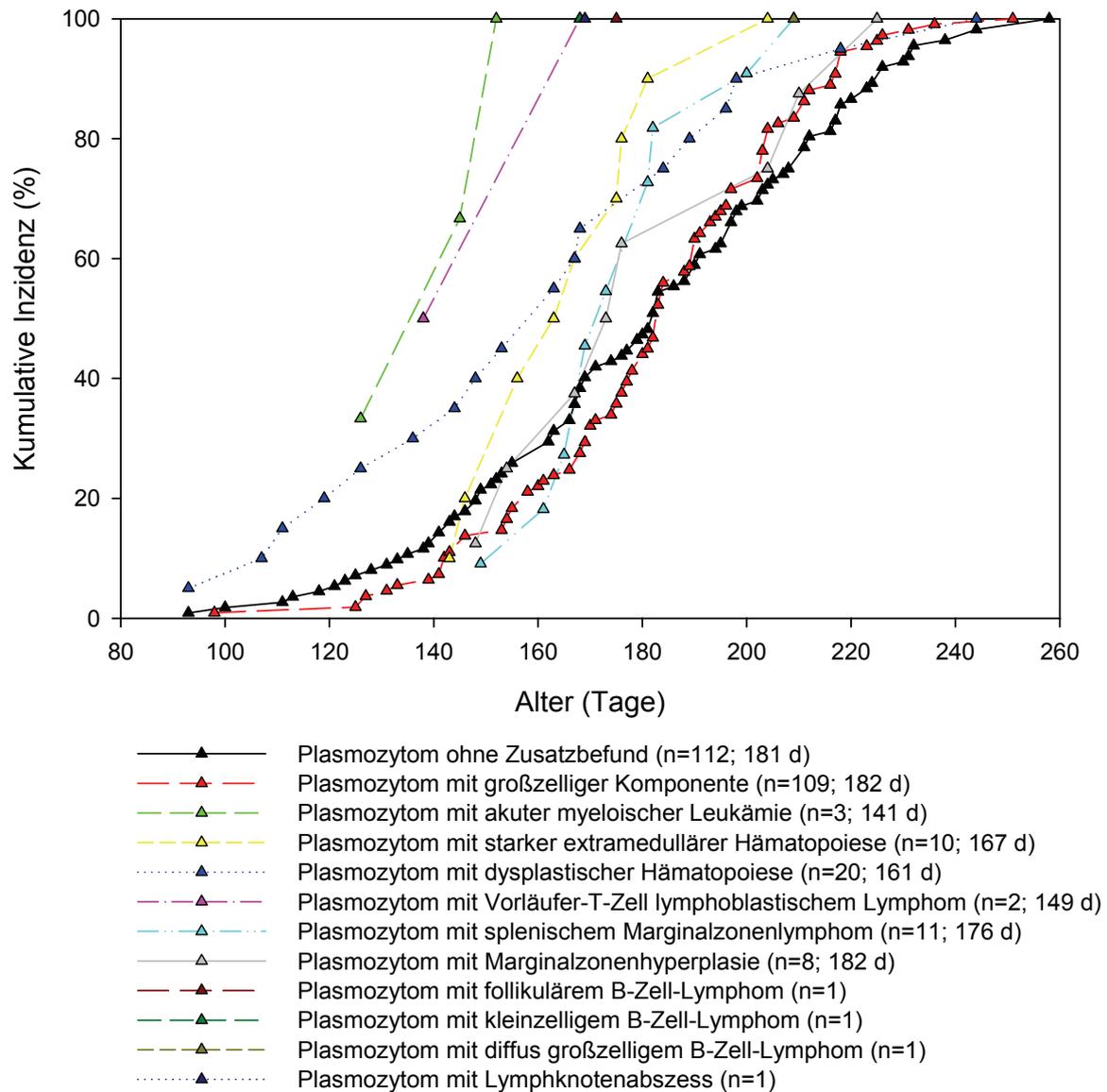


Abbildung 15: Latenzzeiten von Plasmozytomen mit und ohne Zusatzbefunden

In der Legende sind in Klammern die Anzahl der Plasmozytomvarianten sowie die mittleren Latenzzeiten in Tagen angegeben.

3.2 Molekularbiologische Ergebnisse

Von insgesamt 60 Mäusen aus sechs verschiedenen Versuchsgruppen waren gefrorene Gewebeproben vorhanden. In 55 Fällen wurde eine Southern Blot Analyse mit der IgH, der Igk und/oder der eco env Sonde durchgeführt. Für die IgH-Amplifikation mittels PCR mit anschließender Fragmentanalyse standen von allen 333 Mäusen in Paraffin eingebettete Gewebeproben zur Verfügung (darunter Lymphknoten, Milz, Thymus, Leber). Für die Untersuchung wurden stichprobenhaft 71 Fälle mit unterschiedlichen histologischen Befunden ausgewählt.

3.2.1 Southern Blot

Gewebeproben von 55 Mäusen (Milz und/oder vergrößerte Lymphknoten) wurden mit der IgH, Igk und/oder eco env Probe mittels der Southern Blot Analyse auf Hinweise für monoklonal rearrangierte Gene bzw. monoklonale Integration des Retrovirus untersucht. IgH-Rearrangierungen wurden in 29 Fällen untersucht. Die Mäuse gehörten drei verschiedenen Versuchsgruppen an. Bei 28 von 29 Fällen lag ein polyklonales Muster vor. In einem Fall war eine Auswertung nicht möglich. Von 54 mit der Igk-Probe analysierten Fällen (sechs Versuchsgruppen) waren 19 monoklonal und 35 lieferten ein polyklonales Muster. In fünf Fällen wurden, zusätzlich zu den monoklonal getesteten Lymphknoten, Milzen untersucht. Die Zellpopulationen in der Milz waren in drei Fällen polyklonal und in zwei Fällen monoklonal (Abb. 16). Untersuchungen proviraler Integrationen im zellulären Genom ergaben in 43 von 49 Fällen ein Muster, welches auf eine oligoklonale Zellpopulation hinwies. Darunter waren die 14 Fälle, die bei der Igk-Analyse ein monoklonales Muster ergaben. Ein Tumor wies ein monoklonales Muster einer Retrovirusintegration auf, zwei weitere Fälle waren polyklonal; in drei Fällen war keine Auswertung möglich.

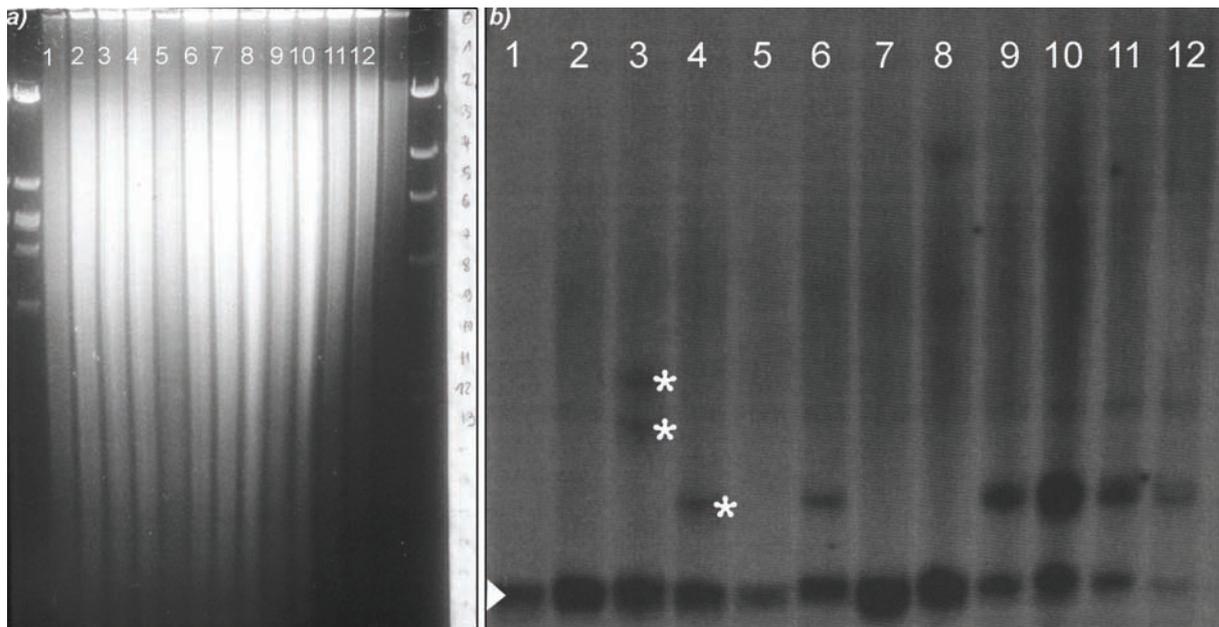


Abbildung 16: Elektrophoresegel HindIII-behandelter genomischer DNA und Igκ-Hybridisierungsmuster der geblotteten Membran von Plasmozytomen

a) Optimaler Verdau der DNA mit HindIII führt zu einer sehr großen Anzahl vieler verschieden großer DNA-Fragmente, die sich nach der Gelelektrophorese als sehr lange DNA-Spur darstellen. **b)** Repräsentatives Hybridisierungsmuster mit der Igκ-Sonde. Auf der hybridisierten Membran sind deutlich die Keimbahnbanden in der Größe von ca. 2750 bp (weißes Dreieck) bei allen Proben zu erkennen. (Spur eins: Kontrollleber; Spur zwei: Kontrollmilz). Die zwei mit einem Stern markierten Banden in der Spur drei sprechen für eine biallelische Monoklonalität. (Milz, Tumor 03/291, Plasmozytom). Im Lymphknoten desselben Tieres lag eine andere monoklonale Zellpopulation vor. (Spur vier, Tumor 03/291, Plasmozytom).

3.2.2 PCR mit anschließender Fragmentanalyse

Beispiele der Fragmentanalyse der verschiedenen Tumorarten sind der Abbildung 17 zu entnehmen. Es wurden insgesamt 71 Fälle mittels PCR und anschließender Fragmentanalyse untersucht. Von 43 auswertbaren Fällen ergab die Fragmentanalyse 28 polyklonale, drei oligoklonale und 12 monoklonale Elektropherogramm-Muster (sechs große und sechs kleine monoklonale Zellpopulationen). In 28 Fällen ist es nicht gelungen mittels PCR eine ausreichend große Menge an auswertbaren Fragmenten zu erzielen (relative Fluoreszenzeinheiten <150).

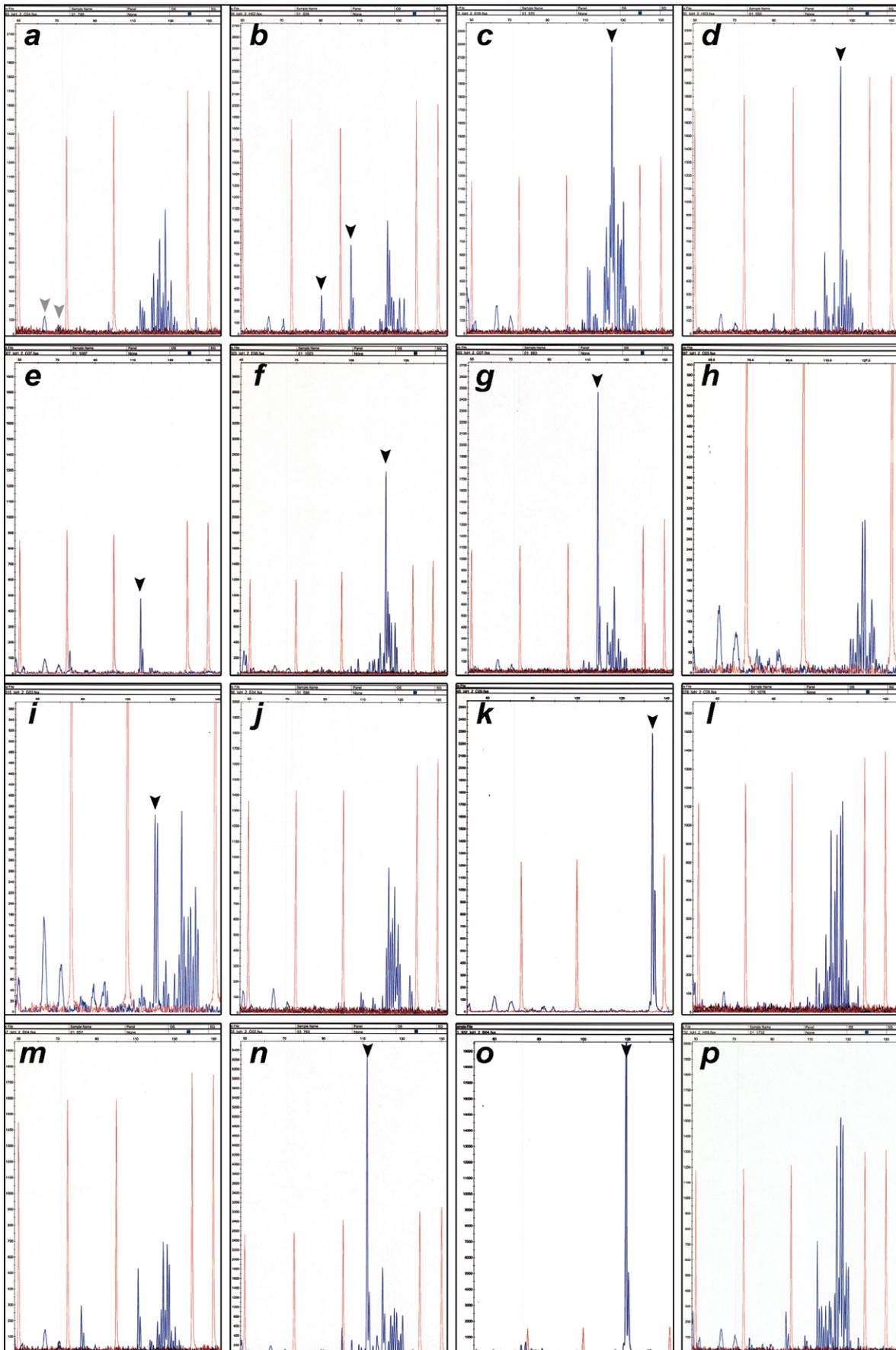


Abbildung 17: Elektropherogramm-Beispiele von retrovirusinduzierten Tumoren der Maus

Entlang der Abszisse ist die Fragmentgröße (50 bis 150 bp) aufgetragen. Die erwartete Größe für die IgH-Genfragmente lag bei 90 bis 140 bp. Entlang der Ordinate sind die relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) (mindestens bis 500) angegeben. Der auswertbare Bereich liegt zwischen 150 und 10.000 rfu. FAM-6 fluoresziert blau. Der eingesetzte Größenstandard LIZ 500 fluoresziert orange. **a**, Plasmozytom; Elektropherogramm mit polyklonalem Muster, graue Pfeilköpfe zeigen auf Primerdimere (Tumor 01/785, Gruppe Akv1-99 mNF1mut2) **b**, Plasmozytom mit großzelliger Komponente; oligoklonales Muster, zwei Gipfel stehen weit auseinander; die schwarzen Pfeilköpfe zeigen auf die Peaks (Tumor 01/539, Gruppe Akv1-99 mNF1mut2). **c**, Plasmozytom; schwach monoklonaler Gipfel vor einem polyklonalen Hintergrund. Peak hat noch nicht die dreifache Fluoreszenzeinheit wie der polyklonale Hintergrund, sodass er als nur schwach monoklonal beschrieben werden kann (Tumor 01/570, Gruppe Akv1-99 mE_{AS}). **d**, Plasmozytom mit großzelliger Komponente und dysplastischer Erythropoiese; monoklonaler Peak (Pfeilkopf) vor einem polyklonalen Hintergrund (Tumor 01/550, Gruppe Akv1-99 mNF1mut2). **e**, Plasmozytom mit großzelliger Komponente; einzelner monoklonaler Peak (Pfeilkopf) (Tumor 01/1007, Gruppe Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE}). **f**, Plasmozytom mit großzelliger Komponente; schwach monoklonaler Peak (Pfeilkopf) vor einem polyklonalen Hintergrund (Tumor 01/1023, Gruppe Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE}) **g**, Plasmozytom; monoklonaler Peak (Pfeilkopf) vor einem polyklonalen Hintergrund (Tumor 01/883, Gruppe Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE}). **h**, Plasmozytom mit großzelliger Komponente und dysplastischer Erythropoiese; polyklonales Muster (Tumor 01/697, Gruppe Akv1-99 mNF1mut2). **i**, Plasmozytom mit großzelliger Komponente; monoklonales Muster, Pfeilkopf zeigt auf die monoklonale Population (Tumor 01/1015, Gruppe Akv1-99 mNF1mut2). **j**, Follikuläres B-Zell-Lymphom; polyklonales Muster (Tumor 01/586, Gruppe Akv1-99 mEts). **k**, Plasmozytom und splenisches Marginalzonen-Lymphom; monoklonale Zellpopulation (Tumor 01/145, Gruppe Akv1-99). **l**, Plasmozytom mit dysplastischer Erythropoiese; polyklonales Muster (Tumor 01/1078, Gruppe Akv1-99 mE_{AS}). **m**, akute myeloische Leukämie; oligoklonales Muster; zwei isolierte Peaks am Rand der Gaußschen Verteilungskurve (Tumor 01/657, Gruppe Akv1-99 mNF1mut2). **n**, Plasmozytom; monoklonales Muster (Tumor 03/765, Gruppe Akv1-99 mE_{GRE}). **o**, Plasmozytom mit großzelliger Komponente, monoklonales Muster (Tumor 01/932, Gruppe Akv1-99 mEts). **p**, Kontrollmaus, polyklonales Muster.

3.3 Pathogenität von Akv und Akv-Mutanten

In dieser Studie wurde die Pathogenität des murinen Leukämievirus Akv λ -623 sowie von elf Akv-Mutanten (Deletionen und Mutationen an verschiedenen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Enhancerbereich) in 333 neugeborenen NMRI-Mäusen untersucht. Pro Gruppe wurden 10 bis 48 Mäuse analysiert. Die Kontrollgruppe umfasste 10 NMRI-Mäuse, denen virusfreier, zellfrei filtrierter Zellkulturüberstand *i.p.* appliziert wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte im Hinblick auf Tumorinzidenz, Latenzzeit und induziertes Tumorspektrum.

3.3.1 Akv λ -623

Die mit Akv λ -623 infizierte Gruppe umfasste 40 Mäuse. Die Tumorzinzidenz lag bei 100 % (40/40). Die mittlere Latenzzeit betrug 184 ± 26 Tage (Wertebereich: 144 bis 251 Tage). Von 40 Mäusen entwickelten 14 ein Plasmazytom (35 %), 13 ein großzelliges B-Zell-Lymphom (32,5 %), neun ein follikuläres B-Zell-Lymphom (22,5 %), zwei ein splenisches Marginalzonen-Lymphom (5 %) und zwei ein kleinzelliges B-Zell-Lymphom (5 %). Eine Übersicht über die Tumorzinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 18 dar.

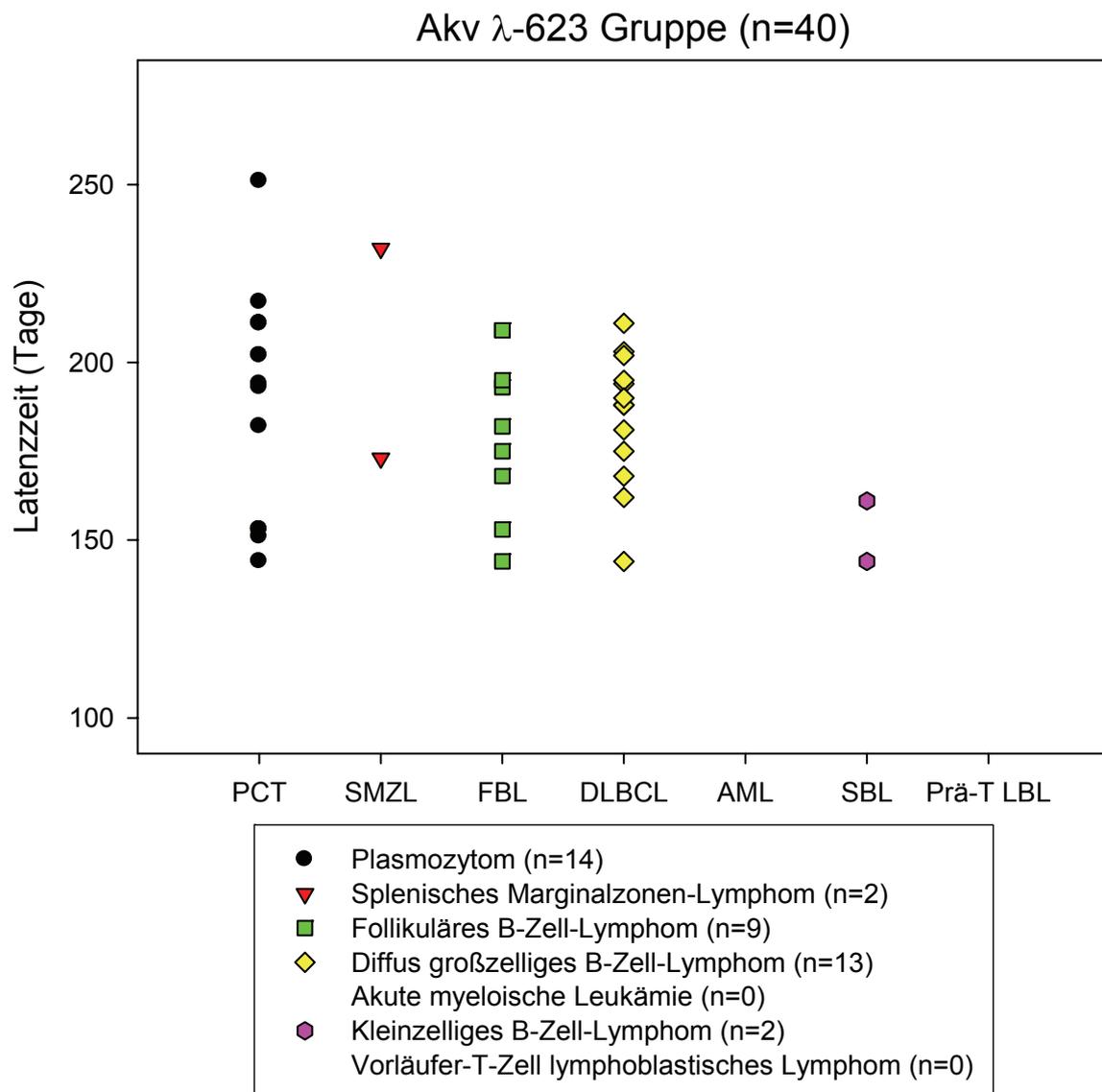


Abbildung 18: Pathogenität von Akv λ -623

3.3.2 Akv1-99

Die mit Akv1-99 infizierte Gruppe umfasste 48 Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 100 % (48/48). Die mittlere Latenzzeit betrug 180 ± 22 Tage (Wertebereich: 96 bis 230 Tage). Von 40 Mäusen entwickelten acht Mäuse zwei Neoplasien (16,7 %), 37 entwickelten ein Plasmazytom (77,1 %), neun ein großzelliges B-Zell-Lymphom (18,8 %) (eine in Kombination mit einem Plasmazytom), vier ein splenisches Marginalzonen-Lymphom (8,3 %) in Kombination mit einem Plasmazytom, drei ein follikuläres B-Zell-Lymphom (6,3 %) (eine in Kombination mit einem Plasmazytom), eine ein kleinzelliges B-Zell-Lymphom (2,1 %) in Kombination mit einem Plasmazytom sowie zwei ein Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom (4,2 %) (eine in Kombination mit einem Plasmazytom). Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 19 dar.

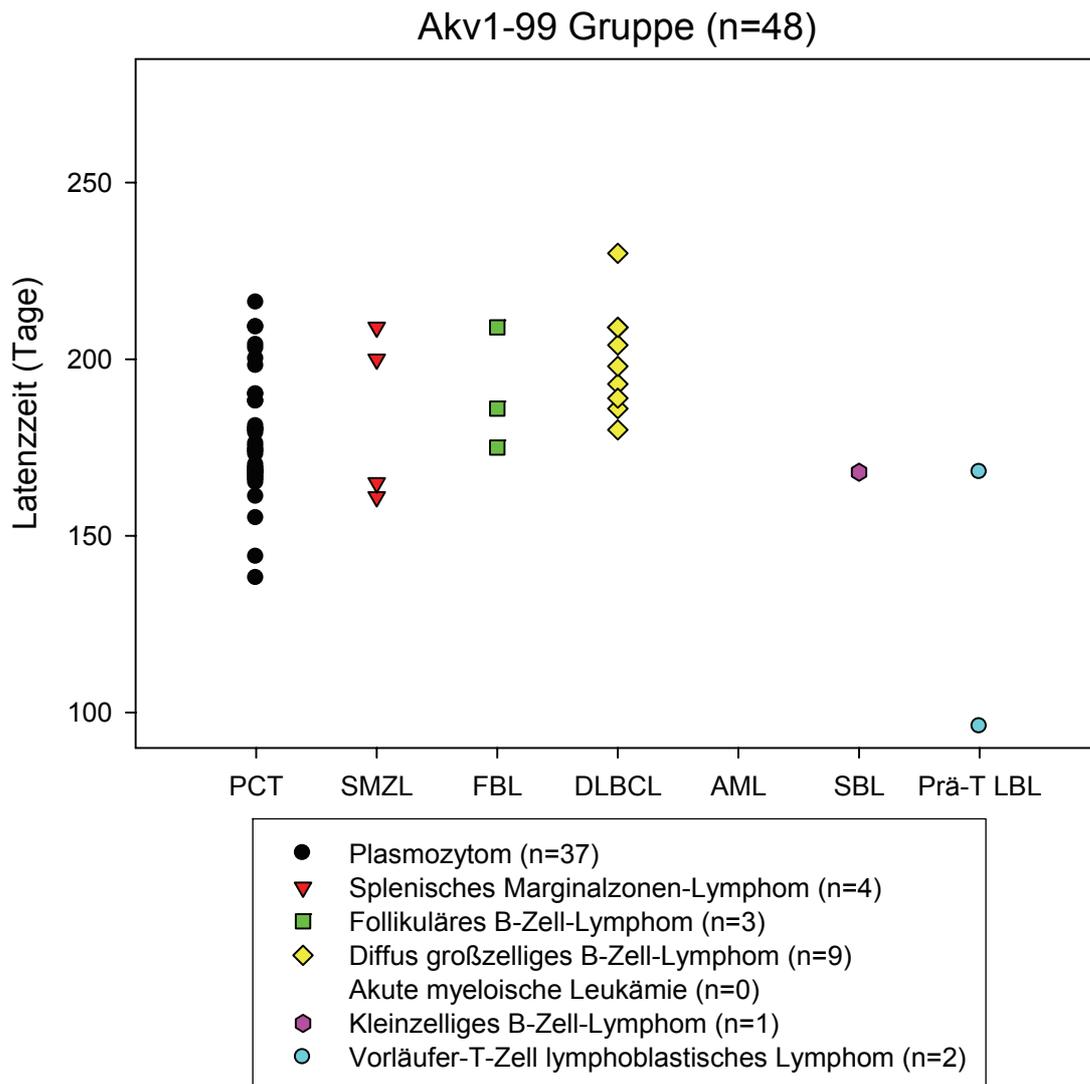


Abbildung 19: Pathogenität von Akv1-99

3.3.3 Akv1-99 mNF1mut2

Die mit Akv1-99 mNF1mut2 infizierte Gruppe umfasste 40 Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 100 % (40/40). Die mittlere Latenzzeit betrug 184 ± 29 Tage (Wertebereich: 127 bis 231 Tage). Von 40 Mäusen entwickelten zwei Mäuse zwei Neoplasien (5 %), 37 entwickelten ein Plasmazytom (92,5 %), zwei ein splenisches Marginalzonen-Lymphom (5 %) in Kombination mit einem Plasmazytom, eine Maus entwickelte ein großzelliges B-Zell-Lymphom (2,5 %) und eine ein kleinzelliges B-Zell-Lymphom (2,5 %). Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 20 dar.

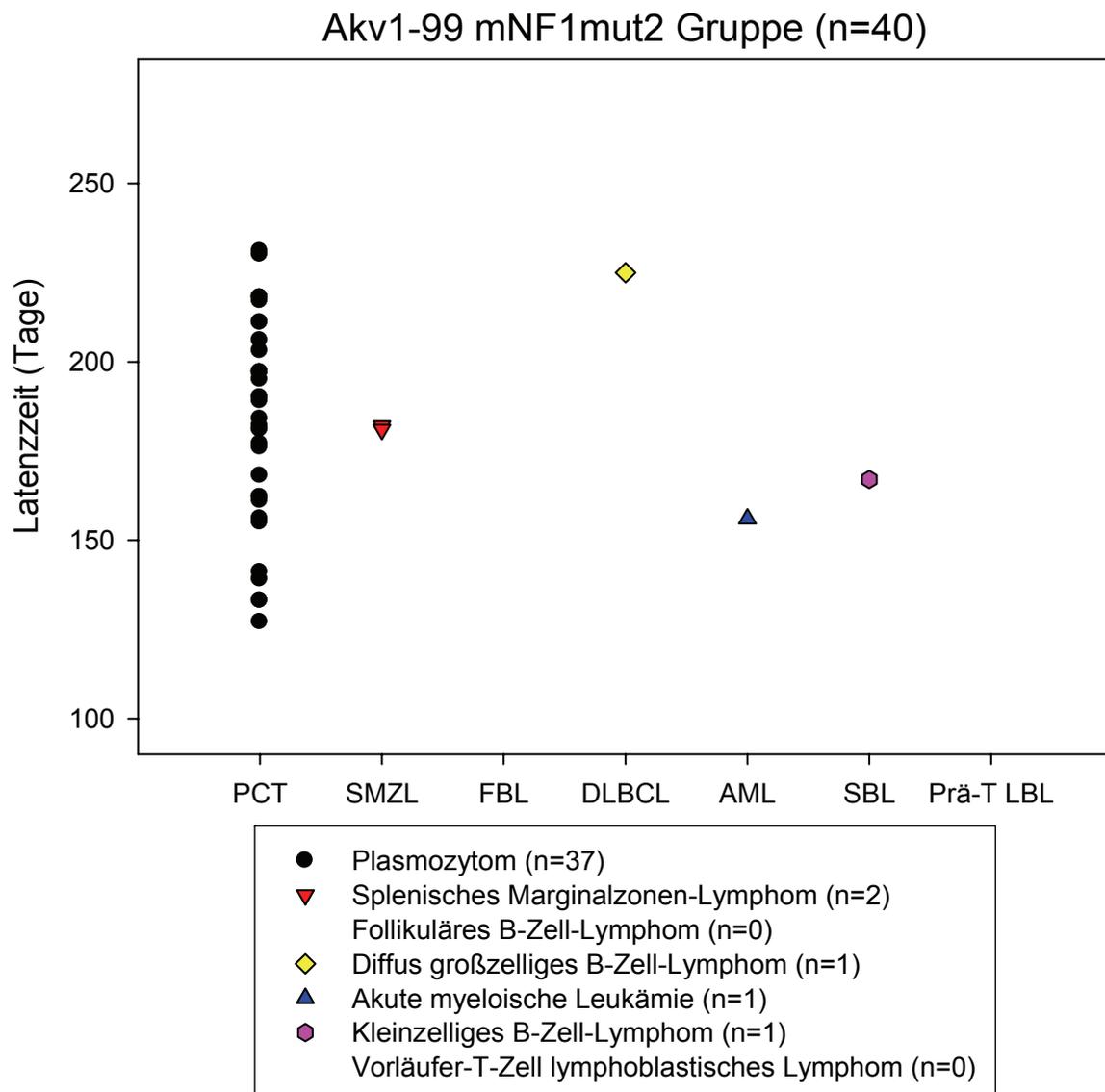


Abbildung 20: Pathogenität von Akv1-99 mNF1mut2

3.3.4 Akv1-99 mEts

Die mit Akv1-99 mEts infizierte Gruppe umfasste 43 Mäuse. Die Tumorzinzidenz lag bei 100 % (43/43). Die mittlere Latenzzeit betrug 180 ± 27 Tage (Wertebereich: 118 bis 231 Tage). Insgesamt wurde in 34 von 43 Fällen (79,1 %) die Diagnose "Plasmozytom mit großzelliger Komponente" gestellt. Von 43 Mäusen entwickelte eine Maus zwei Neoplasien (2,3 %); 41 entwickelten ein Plasmozytom (95,3 %), zwei ein follikuläres B-Zell-Lymphom (4,7 %) und eine Maus erkrankte zusätzlich zu einem Plasmozytom an einem splenischen Marginalzonen-Lymphom (2,3 %). Bei allen Plasmozytomen handelte es sich um "Plasmozytome mit großzelliger Komponente". Eine Übersicht über die Tumorzinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 21 dar.

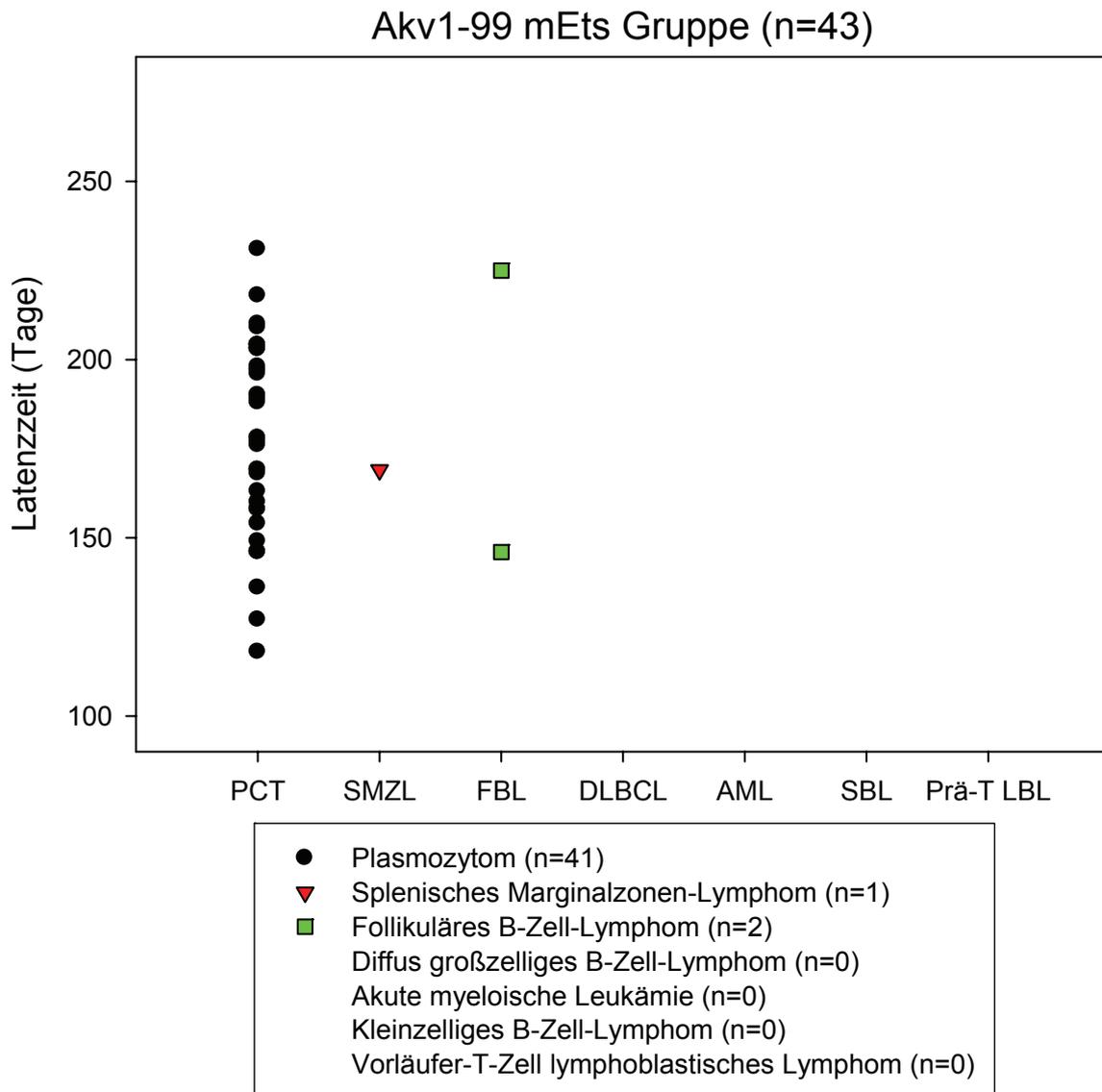


Abbildung 21: Pathogenität von Akv1-99 mEts

3.3.5 Akv1-99 mE_{GRE}

Die mit Akv1-99 mE_{GRE} infizierte Gruppe umfasste zehn Mäuse. Die Tumorzinzidenz lag bei 100 % (10/10). Die mittlere Latenzzeit betrug 158 ± 25 Tage (Wertebereich: 131 bis 194 Tage). Von zehn Mäusen entwickelten zwei Mäuse zwei Neoplasien (20 %), zehn entwickelten ein Plasmazytom (100 %) und zwei eine akute myeloische Leukämie in Kombination mit einem Plasmazytom (20 %). Eine Übersicht über die Tumorzinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 22 dar.

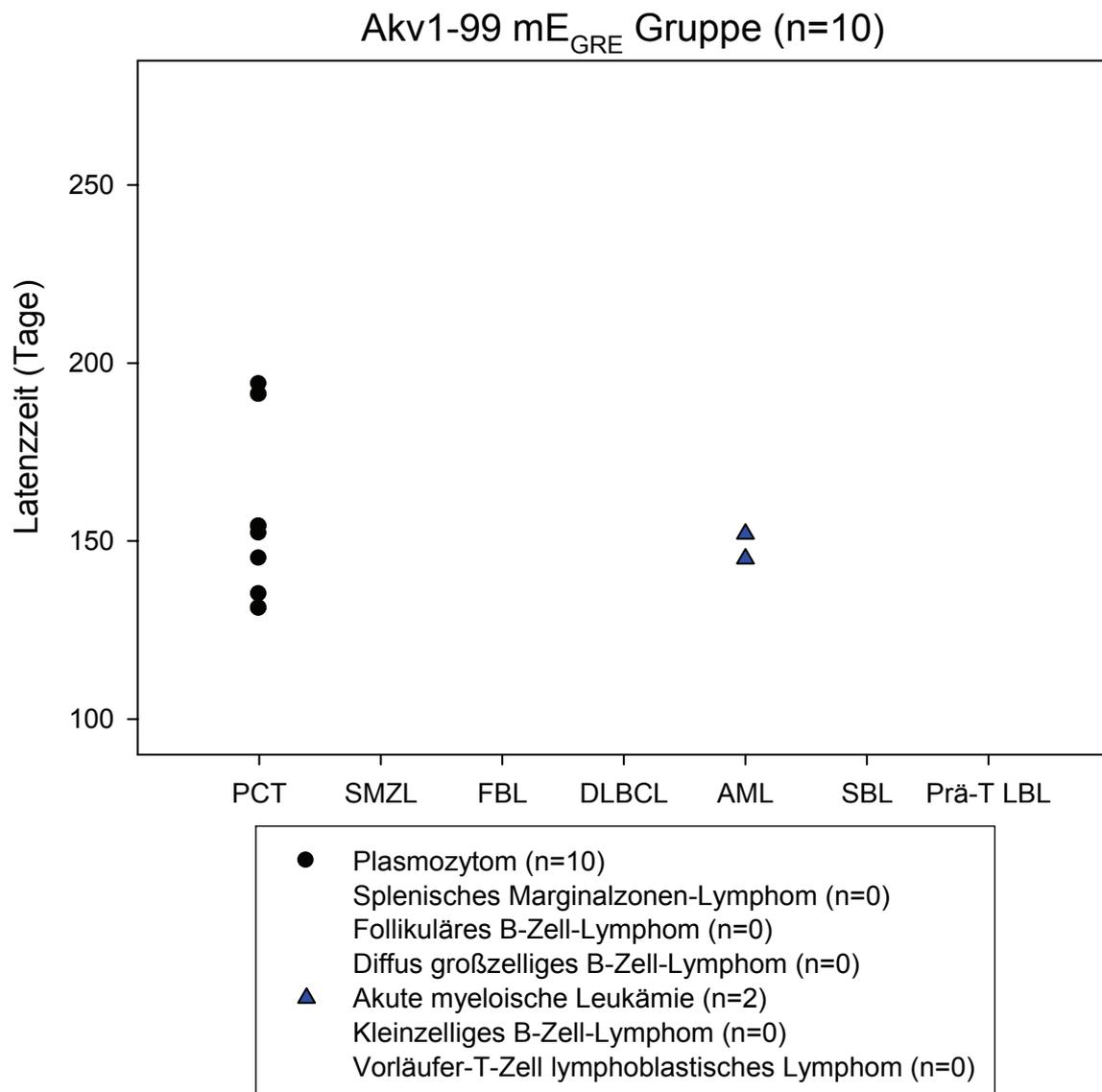


Abbildung 22: Pathogenität von Akv1-99 mE_{GRE}

3.3.6 Akv1-99 mGR

Die mit Akv1-99 mGR infizierte Gruppe umfasste zehn Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 100 % (10/10). Die mittlere Latenzzeit betrug 149 ± 30 Tage (Wertebereich: 107 bis 182 Tage). Von zehn Mäusen entwickelte eine Maus zwei Neoplasien (10 %), zehn entwickelten ein Plasmazytom (10 %) und eine Maus ein splenisches Marginalzonen-Lymphom (10 %) in Kombination mit einem Plasmazytom. Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 23 dar.

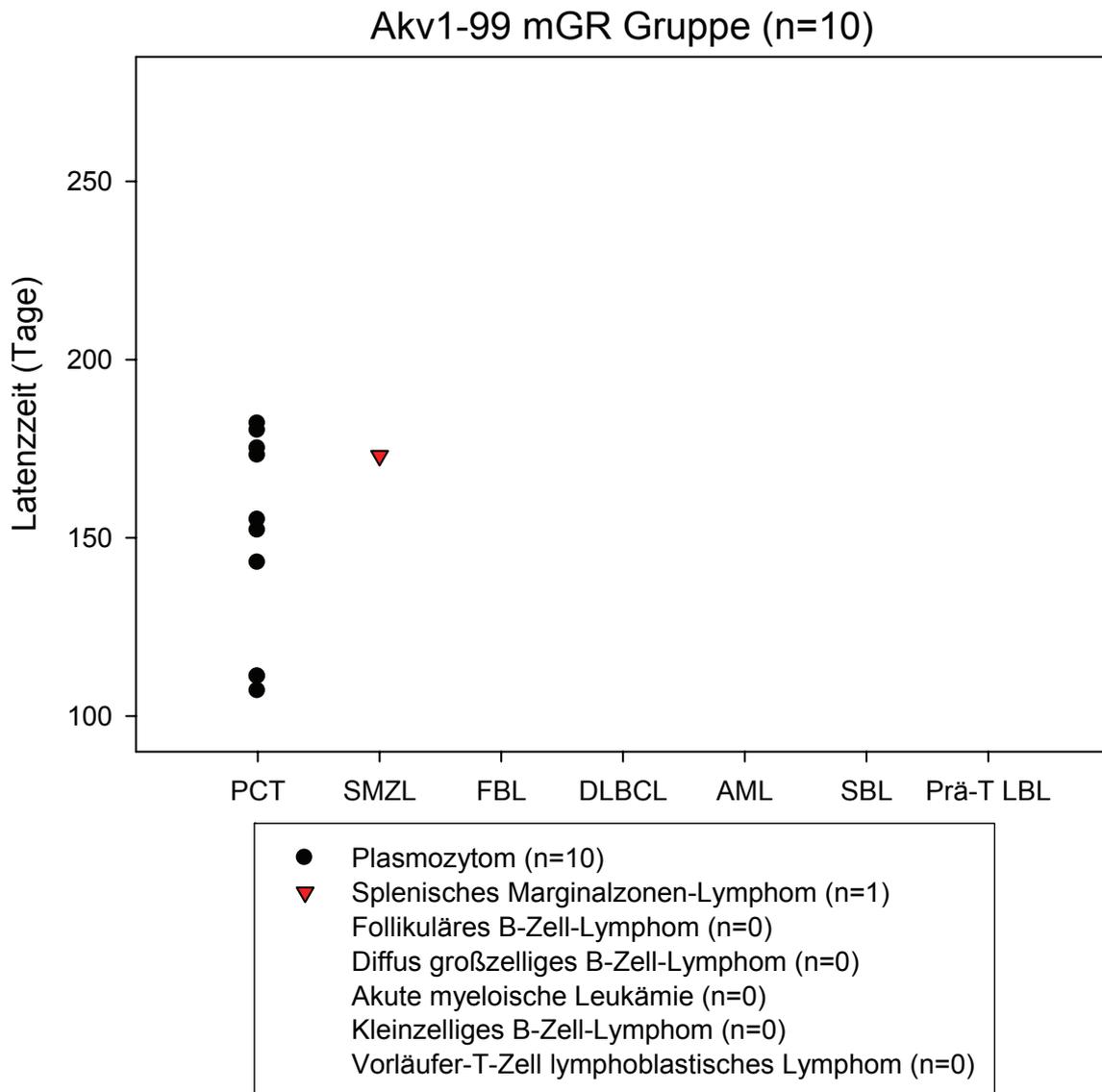


Abbildung 23: Pathogenität von Akv1-99 mGR

3.3.7 Akv1-99 mE_{A/S}

Die mit Akv1-99 mE_{A/S} infizierte Gruppe umfasste 47 Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 97,9 % (46/47). Die mittlere Latenzzeit betrug 165 ± 23 Tage (Wertebereich: 93 bis 196 Tage). Von 47 Mäusen entwickelten drei Mäuse zwei Neoplasien (6,4 %). Bei 46 Mäusen (97,9 %) lag ein Plasmazytom vor. Zwei dieser Mäuse hatten zusätzlich ein splenisches Marginalzonen-Lymphom (4,3 %) und eine Maus entwickelte zusätzlich ein Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom (2,1 %). Bei 26 von 46 Plasmazytomen (56,5 %) handelte es sich um "Plasmazytome mit großzelliger Komponente". Bei einer Maus (2,1 %) konnte histologisch der Tumorverdacht nicht bestätigt werden. Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 24 dar.

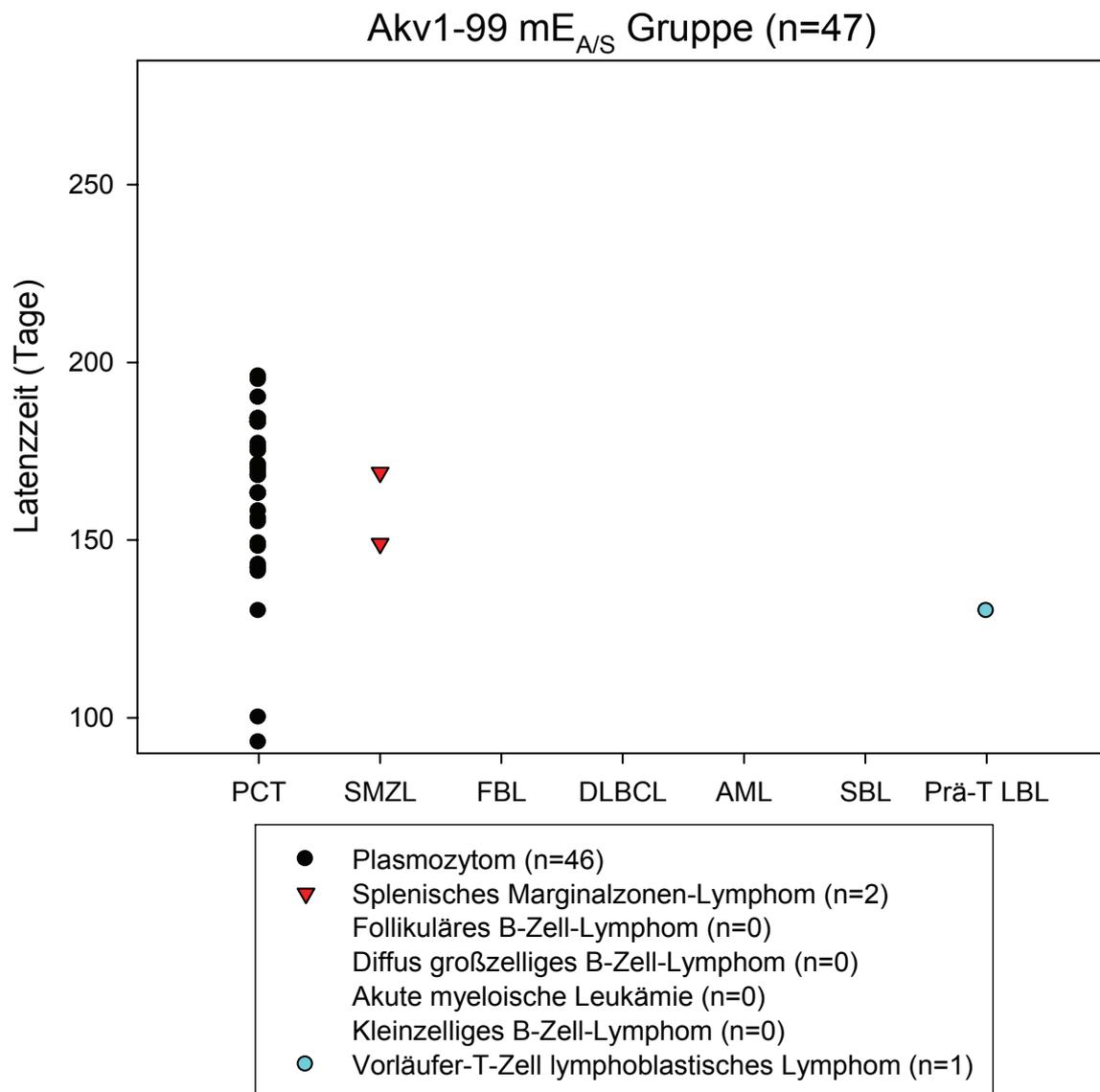


Abbildung 24: Pathogenität von Akv1-99 mE_{A/S}

3.3.8 Akv1-99 mE_{A/S}+mGR

Die mit Akv1-99 mE_{A/S}+mGR infizierte Gruppe umfasste zehn Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 100 % (10/10). Die mittlere Latenzzeit betrug 149 ± 31 Tage (Wertebereich: 98 bis 182 Tage). Von zehn Mäusen entwickelte eine Maus zwei Neoplasien (10 %). Alle Mäuse hatten ein Plasmozytom (100 %). Bei einer Maus fand sich zusätzlich ein splenisches Marginalzonen-Lymphom (10 %). Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 25 dar.

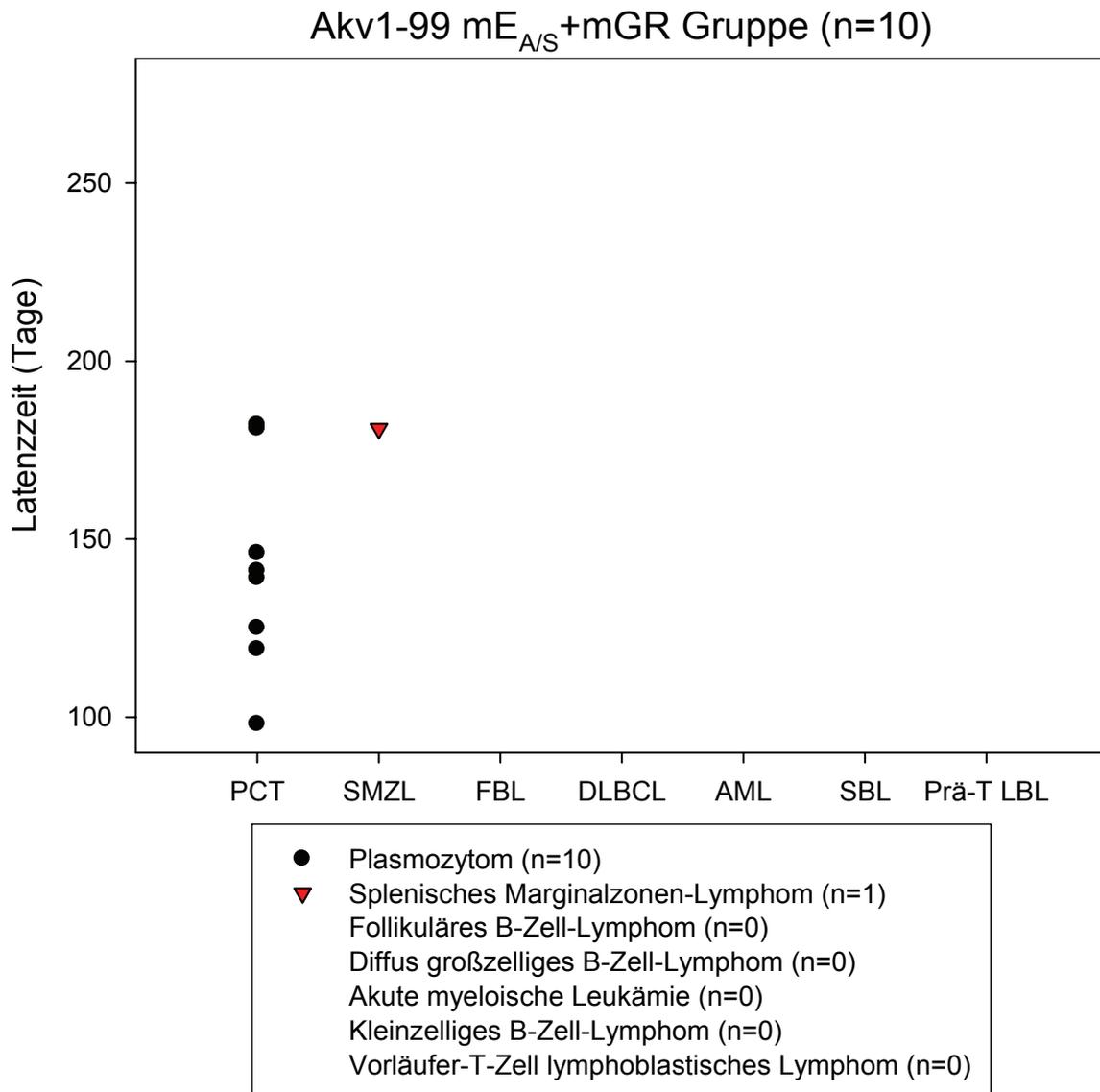


Abbildung 25: Pathogenität von Akv1-99 mE_{A/S}+mGR

3.3.9 Akv1-99 mE_{A/S}+mE_{GRE}

Die mit Akv1-99 mE_{A/S}+mE_{GRE} infizierte Gruppe umfasste zehn Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 90 % (9/10). Die mittlere Latenzzeit betrug 193 ± 50 Tage (Wertebereich: 93 bis 244 Tage). Von zehn Mäusen entwickelten neun ein Plasmozytom (90 %). Bei einer Maus (10 %) konnte histologisch der Tumorverdacht nicht bestätigt werden. Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 26 dar.

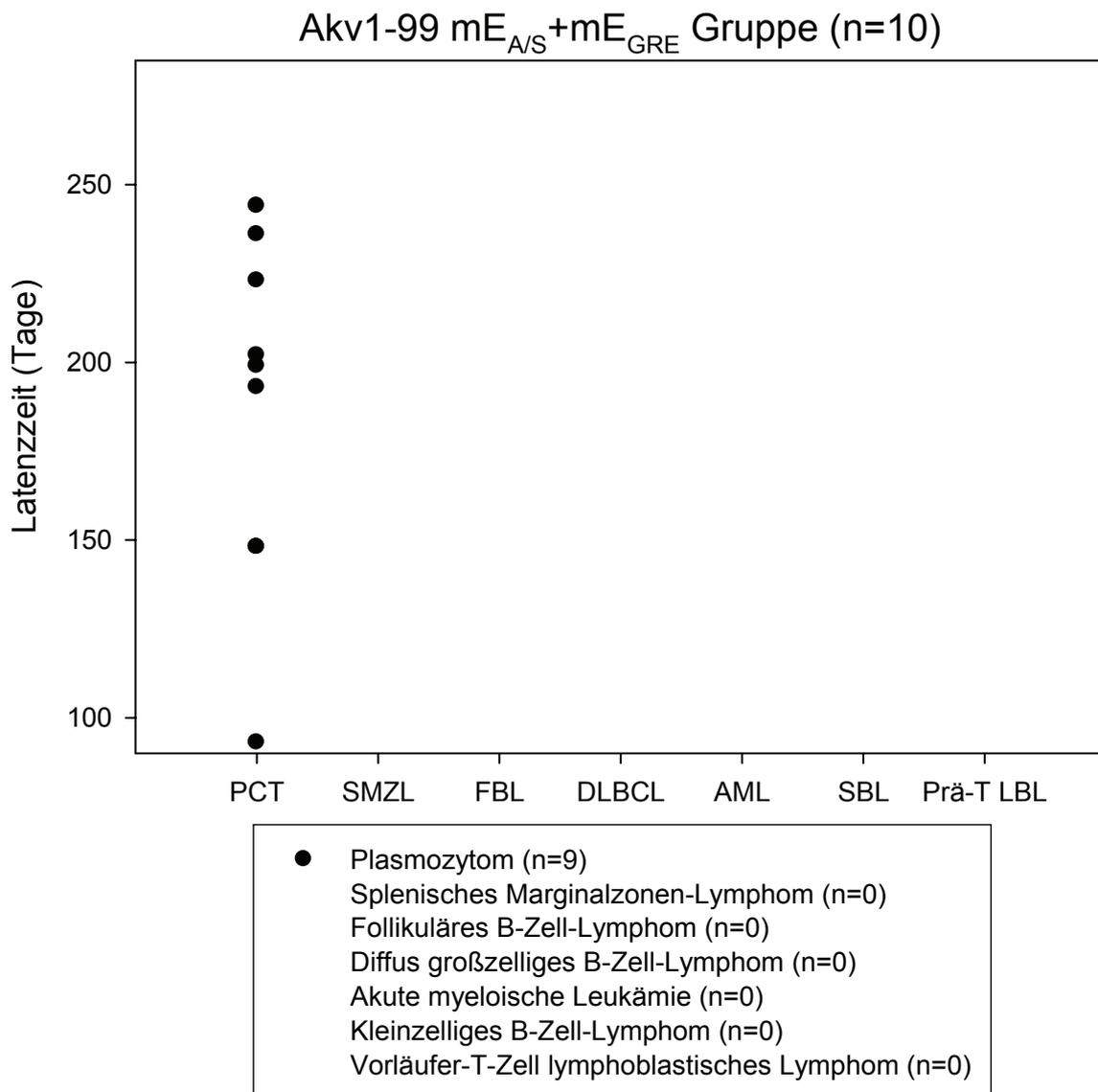


Abbildung 26: Pathogenität von Akv1-99 mE_{A/S}+mE_{GRE}

3.3.10 Akv1-99 mRUNX1

Die mit Akv1-99 mRUNX1 infizierte Gruppe umfasste zehn Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 90 % (9/10). Die mittlere Latenzzeit betrug 153 ± 27 Tage (Wertebereich: 113 bis 186 Tage). Von zehn Mäusen entwickelten neun ein Plasmozytom (90 %). Bei einer Maus (10 %) konnte histologisch der Tumorverdacht nicht bestätigt werden. Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 27 dar.

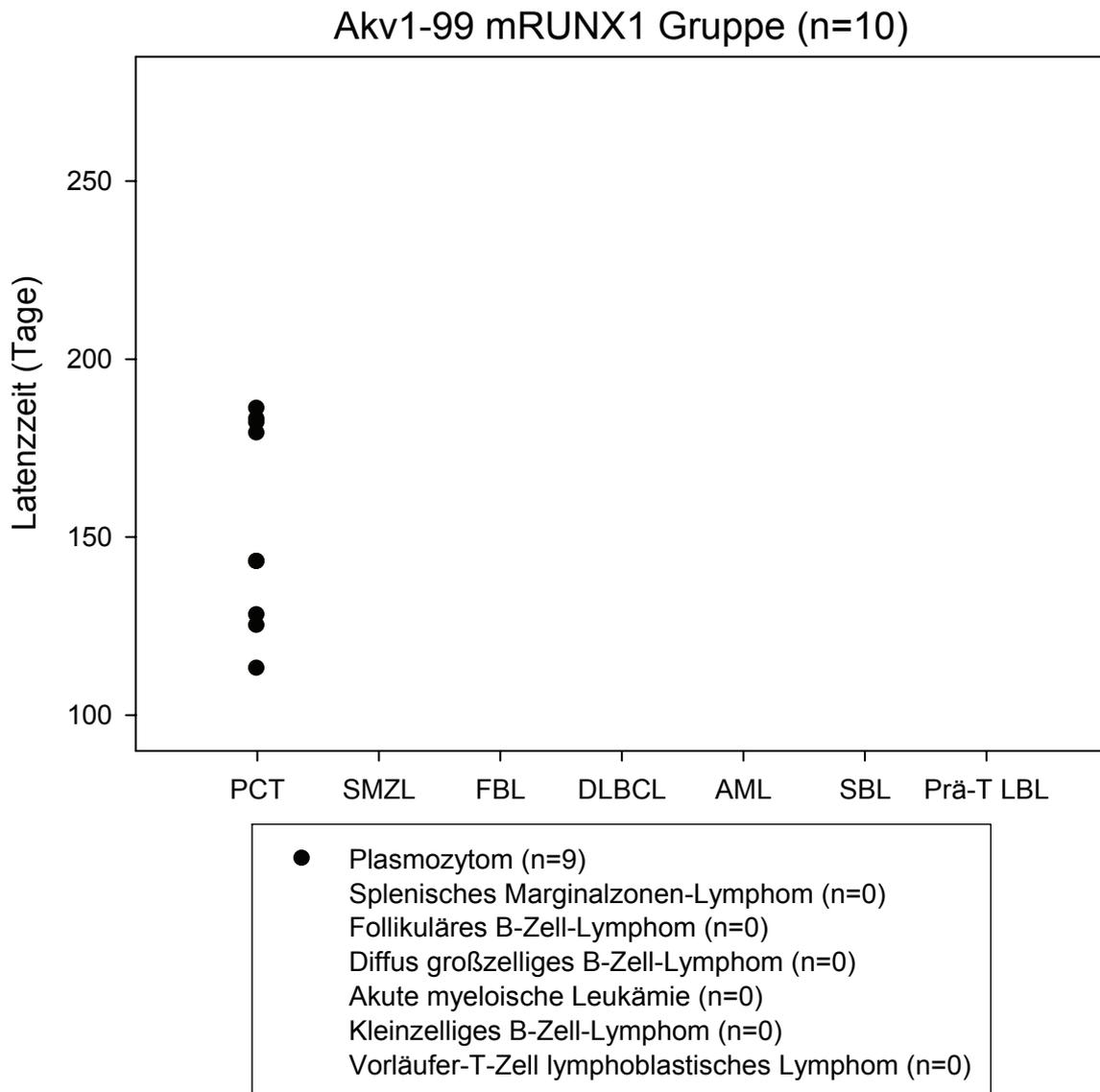


Abbildung 27: Pathogenität von Akv1-99 mRUNX1

3.3.11 Akv1-99 mRUNX1+mGR

Die mit Akv1-99 mRUNX1+mGR infizierte Gruppe umfasste zehn Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 100 % (10/10). Die mittlere Latenzzeit betrug 172 ± 39 Tage (Wertebereich: 121 bis 226 Tage). Von zehn Mäusen entwickelte eine Maus zwei Neoplasien (10 %), zehn entwickelten ein Plasmazytom (100 %) und eine Maus eine akute myeloische Leukämie (10 %) in Kombination mit einem Plasmazytom. Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 28 dar.

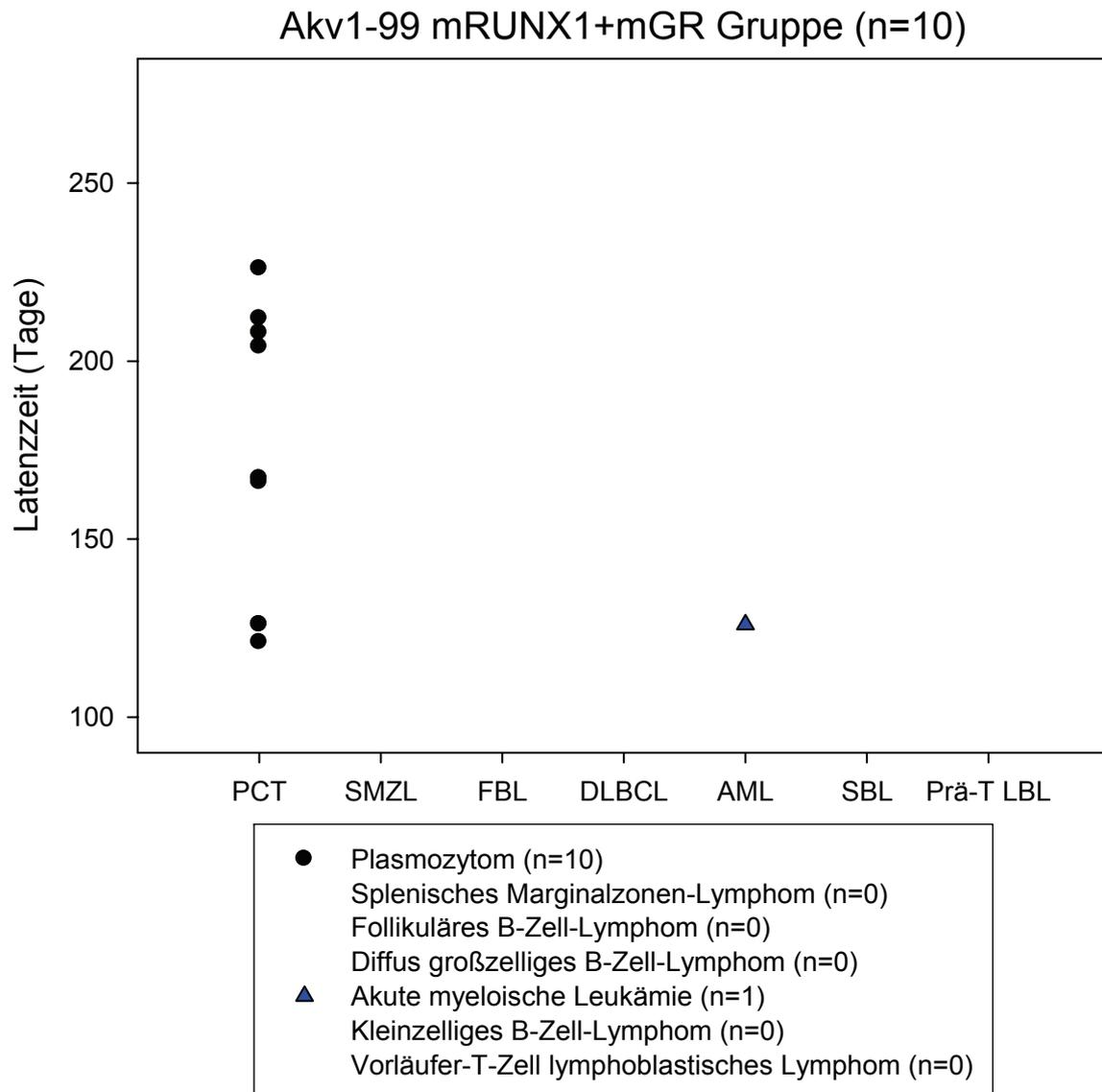


Abbildung 28: Pathogenität von Akv1-99 mRUNX1+mGR

3.3.12 Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE}

Die mit Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE} infizierte Gruppe umfasste 45 Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 97,8 % (44/45). Die mittlere Latenzzeit betrug 199 ± 35 Tage (Wertebereich: 97 bis 244 Tage). Von 45 Mäusen entwickelten 43 ein Plasmozytom (95,6 %) und eine ein follikuläres B-Zell-Lymphom (2,2 %). Bei einer Maus (2,2 %) konnte histologisch der Tumorverdacht nicht bestätigt werden. Eine Übersicht über die Tumorinzidenz, Latenzzeiten und das Tumorspektrum stellt Abbildung 29 dar.

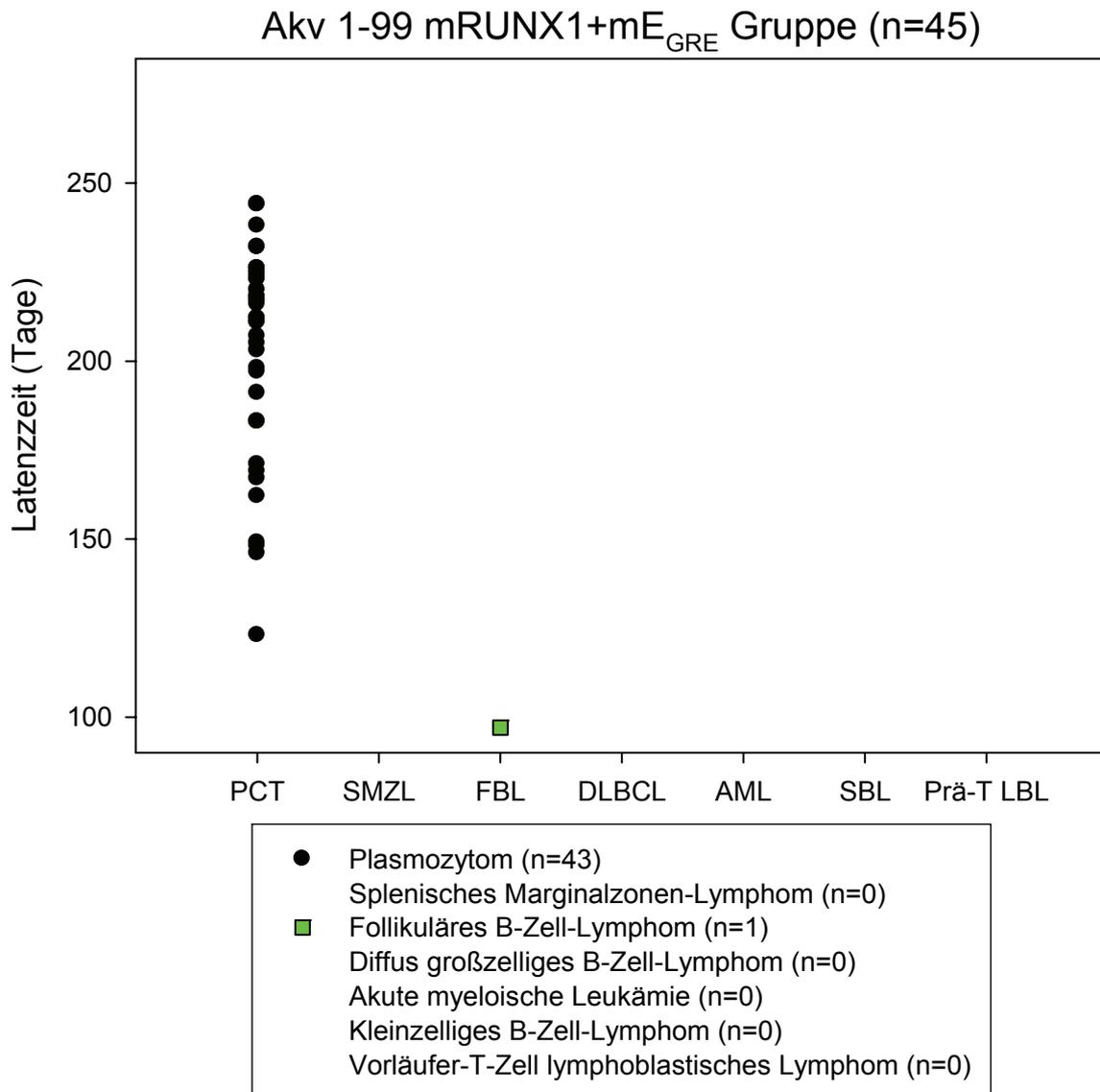


Abbildung 29: Pathogenität von Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE}

3.3.13 Kontrollgruppe

Die nicht infizierte Gruppe umfasste zehn Mäuse. Die Tumorinzidenz lag bei 40 % (4/10). Keine der Mäuse wurde aufgrund der Verdachtsdiagnose "Lymphom" getötet. Das Töten erfolgte zu drei festgelegten Zeitpunkten (108, 167 und 258 Tage). Von zehn Mäusen entwickelten drei ein Plasmozytom (30 %) und eine ein frühes Stadium eines splenischen Marginalzonen-Lymphoms mit dysplastischer Erythropoiese (10 %). Bei den Mäusen mit der Diagnose "Plasmozytom" waren zwei Lymphknoten und der Thymus deutlich vergrößert (6-20 mm bzw. 9-12 mm). Die Milzen der Mäuse aus der Kontrollgruppe waren bei allen Mäusen <25 mm. Bei sechs Mäusen (60 %) lag histologisch kein Tumor vor. Eine Übersicht über die Befunde in der Kontrollgruppe stellt Abbildung 30 dar.

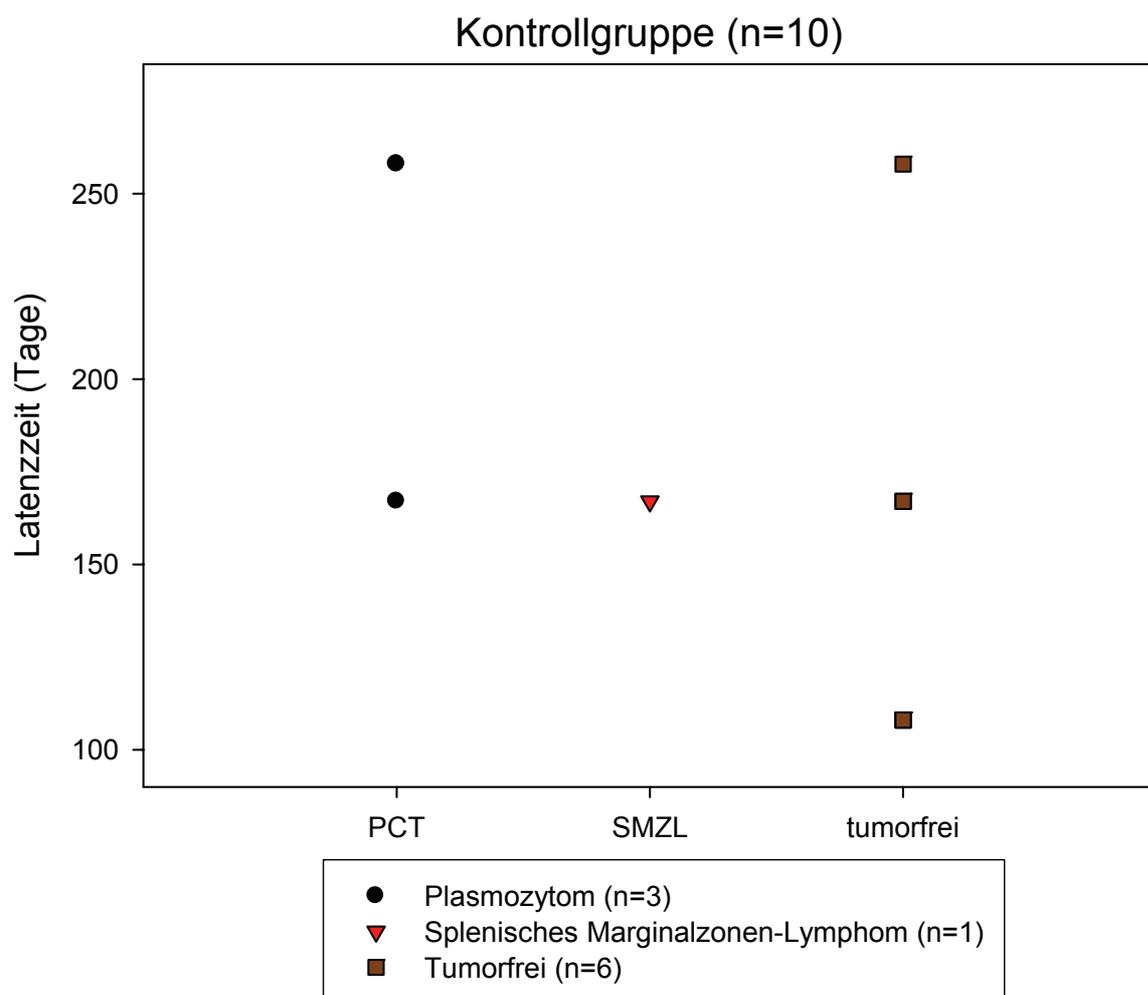


Abbildung 30: Befunde bei Kontrollmäusen

Mäuse, die getötet wurden, bei denen aber histologisch kein Tumor bestätigt werden konnte, würden bei einer statistischen Auswertung der Latenzzeiten das Bild verzerren. Folglich wurde die Lebensdauer von histologisch tumorfreien Mäusen zensiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand ein signifikanter Unterschied sowohl zur Akv λ -623 Gruppe ($p < 0,01$) als auch zur Akv1-99 Gruppe ($p < 0,01$) (Abb. 31). Die Gruppen Akv1-99 mE_{AVS}+mE_{GRE} und Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE} waren die einzigen mit deutlich längerer mittlerer und medianer Latenzzeit als die Gruppe Akv1-99. Mit dem Log-Rank-Test wurde berechnet, ob sich diese beiden Gruppen trotzdem noch von der Kontrollgruppe in ihrer Überlebenszeit unterschieden. Für die Gruppe Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE} konnte ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p < 0,01$). Für die Gruppe Akv1-99 mE_{AVS}+mE_{GRE} war das Ergebnis nicht signifikant ($p > 0,05$).

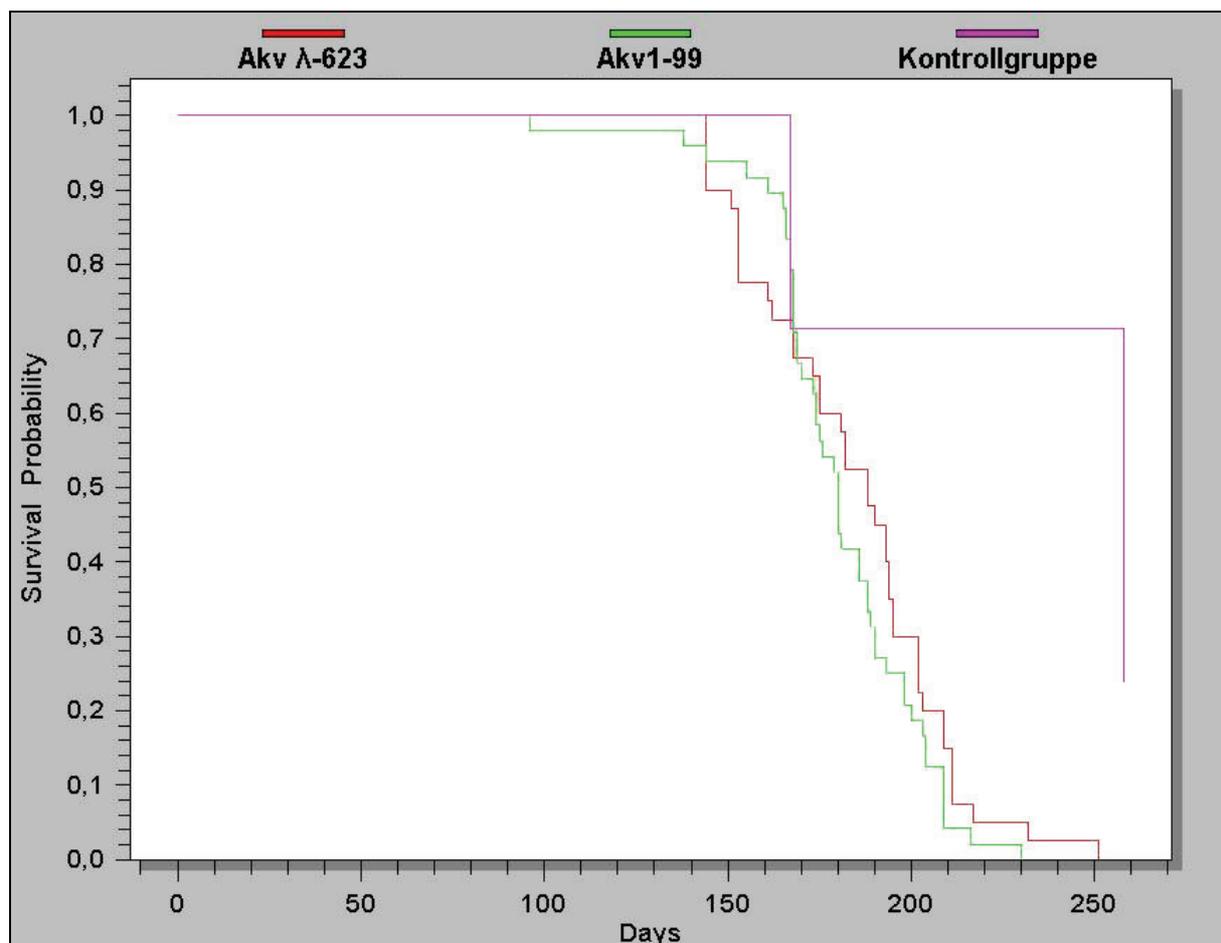


Abbildung 31: Überlebenswahrscheinlichkeit von Kontrollmäusen, Akv λ -623- und Akv1-99-infizierten Mäusen

Mäuse beider Virusgruppen wiesen bezüglich ihrer Überlebenszeit signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Mäusen der Kontrollgruppe auf (Log-Rank-Test: $p < 0,05$).

3.3.14 Zusammenfassung

3.3.14.1 Pathogenität von Akv λ -623 und Akv1-99

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb. 31) zeigt eine nahezu identische Überlebenswahrscheinlichkeit von Mäusen die mit Akv λ -623 und mit Akv1-99 infiziert worden sind (Mann-Whitney-Test: $p > 0,5$). Für die weiteren Berechnungen der Tumorlatenzzeiten wurden die Virusmutanten gegen das Akv1-99 verglichen.

3.3.14.2 Mutationen von Akv und Änderungen des Tumorspektrums

In Tabelle 3 sind die Befunde den entsprechenden Virusgruppen zugeordnet. Abbildung 32 verdeutlicht die Tumorverteilung innerhalb der einzelnen Gruppen anhand von Kuchendiagrammen. Die Vielfältigkeit der Tumore die durch Akv λ -623 und Akv1-99 induziert worden waren, war nur noch ansatzweise bei der Mutante Akv1-99 mNF1mut2 zu erkennen. Alle anderen Mutanten verloren die Fähigkeit, neben Plasmazytomen auch diffus großzellige B-Zell-Lymphome und kleinzellige B-Zell-Lymphome zu induzieren. Die Häufigkeit, mit der Plasmazytome induziert worden waren, stieg von 35 % bei Akv λ -623 über 77,1 % bei Akv1-99 bis auf 90 bis 100 % bei den Mutanten an. Zwei Mutanten erzeugten auffällig viele "Plasmazytome mit großzelliger Komponente". Ein statistischer Vergleich zwischen dem Vorkommen dieser Plasmazytovariante bei Akv1-99 mE_{AS} sowie bei Akv1-99 mEts und der Gesamtheit aller diagnostizierten Plasmazytome mit großzelliger Komponente erfolgte mit dem Chi-Square-Test und ergab jeweils ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$). Vereinzelt kamen bei den Mutanten splenische Marginalzonen-Lymphome (Akv1-99 mNF1mut2: 2/40; Akv1-99 mEts: 1/43; Akv1-99 mGR: 1/10; Akv1-99 mE_{AS}: 2/47; Akv1-99 mE_{AS}+mGR: 1/10) und follikuläre B-Zell-Lymphome (Akv1-99 mEts: 2/43; Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE} 1/45) vor. Die Tumorzinzidenz lag bei Akv λ -623 und Akv1-99 bei 100 %. In den Mutantengruppen fiel sie teilweise auf 90 % ab. Im Beobachtungszeitraum von 258 Tagen blieben vier Mäuse aus vier Mutantengruppen histologisch tumorfrei (Akv1-99 mE_{AS}: 1/47; Akv1-99 mE_{AS}+mE_{GRE}: 1/10; Akv1-99 mRUNX1: 1/10; Akv1-99 mRUNX1+E_{GRE}: 1/45).

3.3.14.3 Induktion akuter myeloischer Leukämien und Vorläufer-T-Zell lymphoblastischer Lymphome durch Virusmutanten

Bei drei Versuchsgruppen wurden vereinzelt akute myeloische Leukämien klassifiziert (Akv1-99 mNF1mut2: 1/40; Akv1-99 mE_{GRE}: 2/10; Akv1-99 mRUNX1+mGR: 1/10). Diese wurden weder in der Gruppe Akv λ -623 noch bei Akv1-99 beobachtet. Das Vorläufer-T-Zell lymphoblastische Lymphom trat in den Gruppen Akv1-99 (2/48) und Akv1-99 mE_{AVS} (1/47) auf.

3.3.14.4 Induktion von Plasmozytomen mit zusätzlichen Tumoren durch Akv1-99

Bei 19 Mäusen entwickelten sich parallel zwei Tumore. Diese Tumorkombinationen traten stets mit einem Plasmozytom auf. In der mit Akv1-99 infizierten Gruppe waren insgesamt acht Mäuse betroffen. Darunter zeigten vier Mäuse, zusätzlich zum Plasmozytom, ein splenisches Marginalzonen-Lymphom, eine Maus ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, eine ein follikuläres B-Zell-Lymphom, eine ein kleinzelliges B-Zell-Lymphom sowie eine ein Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom. Ein splenisches Marginalzonen-Lymphom in Kombination mit einem Plasmozytom entwickelten noch fünf weitere Mäuse (eine aus der Gruppe Akv1-99 mEts, eine aus der Gruppe Akv1-99 mGR, zwei aus der Gruppe Akv1-99 mE_{AVS} und eine aus der Gruppe Akv1-99 mE_{AVS}+mGR). Von den insgesamt vier akuten myeloischen Leukämien, traten drei in Kombination mit Plasmozytomen auf. Zwei Mäuse gehörten der Gruppe Akv1-99 mE_{GRE} und eine der Gruppe Akv1-99 mRUNX1+mGR an. Bei einer Maus aus der Gruppe Akv1-99 mE_{AVS} trat zusätzlich zum Plasmozytom ein Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom auf.

Virus	Tumorinzidenz (%)							
	PCT	SMZL	FBL	DLBCL	AML	SBL	Prä-T LBL	Anzahl Mäuse mit zwei Neoplasien
Akv λ-623	35,0 (14/40)	5,0 (2/40)	22,5 (9/40)	32,5 (13/40)	-	5,0 (2/40)	-	-
Akv1-99	77,1 (37/48)	8,3 (4/48)	6,3 (3/48)	18,8 (9/48)	-	2,1 (1/48)	4,2 (2/48)	16,7 (8/48)
Akv1-99 mNF1mut2	92,5 (37/40)	5,0 (2/40)	-	2,5 (1/40)	2,5 (1/40)	2,5 (1/40)	-	5,0 (2/40)
Akv1-99 mEts	95,3 (41/43)	2,3 (1/43)	4,7 (2/43)	-	-	-	-	2,3 (1/43)
Akv1-99 mRUNX1	90,0 (9/10)	-	-	-	-	-	-	-
Akv1-99 mE _{GRE}	100,0 (10/10)	-	-	-	20,0 (2/10)	-	-	20,0 (2/10)
Akv1-99 mGR	100,0 (10/10)	10,0 (1/10)	-	-	-	-	-	10,0 (1/10)
Akv1-99 mRUNX1+mE _{GRE}	95,6 (43/45)	-	2,2 (1/45)	-	-	-	-	-
Akv1-99 mRUNX1+mGR	100,0 (10/10)	-	-	-	10,0 (1/10)	-	-	10,0 (1/10)
Akv1-99 mE _{A/S}	97,9 (46/47)	4,3 (2/47)	-	-	-	-	2,1 (1/47)	6,4 (3/47)
Akv1-99 mE _{A/S} +mE _{GRE}	90,0 (9/10)	-	-	-	-	-	-	-
Akv1-99 mE _{A/S} +mGR	100,0 (10/10)	10,0 (1/10)	-	-	-	-	-	10,0 (1/10)
Kontrollgruppe	30,0 (3/10)	10,0 (1/10)	-	-	-	-	-	-
Summe	83,8 (279/333)	4,2 (14/333)	4,5 (15/333)	6,9 (23/333)	1,2 (4/333)	1,2 (4/333)	0,9 (3/333)	5,7 (19/333)

Tabelle 3: Tumorinzidenz nach Infektion mit Akv und Akv-Mutanten bei NMRI-Mäusen

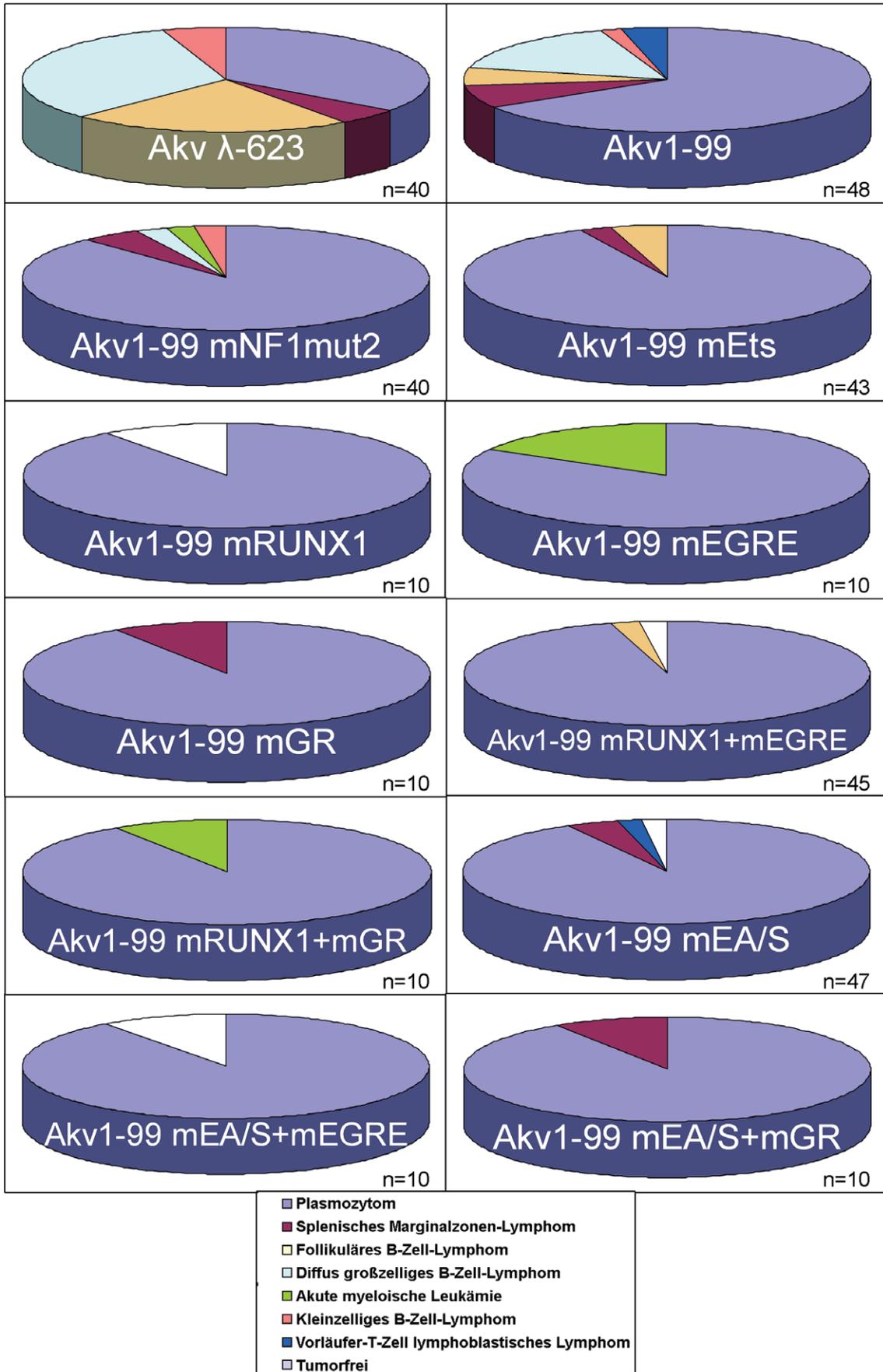


Abbildung 32: Tumorzinzidenz nach Infektion mit Akv und Akv-Mutanten bei NMRI-Mäusen

3.3.14.5 Virusmutanten mit eingeschränkter Tumorvielfalt und kürzerer Latenzzeit

Das Box Plot Diagramm (Abb. 33) zeigt die Tumorlatenzzeiten aller Virusgruppen. Die Virusmutanten Akv1-99 mGR, Akv1-99 mE_{A/S}+mGR, Akv1-99 mRUNX1, Akv1-99 mE_{GRE}, Akv1-99 mE_{A/S} und Akv1-99 RUNX1+mGR induzierten ein oder zwei verschiedene Tumore je Versuchsgruppe. Verglichen mit Akv1-99 waren die Latenzzeiten bei fünf Gruppen signifikant kürzer ($p < 0,05$). Bei Akv1-99 mRunx1+mGR lag kein signifikanter Unterschied vor (Tabelle 4).

Virusmutanten	angewandter statistischer Test	Vergleich gegen Akv1-99
Akv1-99 mGR	Mann-Whitney-Test	$p < 0,05$
Akv1-99 mE _{A/S} +mGR	Mann-Whitney-Test	$p < 0,05$
Akv1-99 mRUNX1	Log-Rank-Test	$p < 0,05$
Akv1-99 mE _{GRE}	Mann-Whitney-Test	$p < 0,05$
Akv1-99 mE _{A/S}	Log-Rank-Test	$p < 0,05$
Akv1-99 mRUNX1+mGR	Mann-Whitney-Test	$p = 0,47$

Tabelle 4: Vergleich der Tumorlatenz von sechs Virusmutanten mit kürzeren Latenzzeiten als Akv1-99

Die statistische Auswertung der Latenzzeiten erfolgte, je nachdem ob eine Datenzensur für tumorfreie Mäuse vorgenommen werden musste oder nicht, mit dem Log-Rank-Test oder mit dem Mann-Whitney-Test (siehe Seite 54).

3.3.14.6 Virusmutanten mit großer Tumorvielfalt und mittlerer Latenzzeit

Die Gruppen Akv1-99, Akv1-99 mEts, Akv λ -623 und Akv1-99 mNF1mut2 zeigten das größte Tumorspektrum (sechs Neoplasieformen bei der Gruppe Akv1-99, drei bei der Gruppe Akv1-99 mEts, fünf bei der Gruppe Akv λ -623 sowie fünf bei der Gruppe Akv1-99 mNF1mut2) und eine dem Akv1-99 vergleichbare mittlere Latenzzeit (Tabelle 5).

Virusmutanten	angewandter statistischer Test	Vergleich gegen Akv1-99
Akv1-99 mEts	Mann-Whitney-Test	p=0,98
Akv λ -623	Mann-Whitney-Test	p=0,52
Akv1-99 mNF1mut2	Mann-Whitney-Test	p=0,48

Tabelle 5: Vergleich der Tumorlatenz von drei Virusmutanten mit Akv1-99 entsprechenden Latenzzeiten

3.3.14.7 Virusmutanten mit eingeschränkter Tumervielfalt und längerer Latenzzeit

Die Gruppen Akv1-99 mE_{AVS}+mE_{GRE} und Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE} hatten im Vergleich mit Akv1-99 eine signifikant verlängerte Latenzzeit (Tabelle 6). In beiden Gruppen wurden fast ausschließlich Plasmazytome diagnostiziert (90 % resp. 95,6 %); in beiden Gruppen gab es jeweils eine Maus, bei der kein Tumor festgestellt wurde.

Virusmutanten	angewandter statistischer Test	Vergleich gegen Akv1-99
Akv1-99 mE _{AVS} +mE _{GRE}	Log-Rank-Test	p<0,05
Akv1-99 mRUNX1+mE _{GRE}	Log-Rank-Test	p<0,05

Tabelle 6: Vergleich der Tumorlatenz von zwei Virusmutanten mit längeren Latenzzeiten als Akv1-99

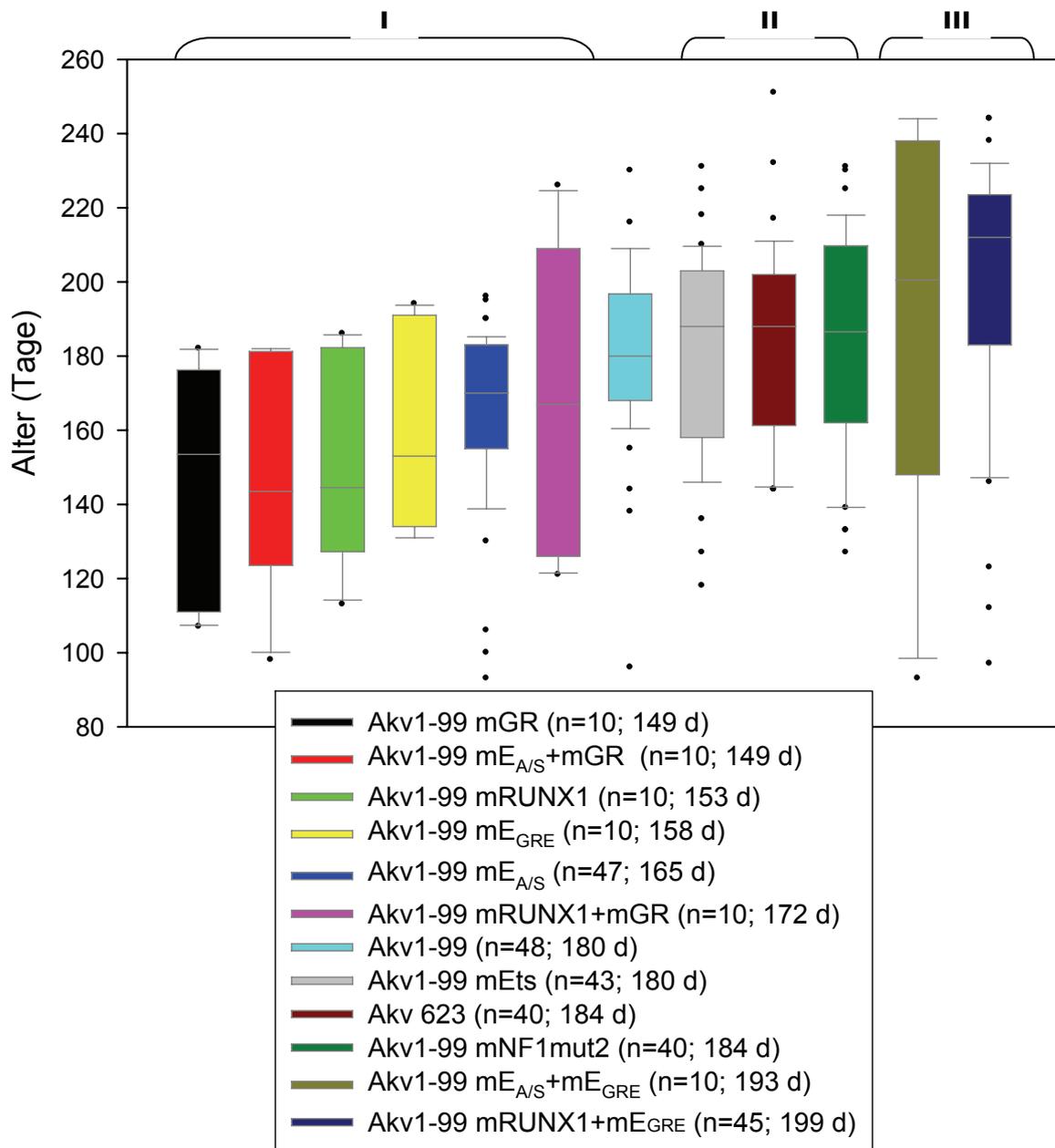


Abbildung 33: Tumorlatenzzeiten der einzelnen Versuchsgruppen

In der Legende ist in Klammern die Anzahl der Tiere pro Gruppe und die mittlere Latenzzeit in Tagen angegeben. Die Box Plots sind nach aufsteigender, mittlerer Latenzzeit aufgetragen. Die Boxen zeigen den Wertebereich der Latenzzeiten an, die für das erste bis dritte Quartil der Mäuse gilt. Die Hälfte aller Mäuse entwickelte innerhalb dieser Zeitspanne einen Tumor. Der Querbalken innerhalb einer Box gibt den Medianwert an. Es fällt auf, dass es sich bei fast allen Gruppen um schiefe Verteilungen handelt. Die Balken geben die Spanne der Minimal- bis Maximalwerte für die Latenzzeiten an. Werte, die nicht in die Verteilung passten, werden als Punkte dargestellt und als Ausreißer interpretiert. Nach diesem Diagramm verteilen sich die Virusmutanten auf die drei Gruppen I, II und III. Die ersten sechs Mutanten (Gruppe I) wiesen eine kürzere, mittlere und mediane Latenzzeit als Akv1-99 auf. Zwei Mutanten (Gruppe II) waren in ihrer Latenzzeit dem Akv1-99 sehr ähnlich. Zwei weitere Mutanten (Gruppe III) wiesen eine längere Latenzzeit als Akv1-99 auf.

3.3.14.8 Verlängerte Latenzzeit bei Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE}

Wie in Abbildung 34 dargestellt, hat die Akv1-99 mRunx1+mE_{GRE}-Gruppe eine signifikant längere Tumortalenzzeit als die beiden Akv1-99 mRUNX1- bzw. Akv1-99 mE_{GRE}-Gruppen (Log-Rank-Test: $p < 0,001$).

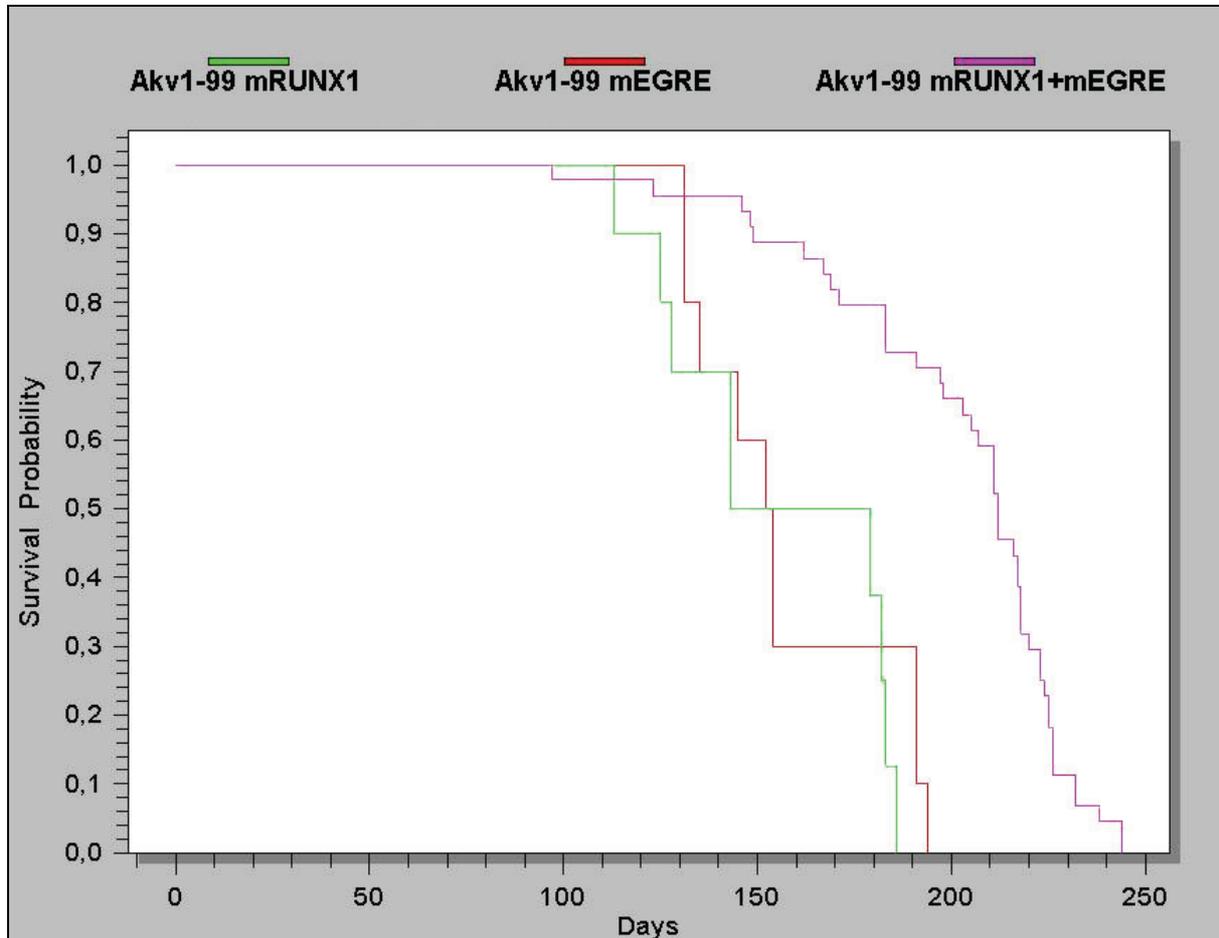


Abbildung 34: Überlebenskurven von Akv1-99 mRUNX1-, Akv1-99 mE_{GRE}- und Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE}-infizierten Mäusen

3.3.14.9 Verlängerte Latenzzeit bei Akv1-99 mE_{AS}+mE_{GRE}

Wie in Abbildung 35 dargestellt, hat Akv1-99 mE_{AS}+mE_{GRE} eine signifikant längere Tumoraltenzzeit als die beiden Akv1-99 mE_{AS}- bzw. Akv1-99 mE_{GRE}-Gruppen (Log-Rank-Test: $p < 0,01$).

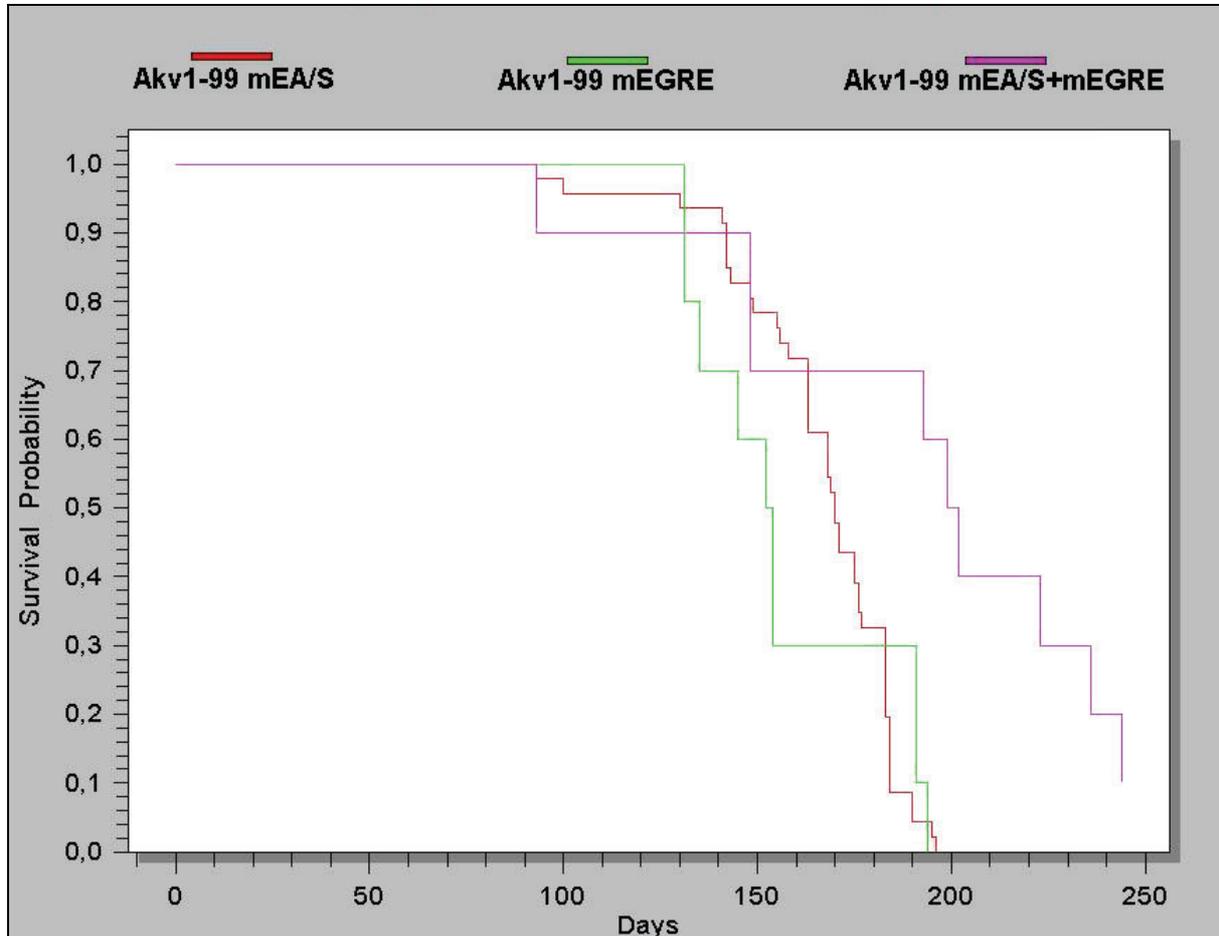


Abbildung 35: Überlebenskurven von Akv1-99 mE_{AS}-, Akv1-99 mE_{GRE}- und Akv1-99 mE_{AS}+mE_{GRE}-infizierten Mäusen

4 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurden zwei Hauptziele verfolgt:

Bedingt durch den explosionsartigen Anstieg von Mausmodellen für hämatopoietische Neoplasien, sollten retrovirusinduzierte murine Lymphome und Leukämien histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang war es notwendig, immunhistochemische Färbungen am Paraffinschnitt und molekularbiologische Analysen an kryoasserviertem und formalinfixiertem Mausgewebe zu etablieren und durchzuführen. Die Anwendbarkeit der aktuellen Klassifizierung für Lymphome und Leukämien der Maus sollte für retrovirusinduzierte Neoplasien getestet und kritisch beurteilt werden. Im Hinblick auf vergleichende Aspekte in der biomedizinischen Grundlagenforschung war es notwendig, grundlegende Charakteristika muriner und humaner hämatopoietischer Neoplasien zu vergleichen.

In einem zweiten Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob Punktmutationen in fünf hoch konservierten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen des murinen Leukämievirus Akv1-99 einen Einfluss auf dessen Pathogenität haben. Zu diesem Zweck wurden der Ursprungsklon Akv λ -623, das murine Leukämievirus Akv1-99 (einem im Enhancerbereich des viralen LTR um 99 bp deletierten Akv λ -623 Klon) sowie zehn Akv1-99 Virusmutanten mit spezifisch eingefügten Punktmutationen in neugeborene Mäuse *i.p.* inokuliert. Die Latenzzeiten, Inzidenzen und das induzierte Tumorspektrum der verschiedenen Viren wurden anschließend verglichen, um eine Aussage über die Bedeutung der verschiedenen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für die Pathogenität der Viren treffen zu können.

Der erste Teil dieser Diskussion befasst sich mit methodischen Aspekten der Diagnostik hämatopoietischer Neoplasien bei Mäusen. Im zweiten Teil werden Eigenschaften der retrovirusinduzierten Neoplasien erörtert. Im dritten Teil erfolgt die Auswertung der virologischen Fragestellung.

4.1 Diagnostische Methoden zur Charakterisierung muriner Lymphome und Leukämien

Für die histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung der hämatopoietischen Neoplasien standen in Paraffin eingebettete und zum Teil eingefrorene Gewebeproben von 333 retrovirusinfizierten NMRI-Inzuchtmäusen zur Verfügung. Die immunhistochemische Charakterisierung der Neoplasien und Klonalitätsstudien mittels PCR mit anschließender Fragmentanalyse wurden in der GSF durchgeführt. Southern Blot Untersuchungen wurden in Dänemark durchgeführt. Vorteile und Nachteile der eingesetzten Analyseverfahren werden erörtert.

4.1.1 Etablierung eines diagnostischen Antikörper-Panels für murine hämatopoietische Neoplasien

Wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Etablierung immunhistochemischer Marker für murine lymphatische und hämatopoietische Zellen im Paraffinschnitt (Kunder et al, Manuskript in Vorbereitung). In der Humanmedizin wurde vor ungefähr 30 Jahren begonnen, hämatopoietische Zellen mittels immunhistochemischer Färbungen in Schnittpräparaten nachzuweisen (23, 108, 110). Der Nachweis von zelllinienspezifischen Proteinen gelang fast ausschließlich an Gefrierschnitten. Heute sind zahlreiche Antikörper für humane, formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebe erhältlich. Die Auswahl an mausspezifischen Antikörpern ist jedoch wesentlich kleiner und die meisten Antikörper für hämatopoietische Zellen sind ausschließlich für Gefrierschnitte geeignet (49, 50, 54, 99, 214, 220). Seit einigen Jahren werden zunehmend immunhistochemische Färbungen für formalinfixierte Mausgewebe eingesetzt (15, 36, 82, 131, 134, 141, 150, 175, 176). Die Interpretation von immunhistochemischen Färbungen verlangt histologische Kenntnisse über das Gewebe, die Zellzusammensetzung und deren Lokalisation sowie über das nachzuweisende Antigen. Die Nachfrage an spezifischen, paraffingängigen Antikörpern für murine hämatopoietische Zellen steigt stetig an, da zunehmend etablierte Mausmodelle für menschliche Lymphome und Leukämien auf immunphänotypischer Ebene charakterisiert und mit humanen Erkrankungen verglichen werden müssen. Zur Bearbeitung von Archivmaterial war es außerdem

notwendig, die immunhistochemischen Färbungen für formalinfixiertes Gewebe zu etablieren. Dieses Ziel ist erfolgreich erreicht worden (Kunder et al., Manuskript in Vorbereitung). Mit einem Antikörperstock der Marker CD3, B220, CD79acy, Pax-5, Tdt, MPO, Ter-119, Ki-67, Mac-3 und CD117 war es möglich, alle in den letzten drei Jahren im Institut für Pathologie der GSF untersuchten murinen hämatopoietischen Neoplasien (ca. 600) zu klassifizieren. Mit dieser Erfahrung konnten auch die vorliegenden 333 retrovirusinduzierten Tumore klassifiziert werden.

4.1.1.1 Bestimmte immunhistochemische Färbungen sind nicht am Paraffinschnitt möglich

In Gefrierschnitten werden bei Anwendung geeigneter Fixierungsmethoden Epitope von Antigenen wesentlich besser konserviert als in formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben (43). Die Gewebebehandlung, die im Laufe des Prozesses der Paraffinblockherstellung notwendig ist, kann auf bestimmte Epitope zerstörerische Auswirkungen haben. Immunhistochemische Färbungen sind in einem solchen Fall nicht in formalinfixierten Geweben möglich. Des Weiteren kann Formalin durch verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen zu Konformationsänderungen von Epitopen führen, wobei diese Strukturänderungen von Epitopen irreversibel sind. In einem solchen Fall sind immunhistochemische Färbungen für formalinfixiertes Gewebe nicht möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei den üblichen kommerziellen Anbietern vergeblich nach paraffingängigen CD4 und CD8 Antikörpern für Mausgewebe gesucht. Diese stehen momentan nur für FACS-Analysen und Gefrierschnitte zur Verfügung.

4.1.1.2 Das Problem mit Hintergrundfärbungen

Unspezifische Markierung muriner B-Zellen

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde der NexEs Färbeautomat (Ventana Medical Systems, Tucson, AR, USA) zunächst mit dem Basic-DAB-(Diaminbenzidin) Detection-Kit und später mit dem iView-DAB-Detection Kit verwendet. Die Kits sind auf Färbungen von humanen Geweben zugeschnitten und enthalten als sekundären Antikörper eine Mischung von Ziege anti Maus-IgG, Ziege anti Maus-IgM und Ziege anti Kaninchen-IgG. Diese Sekundärantikörper sind biotinyliert und somit in der Lage, Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplexe zu binden. Bindet ein Sekundärantikörper unspezifisch an endogene Immunglobuline, kommt es dort nach Zugabe

des Chromogens DAB zu einer unspezifischen Markierung von Mauszellen. Um dieses Problem zu vermeiden, haben wir vorzugsweise nach polyklonalen Antikörpern und monoklonalen Antikörpern aus Ratten gesucht. Für den Nachweis mancher Antigene war es notwendig, monoklonale Maus anti Mensch-Antikörper zu verwenden. Trotz dieser Probleme führten monoklonale Primärantikörper aus der Maus, wie z.B. der CD79acy Antikörper von DAKO, zu aussagefähigen Farbergebnissen auf Mausgewebe. Mit der Umstellung auf das iView-DAB-Detection-Kit traten plötzlich Probleme mit unspezifischen Bindungen auf. Sämtliche Prozeduren, die mit der Sekundärantikörpermischung des Kits liefen, führten zu unspezifischer Markierung muriner B-Zellen. Es stellte sich heraus, dass das iView-DAB-Kit wesentlich mehr Ziege antiMaus-Ig enthielt als das Basic-DAB-Kit. Das iView-DAB-Kit führt auf humanen Geweben zu sehr viel besseren Farbergebnissen, sodass die Firma den alten Basic DAB Kit in Europa vom Markt genommen und durch den iView Kit ersetzt hat. Um Maus-Antikörper mit dem neuen Kit auf Mausgewebe einsetzen zu können, wurde das sogenannte "MoMap-Kit" (Ventana Medical Systems, Tucson, AR, USA) etabliert. Hierbei wurde zunächst der primäre Maus-Antikörper mit den biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde dieser Lösung murines Serum-Ig hinzugegeben, um alle vorhandenen Bindungsstellen abzusättigen. Erst danach erfolgte die Inkubation der bereits an die Sekundärantikörper gekoppelten Primärantikörper mit den Antigenen im Gewebeschnitt.

Das Problem unspezifischer Färbungen, die beim Einsatz von primären Kaninchen-Antikörpern mit dem neuen iView-DAB-Kit auftraten, konnte durch die Verwendung eines selbst befüllbaren Spenders (Ventana Medical Systems, Tucson, AR, USA), wie er auch für primäre Ratten-Antikörper eingesetzt wurde, beseitigt werden.

Unspezifische Markierung von Zellen mit Peroxidaseaktivität

Zellen, die über Hämoproteine, wie z.B. Hämoglobin, Myoglobin, Zytochrome oder Katalasen verfügen, sind in der Lage, Chromogene zu oxidieren und so zu einer unerwünschten Farbreaktion zu führen. Zur Blockierung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte vor dem Auftragen des ersten Antikörpers mit Methanol und Wasserstoffperoxid präinkubiert.

Unspezifische Markierung von Zellen, die Biotin enthalten

Alle FärbeprozEDUREN, die auf Biotin basieren, zeigen eine Markierung von Zellen, die Biotin enthalten (z.B. Hepatozyten). Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Moleküle binden an endogenes Biotin und führen zu einer Markierung dieser Zellen. Eine Blockierung der unerwünschten Farbreaktion ist durch die vorherige Zugabe von Streptavidin und anschließender Inkubation mit Biotin möglich. Eine solche Blockierung findet bei der automatisierten Färbung mit dem NexEs Automaten nicht statt, hat jedoch in der vorliegenden Studie nicht zu Interpretationsschwierigkeiten geführt, da fast alle hämatopoietischen Zellen biotinfrei sind.

Unspezifische Markierung hydrophober Gewebsproteine und Demaskierung von Epitopen

Durch eine Erhöhung der Hydrophobie von bestimmten Molekülen verstärkt Formalin intramolekulare und intermolekulare Proteinbindungen. Wie bereits erwähnt, kann Formalin direkt die Struktur eines Epitops beeinflussen, was zu einer irreversiblen Zerstörung des Bindungspartners primärer Antikörper führt. Die erhöhte Hydrophobie kann aber auch zu Konformationsänderungen benachbarter hydrophober Moleküle führen, welche unter Umständen das Epitop dem Antikörper nicht mehr zugänglich machen (sogenannte "Antigenmaskierung"). Fixierdauer, Fixiertemperatur und der pH-Wert der Formalinlösung haben dabei Einfluss auf die Stärke dieser Strukturänderungen. In der Humanpathologie wird das Gewebe daher maximal 24 Stunden im Formalin belassen (88). Durch enzymatische Vorbehandlung oder hitzeinduzierte Antigenmaskierung (12, 130, 133, 136, 191) kann das "Abschirmen" des Epitops rückgängig gemacht werden, was eine immunhistochemische Färbung wieder ermöglicht. Für eine Hitzevorbehandlung wurden die Schnitte in einem Mikrowellendruckkochtopf (nur in amerikanischen Haushaltwarengeschäften erhältlich) mit Zitratpuffer (pH 6) für 30 min bei 1000 Watt erhitzt, um die ursprüngliche Konformation der Proteine wieder herzustellen. Damit waren selbst immunhistochemische Analysen in Geweben möglich, die wesentlich länger als zwei Wochen in Formalin fixiert worden waren. Ein weiteres Problem hydrophober Wechselwirkungen stellen die Antikörper selbst dar. Immunglobuline sind hydrophob, wobei IgG3 und IgG1 stärker hydrophob sind, als IgG2 und IgG4 (10). Um Van-der-Waals-Bindungen der Antikörper mit hydrophoben Gewebeanteilen zu verhindern ist es möglich, das Gewebe vor dem Auftragen des ersten Antikörpers

durch die Zugabe eines Proteins zu blockieren. Hierzu wurde eine Lösung des gleichen Proteins verwendet, welches als sekundärer Antikörper eingesetzt wurde. Handelte es sich bei dem zweiten Antikörper beispielsweise um ein Ziege-anti-Kaninchen-IgG, wurde für die Blockierung Ziegenserum verwendet. Durch diese Absättigung hydrophober Gruppen vor dem Auftragen des ersten Antikörpers, konnten unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers über Van-der-Waals-Kräfte mit hydrophoben Gruppen im Gewebeschnitt verhindert werden. Zusätzlich wurde der Antikörperverdünnungslösung ein Detergenz (Tween 20) beigesetzt, das ebenfalls hydrophoben Wechselwirkungen entgegenwirkte.

4.1.1.3 Kontrollen

Für bestimmte Antigene der Maus waren kommerziell keine spezifischen Antikörper erhältlich. Deshalb war es notwendig, Antikörper für Mausgewebe zu etablieren, die gegen humane Antigene hergestellt worden waren. Um sicherzustellen, dass die Antikörper gute Farbergebnisse erzielen, wurden sie zunächst im homologen System eingesetzt. Anschließend wurden die Antikörper auf Mausgewebe angewendet, um deren Kreuzreaktivität zu testen.

Kontrollgewebe wurde in gleicher Weise behandelt wie das Gewebe der zu analysierenden Mäuse. Für Analysen hämatopoietischer Zellen der Maus eignete sich als Kontrollgewebe für Färbungen mit CD3, B220, CD43, CD45, CD79acy, TER-119, TEC-3 und MPO die Milz. Beim Nachweis von Tdt wurde Thymus als Kontrollgewebe verwendet. Als Kontrollgewebe für die Marker CD138, Igκ und Igλ wurden Lymphknoten mit medullärer Hyperplasie eingesetzt. Diese Kontrollgewebe erwiesen sich in dieser Studie als zweckmäßig und werden seitdem in unserem Institut verwendet.

4.1.2 Klonalitätsstudien: Ist eine Analysemethode vorzuziehen?

Um bei lymphoproliferativen Erkrankungen den Dignitätscharakter der proliferierenden Zellen bestimmen zu können, sind mitunter Klonalitätsstudien notwendig. Hierbei ist von Nutzen, dass fast alle lymphatischen Neoplasien über klonale Rearrangierungen der Immunglobulin- bzw. der T-Zell-Rezeptor-Gene verfügen, die mit dem Southern Blot Verfahren nachgewiesen werden können. Verstärkt kommt jedoch seit einigen Jahren die PCR-Analyse zum Einsatz, der eine Fragmentanalyse oder eine Heteroduplex-Analyse folgt. Als schnelle, aber nicht immer aussagefähige und nur für reife B-Zell-Lymphome einsetzbare Methode, wurde die Immunhistochemie für leichte Immunglobulinketten mit anschließender Bestimmung des Verhältnisses von Kappa- und Lambda-exprimierenden B-Zellen beschrieben (215). Beim Menschen liegt das normale Igk/Igλ Verhältnis zwischen 0,7 und 2,8. Ein Verhältnis $<0,5$ und $>4,0$ wird als monoklonale B-Zell-Population interpretiert. Bei der Maus sind immunhistochemische Färbungen zur Klonalitätsuntersuchung von B-Zellen nur in sehr geringen Fällen aussagefähig, da ca. 95% aller B-Zellen die Igk-Kette exprimieren, sodass eine monoklonale Population immunhistochemisch nur sicher erkannt werden kann, sofern eine dramatische Vermehrung an Igλ-exprimierenden Zellen vorliegt.

4.1.2.1 Vor- und Nachteile von Southern Blot und PCR-Analyse

Wesentlich aussagefähiger als die immunhistochemischen Untersuchungen für die Analyse der IgH-Rearrangierung, sind das Southern Blot Verfahren und die PCR-Analyse mit anschließender Fragmentanalyse (215). Die Sensitivität des Southern Blots zum Nachweis einer monoklonalen Population ist jedoch geringer als die Sensitivität der PCR-Analyse. Hinzu kommt, dass die DNA-Qualität für das Southern Blot wesentlich besser sein muss als für die PCR-Analyse. In der Regel wird für Southern Blots DNA aus gefrorenem Gewebe verwendet, da eine Formalinfixierung zur Fragmentierung der DNA führt (215). Das PCR-Verfahren kann mit DNA geringerer Qualität durchgeführt werden und eignet sich daher grundsätzlich auch für Formalinfixierte Gewebe (215). Zu beachten ist jedoch, dass die Anzahl der Doppelstrangbrüche mit der Dauer der Fixierung in Formalin zunimmt. Bei einer stark fragmentierten DNA wird es schwierig, eine Amplifikation für große Fragmente zu erzielen. Die hier erwarteten Fragmentgrößen für die IgH-Amplifikation lag bei 90 –

140 bp. Bei unseren durchgeführten Analysen war es selten möglich, Fragmentgrößen von über 270 bp Länge aus lang in formalinfixiertem Gewebe zu amplifizieren. Deshalb sollte die Herstellung des Paraffinblocks möglichst rasch erfolgen. Weitere Vorteile der PCR-Analyse gegenüber dem Southern Blot sind, dass sie schneller durchführbar und methodisch weniger komplex ist.

Für die Analyse von B-Zell-Tumoren eignet sich das IgH-Gen besonders gut, da es früh während der B-Zell-Entwicklung rearrangiert. Nach wie vor wird der Southern Blot als Methode der ersten Wahl angesehen, denn der Detektionserfolg einer klonalen Zellpopulation mittels PCR hängt ganz wesentlich von den verwendeten Primern ab, und deren Design ist durch die hohe Variabilität des IgH-Lokus schwierig. Daten wie sie in der europaweiten vergleichenden PCR-Analyse für humane lymphatische Neoplasien erhoben worden sind (215), stehen für Mausgewebe leider nicht zur Verfügung. Für Untersuchungen humaner Gewebe werden multiple Primersets empfohlen (215, 224); familienspezifische Primer werden gegenüber Konsensusprimer bevorzugt (124). Ein maligner Klon kann einer VH-Familie angehören, die selten bei der VDJ-Rearrangierung beteiligt ist, und daher nicht unbedingt durch Konsensusprimer berücksichtigt wird. In Fällen, in denen eine monoklonale Population aufgrund des Vorberichts erwartet wird, sollte bei einem negativen PCR-Ergebnis zur Absicherung der Diagnose ein Southern Blot durchgeführt werden.

Der Nachweis klonaler, reifer, aktivierter B-Zellen und Plasmazellen ist mitunter schwierig, weil das IgH-Gen aktivierter B-Zellen bereits die Stadien der somatischen Hypermutation durchlaufen hat und möglicherweise Deletionen im Primer-Bindungsbereich enthält (160). Z. B. gelang der Nachweis von monoklonalen humanen folliculären B-Zell-Lymphomen in 65 von 85 Fällen (211). Die Detektion humaner monoklonaler, unreifer und reifer, naiver B-Zellen ist hingegen i. d. R. erfolgreicher. Monoklonalität wird bei Prä-B LBL und Mantelzell-Lymphom mit einer Erfolgsrate von nahezu 100% erkannt (98).

Die Klonalitätsanalyse mittels PCR für murine lymphatische Neoplasien gehört noch nicht zu den standardmäßig eingesetzten Untersuchungsmethoden. Informationen über spezifische Primer sind rar. Eine Arbeit beschreibt die PCR-Analyse aus gefrorenem Gewebe mit anschließender Fragmentanalyse (15). Basierend auf dieser Information wurde auch die PCR-Analyse für formalinfixiertes, murines Gewebe für

den IgH-Lokus für diese Arbeit etabliert. Ein anderer Bericht beschreibt die Verwendung von Primern, die ursprünglich für cDNA kreiert worden waren (37). Mit diesem Primer-Set konnten die Autoren für 11 von 15 formalinfixierten Tumoren Monoklonalität der IgH-Rearrangierung nachweisen.

4.1.2.2 Wie zuverlässig sind Southern Blot und PCR-Analyse?

Je kleiner eine klonale Zellpopulation und je größer die polyklonale Hintergrundpopulation ist, desto größer wird vor allem bei der PCR-Analyse die Gefahr falsch negative Ergebnisse zu erhalten (98). In den hier untersuchten Plasmozytomen gab es immer eine große Anzahl an hyperplastischen, nackten Keimzentren, die eine kleine monoklonale Population überdeckt haben könnten. Zur Lösung dieses Problems kann eine Mikrodissektion eingesetzt werden. Durch eine Mikrodissektion ist es möglich, gezielt verdächtige Zellen zu analysieren. Damit können auch kleine klonale Populationen entdeckt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Southern Blot nach wie vor die verlässlichere Methode zum Nachweis klonaler Zellpopulationen darstellt.

4.1.2.3 Bedeutet Monoklonalität stets maligner Tumor?

Das Vorliegen einer klonalen Zellpopulation bedeutet nicht in allen Fällen das Vorliegen eines bösartigen Tumors. Beim Menschen gibt es Erkrankungen, bei denen klonale Zellpopulationen gefunden werden, deren Dignitätscharakter aber gutartig ist (CD8-positive T-Lymphozytose, gutartige kutane T-Zell-Proliferationen, monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz) (89, 169, 225). Angemerkt sei auch, dass jede effektive, antigenspezifische Immunantwort von einer klonalen B- und T-Zell Proliferation abhängt (19). Für murine Erkrankungen liegen zum jetzigen Zeitpunkt zu wenige Daten vor, um einen Vergleich zwischen den humanen und murinen Befunden vornehmen zu können.

4.1.2.4 Spricht monoklonales IgH stets für B-Zell-Lymphom?

Im Allgemeinen trifft diese Erwartung zu. Zu beachten ist jedoch, dass in neoplastischen Zellen die streng regulierten Mechanismen bei der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangierung außer Kontrolle geraten können. Bei Neoplasien sehr unreifer, hämatopoietischer Zellen wird das beobachtet und als "illegitimate rearrangement", als "illegale Rearrangierung" bezeichnet (186). So wurden beispielsweise bei 93% von 202 humanen, akuten Vorläufer B-Zell lymphoblastischen Leukämien mittels Southern Blot neben monoklonal rearrangierten IgH- auch monoklonal rearrangierte T-Zell-Rezeptor-Gene gefunden (209). Des Weiteren wurden auch monoklonale IgH-Rearrangierungen in akuten T-Zell lymphoblastischen Leukämien beschrieben (210). Deshalb sollte die Auswertung von molekularbiologischen Daten immer Ergebnisse aus der Histopathologie, dem klinischem Befund, der Immunologie und der Zytologie mit einbeziehen (124).

4.2 Charakterisierung retrovirusinduzierter, muriner hämatopoietischer Neoplasien

In dieser Studie wurden 333 neugeborene weibliche NMRI-Mäuse mit murinen Leukämieviren infiziert. Da 83,8 % der Mäuse Plasmazytome entwickelten, wird in der Diskussion besonderes Gewicht auf diese Lymphomart gelegt. Neben Plasmazytomen traten auch diffus großzellige B-Zell-Lymphome (6,9 %), folliculäre B-Zell-Lymphome (4,5 %), splenische Marginalzonen-Lymphome (4,2 %), kleinzellige B-Zell-Lymphome (1,2 %), akute myeloische Leukämien (1,2 %) und Vorläufer-T-Zell lymphoblastische Lymphome (0,9 %) auf, die, ihrer Häufigkeit entsprechend, in absteigender Reihenfolge besprochen werden. Wichtige Unterschiede zur Bethesda-Klassifikation und zu humanen Neoplasien werden hervorgehoben.

4.2.1 Retrovirusinduzierte Plasmazytome: Eine in den "Bethesda Proposals" nicht beschriebene Variante des Plasmazytoms?

Durch Retroviren induzierte Plasmazytome zeigen nur teilweise Übereinstimmung mit den in den "Bethesda Proposals" beschriebenen Plasmazytomen.

In 279 von 333 Fällen (83,8 %) wurde die Diagnose "Plasmazytom" gestellt. Bei diesen Lymphomen waren einige, immer wiederkehrende, morphologische Eigenschaften besonders auffällig, die in den "Bethesda Proposals" (138) keine Erwähnung finden:

1. Der plasmazelluläre Befall vergrößerter Lymphknoten war immer stärker ausgeprägt als der Befall der Milz. In den meisten Fällen waren der Thymus und oftmals auch die Leber involviert.
2. In den Lymphknoten waren viele hyperplastische, nackte Keimzentren erkennbar, die sich deutlich gegen die massive Plasmazellproliferation abhoben.
3. In der Milz fanden sich ebenfalls viele hyperplastische, nackte Keimzentren. Zusätzlich konnten häufig vergrößerte Marginalzonen beobachtet werden.

4. Fortgeschrittene Erkrankungsstadien wiesen eine großzellige plasmoblastische, immunoblastische oder zentroblastische Komponente auf (Abb. 9 d).
5. Monoklonalität war nur in wenigen Fällen nachweisbar. Weitaus häufiger fanden sich oligoklonale und polyklonale Zellpopulationen.

Nach den "Bethesda Proposals" sind beim murinen Plasmozytom die neoplastischen Zellen in der Regel gut differenziert, können jedoch mitunter Plasmablasten in geringem Anteil enthalten. Nach der humanen WHO-Klassifikation (89) sind Plasmozytome eine singuläre Plasmazellneoplasie; Plasmozytome der Maus werden hingegen als multifokale Läsionen beschrieben (138). Mäuse zeigen in der Regel Splenomegalie und Lymphadenopathie. Bei den hier betroffenen Mäusen waren fast immer mehr als zwei Lymphknoten, die Milz und die Leber betroffen. Hyperplastische, nackte Keimzentren und vergrößerte Marginalzonen werden in den "Bethesda Proposals" für Plasmozytome nicht beschrieben. Nach den "Bethesda Proposals" sind beide Allele des IgH- und im Igk-Lokus bei Plasmozytomen in der Southern Blot Analyse monoklonal rearrangiert. Gleichzeitige monoklonale IgH- und Igk-Rearrangierung wurden in dieser Studie in keinem Fall nachgewiesen. Oligoklonale Zellproliferationen wurden in 43 von 43 Fällen (100%) mit der Southern Blot Methode nachgewiesen (Sørensen et al. Manuskript in Vorbereitung). In 11 von 37 weiteren Fällen mit Plasmozytom (29,7 %) konnte mit PCR und anschließender Fragmentanalyse Monoklonalität vor einem polyklonalen Zellhintergrund nachgewiesen werden.

Was wären mögliche Differentialdiagnosen?

Morphologisch ist das retrovirusinduzierte Plasmozytom differentialdiagnostisch gegenüber einer ausgeprägten reaktiven Plasmozytose abzugrenzen. Die Markstränge der Lymphknoten können sich bei der Plasmozytose bis auf die Rindenregion ausdehnen und werden fast ausschließlich von Plasmazellen vereinnahmt. Die residuellen, hyperplastischen Keimzentren werden bei starken Proliferationen in die äußerste Randregion verschoben. Eine eindeutig morphologische Abgrenzung zwischen gutartigen und bösartigen Plasmazellproliferationen wird als allgemein schwierig angesehen (220). Eine verlässliche Aussage ist erst durch Klonalitätsstudien möglich. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten bei den hier untersuchten Fällen neben polyklonalen auch

oligoklonale und monoklonale Zellproliferationen, was das Vorliegen einer reinen, reaktiven Plasmazellhyperplasie ausschließt.

Bei den hier beschriebenen morphologisch progressiven Plasmozytomen mit einer deutlichen, zum Teil überwiegenden, großzelligen Komponente, sind weiterhin das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) sowie das anaplastische Plasmozytom (PCT-A) differentialdiagnostisch abzugrenzen. Im Zusammenhang mit DLBCL wurde bei der Maus bislang kein Fall mit starker Plasmazellproliferation beschrieben. Beim Menschen wurde das plasmablastische Lymphom ursprünglich als Variante des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms angesehen. Neuere Studien aber zeigten, dass es sich hierbei um eine sehr heterogene Gruppe von Lymphomen mit unterschiedlichen klinischen und pathologischen Merkmalen und wahrscheinlich um verschiedene Lymphomarten handelt. Colomo et al. (27) beschreiben beispielsweise das plasmablastische Lymphom mit plasmazytischer Differenzierung. Neben immunoblastischen und plasmablastischen Zellen wurden in diesen Lymphomen kleinere Zellen mit einem plasmazytischem Immunphänotyp (CD20-negativ/schwach positiv, BCL-6-negativ, CD138-positiv und CD38-positiv) beschrieben. Eine weitere Abgrenzung innerhalb der plasmablastischen Lymphome erfolgte gegenüber extramedullären, plasmablastischen Tumoren sekundär nach einer Plasmazellneoplasie. Morphologisch lagen bei diesen Lymphomen reifere Plasmazellen vor, die mit großen blastischen Zellen vermischt waren. Sechs von acht untersuchten Fällen waren CD56-positiv. Reaktive Plasmazytosen und monoklonale Gammopathien ungeklärter Signifikanz (MGUS) konnten dadurch relativ sicher von tumorösen Plasmazellproliferationen unterschieden werden. Für murine Plasmazellen liegen keine Informationen über eine CD56-Expression vor. Die Diagnose "murines anaplastisches Plasmozytom (PCT-A)" erfordert einen Anteil von weniger als 10 % reifer Plasmazellen im Tumorgewebe (138). Bei den hier untersuchten Fällen war der Anteil an differenzierten Plasmazellen immer höher als 10 %.

Die Morphologie der Gewebe mit Plasmozytom dieser Studie sind vergleichbar mit denen von HIV-Patienten im Anfangsstadium der Erkrankung (189). Bei humanem AIDS lässt sich histologisch zunächst eine explosive, folliculäre Hyperplasie erkennen, die sich zu einer gemischten, folliculären Hyperplasie mit starker Plasmazellproliferation entwickelt (18). Einige Parallelen lassen sich auch zum

murinen AIDS feststellen. Beim murinen AIDS, hervorgerufen durch LP-BM5, (siehe Seite 31) entwickeln empfängliche Mäuse eine hochgradige Splenomegalie und Lymphadenopathie. Histologisch fallen prominente Keimzentren auf. Zusätzlich wird eine moderate Plasmazellproliferation beschrieben. Nach bereits drei Wochen kann bei empfänglichen Mausstämmen eine lymphoproliferative Erkrankung diagnostiziert werden (144). Initial handelt es sich beim murinen AIDS um eine polyklonale B-, manchmal auch T-Zell Population, die jedoch im Laufe der Zeit oligoklonal und im Endstadium klonal ist. Nach Transplantation dieser Lymphome in immundefiziente Mäuse, entwickeln Empfängertiere Neoplasien mit dem histologischen Bild eines diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (51, 93, 138). Bei den hier analysierten Tumoren konnten hyperplastische, nackte Keimzentren und Plasmazellproliferationen beobachtet werden. Die Klonalitätsstudien zeigten in den Tumoren Zellpopulationen mit polyklonalem, oligoklonalem und monoklonalem Bild. Morphologisch fortgeschrittene Lymphome wiesen eine großzellige Komponente auf. Die für murines AIDS berichtete Latenzzeit von nur drei Wochen ist erheblich kürzer als die der hier untersuchten Lymphome (179 ± 32 Tage). Das Vorliegen einer Immunsuppression, dem Hauptmerkmal des murinen AIDS, wurde nicht untersucht. Dass murine Leukämieviren eine Immunsuppression hervorrufen können, wurde beispielsweise auch von Faxvaag et al. (44) beschrieben. Nach der Infektion von adulten NMRI-Mäusen mit dem Friend-derived murine immunosuppressive virus (Fd-MIV), entwickelten die Mäuse eine Immunsuppression und Lymphadenopathie mit persistierender Hypergammaglobulinämie. Obwohl keine akuten Transformationsprozesse feststellbar waren, wurde eine starke B-Zell-Proliferation sowie eine Autoantikörperproduktion in der Milz und in den Lymphknoten nachgewiesen (44).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass keine der hier diskutierten, differentialdiagnostisch in Betracht kommenden Tumorformen bezüglich aller Kriterien für die in dieser Studie induzierten Plasmazellproliferationen zutrifft. Interessanterweise besteht zwischen den in dieser Studie analysierten murinen Plasmazellproliferationen und den beim Menschen beschriebenen post-transplantären lymphoproliferativen Störungen (PTLD) eine große Ähnlichkeit (89). Hierbei handelt es sich in 80 % der Fälle um Epstein-Barr Virus (EBV) induzierte, monoklonale oder polyklonale B-Zell-Proliferationen, die sich durch eine herabgesetzte T-Zell-Kontrolle der Immunantwort entwickeln (89). Die

proliferierenden, EBV-positiven Zellen können dabei vom Spender oder vom Empfänger des Transplantats stammen. Zu den sogenannten "frühen" PTLD Läsionen zählt die plasmazytische Hyperplasie, welche sich durch eine erhaltene Lymphknotenarchitektur und durch das Vorkommen von zahlreichen Plasmazellen und wenigen Immunoblasten auszeichnet. Sie können zwei bis fünf Jahre nach der Transplantation auftreten. Die Bezeichnung "früh" bezieht sich hierbei demnach nicht auf die zeitliche Dimension, sondern das morphologische Bild, das eher dem einer akuten reaktiven Plasmazytose ähnelt (89). Zwei weitere morphologische Formen der PTLD sind die polymorphe und die monomorphe PTLD. Bei der polymorphen Variante setzen sich die proliferierenden Zellen aus Immunoblasten, Plasmazellen und mittelgroßen B-Zellen zusammen. Die Organarchitektur ist nicht mehr erhalten, Nekrose und zahlreiche Mitosen können vorkommen. Bei den monomorphen PTLD handelt es sich histologisch, immunphänotypisch und molekularbiologisch um B-, seltener auch um T-Zell-Lymphome, die entsprechend der aktuellen Klassifizierung genau diagnostiziert werden sollten. Das Tumorspektrum umfasst unter anderem diffus großzellige B-Zell-Lymphome, multiple Myelome sowie plasmazytomähnliche Läsionen. Die in der vorliegenden Studie beschriebenen Plasmazellproliferationen weisen große Ähnlichkeiten mit den drei beschriebenen humanen PTLD-Formen auf. Studien zu dieser Art von Tumorformen sind bisher nicht für Mäuse beschrieben worden. Die hier beobachtete stufenweise Entwicklung von Plasmazytomen (siehe unten) wurde bislang nur von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (199).

Pathogenese experimentell induzierter Plasmazellproliferationen und Plasmazytome

Die in dieser Studie durch Retroviren induzierten Plasmazytome scheinen sich nach einem bestimmten Muster zu entwickeln. Frühe Läsionen zeichneten sich morphologisch als Reaktion auf die Virusinfektion durch folliculäre Hyperplasie und Plasmazellhyperplasie (benigne Plasmazellproliferation) aus. Durch einen bisher nicht näher untersuchten Prozess, erlangten im Laufe der frühen Latenzphase einige Plasmazellklone einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen; ein Ereignis, das sich in den molekularbiologischen Analysen als Oligoklonalität nachweisen ließ. In der terminalen Phase war der Wachstumsvorteil weniger Klone so stark, dass sich klonale Zellpopulation etablieren konnte. Interessanterweise waren monoklonale Banden im Southern Blot in vielen der untersuchten Fälle relativ

schwach ausgebildet, was die Theorie einer stufenweisen Entwicklung, von einer polyklonalen Population hin zum monoklonalen Plasmozytom, unterstreicht. Aus der Analyse mehrerer Tumorproben pro Maus ging hervor, dass in den verschiedenen Organen unterschiedliche Zellklone auftraten. Dies spricht ebenfalls für eine antigenabhängige, zunächst reaktive, überschießende Plasmazellproliferation, die sich durch die aufrecht erhaltene, latente Infektion in verschiedenen Organen der gerichteten Immunantwort entzog. Einzelne Zellklone erlangten anderen Klonen gegenüber einen Überlebens- oder Wachstumsvorteil, der in einer malignen Transformation endete.

Nach der PCR-Analyse waren in den Elektropherogrammen in sechs Fällen nur kleine monoklonale Zellpopulationen nachweisbar. Auch bei relativ großen monoklonalen Populationen war oft noch eine polyklonale Hintergrundpopulation beobachtet worden. Diese Beobachtungen stützen die Theorie einer stufenweisen Entwicklung der Plasmozytome. Das Muster polyklonaler Hintergrundpopulationen könnte auch durch die zahlreich vorhandenen hyperplastischen Keimzentren bedingt sein. In den tumorösen Lymphknoten beinhalteten diese Zentroblasten und Zentrozyten, die eine hohe Variabilität im IgH-Gen aufweisen sollten. Kleine klonale Plasmozytom-Zellpopulationen könnten hierbei möglicherweise überdeckt und somit übersehen worden sein. Um die Gefahr falsch negativer Ergebnisse bei der PCR-Analyse einzuschränken, könnten Areale verdächtiger Tumorzellen vor der DNA-Extraktion aus dem Paraffinschnitt mikrodisseziert werden. Die Mikrodissektion eignet sich auch, um falsch positive Elektropherogramme zu vermeiden. In einer Arbeit über multiple Myelome wurde beispielsweise empfohlen, verdächtige Zellen im Knochenmark mittels Mikrodissektion zu gewinnen, um eine ungewünschte Amplifikation biologisch irrelevanter (reaktiver) klonaler Populationen zu verhindern (97).

Mausmodelle für Plasmazellneoplasien

Plasmozytome der Maus sind im Vergleich zu anderen Lymphomen relativ intensiv erforscht worden. Berichte über spontane Plasmozytome sind zwar rar (32, 33, 76, 195), jedoch gibt es zahlreiche Studien, die eine Entwicklung von Plasmozytomen durch chronische Entzündung in genetisch prädispositionierten Mäusen und durch Infektion mit onkogenen Retroviren beschrieben haben (96, 129, 159, 165, 172). Im

Zusammenhang mit dauerhaft vorhandenen, hohen Antigen spiegeln, hervorgerufen durch *intraabdominale* Verabreichung von Pristan, Plastikplättchen oder Silikongel und nach einer Infektion mit dem transduzierenden Retrovirus J3V1 (170), hat sich herausgestellt, dass Interleukin-6 (IL-6), ehemals von Nordan et al. als 'pristane induced plasmacytoma growth factor' beschrieben (159), eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von murinen Plasmazytomen zu spielen scheint. Beispielsweise entwickelten 25 von 45 transgenen BALB/c-Mäusen, die dauerhaft IL-6 exprimierten, nach 18 Monaten Plasmazytome (96). Nach Verabreichung von Pristan und der dauerhaften Behandlung mit einem nicht-steroidalen Antiphlogistikum, das die IL-6 Produktion blockierte, kam es bei BALB/c-Mäusen hingegen nicht zur Ausbildung von Plasmazytomen (171). Des Weiteren entwickelten IL-6-Knockout-Mäuse nach einmaliger Verabreichung von Pristan und einer Injektion des onkogenen J3V1 Retrovirus keine Plasmazytome. Wohl aber entwickelten sich bei 34 von 47 Kontrollmäusen mit unverändertem IL-6 Locus nach ca. 88 Tagen Plasmazytome (77). IL-6 fungiert bei diesen Mausmodellen als zytokiner Wachstumsfaktor für Plasmazytomzellen und wird wahrscheinlich von umgebenden Stromazellen bereitgestellt (170). Bei den in der Literatur beschriebenen virusinduzierten Plasmazytomen handelte es sich immer um akut transformierende Viren, deren Pathogenität durch virale Onkogene vermittelt wurde. Die Charakterisierung der Plasmazytome in den "Bethesda Proposals" beruht auf den oben beschriebenen Plasmazytom-Modellen und unterscheidet sich wesentlich von Plasmazytomen der hier vorliegenden Studie.

Die in der Literatur angegebenen Latenzzeiten für Plasmazytome hängen stark vom Versuchsaufbau ab. Sie sind daher nicht direkt mit der Latenzzeit der in dieser Studie retrovirusinduzierten Plasmazytome vergleichbar. Der Zeitraum reicht von 60 Tagen nach einer kombinierten Anwendung von Pristan und einem Retroviruskonstrukt mit v-Ha-ras und/oder c-myc unter der Transkriptionskontrolle einer MoMLV LTR (24), über 136 Tagen bei transgenen Myc/BCL-X_L Mäusen (22), bis zu 360 Tagen nach einmaliger Pristaninjektion (173). Die Kombination der Injektion von Abelson MLV und einer Behandlung mit Pristan führte nach 220 Tagen zur Plasmazytom-Induktion (173). Die Plasmazytome der vorliegenden Studie entwickelten sich im Vergleich zu den oben genannten nach einer mittleren Latenzzeit von 179 ± 32 Tagen.

Eine rein morphologische Abgrenzung zwischen gutartigen und bösartigen Plasmazellproliferationen ist schwierig.

Nach den "Bethesda Proposals" weisen Plasmazytome eine monoklonale Rearrangierung beider Allele des IgH- und Igk-Lokus auf. Um das Vorliegen einer monoklonalen Rearrangierung des IgH-Lokus bei den vorliegenden Plasmazellproliferationen zu untersuchen, wurden Klonalitätsstudien durchgeführt. Dabei wurden Fälle mit und ohne großzelliger Komponente berücksichtigt. Mit dem Southern Blot Verfahren war in keinem Fall eine klonale IgH-Rearrangierung detektierbar. Mit der Igk-Sonde konnte für 19 von 52 Fällen (37 %) eine klonale Zellpopulation nachgewiesen werden. Bei 43 von 43 Plasmazytomen sprach die Hybridisierung mit der ecotropen env Sonde für oligoklonale provirale Integrationen. Mit der Fragmentanalyse wurden für den IgH-Lokus bei zwei von 37 Fällen (5,4 %) oligoklonale Populationen nachgewiesen. In 11 von 37 Fällen (29,7 %) war das Elektropherogramm-Muster monoklonal. Neben diesen molekularen Befunden waren es vor allem sehr starke Plasmazellproliferationen und der Verlust der normalen Organarchitektur, die für die Diagnose Plasmazytom ausschlaggebend waren.

Plasmazytome mit morphologischen Zusatzbefunden

Beschreibungen von Plasmazytomen bei Mäusen, die durch nicht akut transformierende, murine Leukämieviren induziert worden sind, sind extrem rar (199). Plasmazytome im Zusammenhang mit einer großzelligen Komponente, Marginalzonenhyperplasie, starker extramedullärer Hämatopoiese, dysplastischer Erythropoiese oder einem zusätzlich vorliegenden hämatopoietischen Tumor, wurden hier erstmals beschrieben.

In den hier untersuchten Plasmazytomen mit dysplastischer Erythropoiese in der Milz wurden auch in der Leber multifokale Herde mit Erythrozytenvorläuferzellen gefunden. Aus einer älteren Studien über nicht-hämolytische Anämien bei BALB/c-Mäusen geht hervor, dass eine extramedulläre Hämatopoiese in der murinen Leber erst nachweisbar war, wenn die Erkrankung bereits sehr fortgeschritten war und ein Hämatokrit <20 % vorlag (222). Unklar ist, ob in den hier untersuchten Fällen Veränderungen im roten Blutbild vorlagen. Im Untersuchungsgut des Instituts für Pathologie der GSF fanden sich starke reaktive, extramedulläre Hämatopoiese in murinen Lebern dann, wenn einige Tage vor ihrem Tod Blut entnommen worden war. Außerdem trat eine Hyperplasie von hämatopoietischen Zellen unterschiedlich stark

bei Mäusen auf, wenn sie einige Tage vor ihrem Tod einer Futterreduktion unterzogen worden waren. Des Weiteren lag eine extramedulläre Erythropoiese in der Leber häufig bei Mäusen vor, die an einem Hepatokarzinom erkrankt waren. Diese drei Gründe lassen sich für eine extramedulläre Hämatopoiese bei den analysierten Fällen dieser Studie ausschließen.

Im Zusammenhang mit Plasmozytomen in einem genetisch veränderten Mausmodell kam es zur einer deutlichen Besiedlung des Knochenmarks mit neoplastischen Plasmazellen (22). In diesen Fällen war die medulläre Hämatopoiese gestört und mit einer reaktiven, extramedullären Hämatopoiese in der Milz und Leber wäre zu rechnen gewesen. Infektionen mit Retroviren führten auch zu generalisierter hämatopoietischer Hyperplasie im präleukämischen Stadium. So wurde beispielsweise für Moloney MLV postuliert, dass es vor der Ausbildung von T-Zell-Lymphomen zu einer präleukämischen Hyperplasie von hämatopoietischen Zellen sowie zur Splenomegalie kam (30). Interessanterweise traten in unserer Studie Plasmozytome mit dysplastischer Erythropoiese signifikant früher ($p < 0,05$), als Plasmozytome ohne Zusatzbefunde auf. Die Analyse für die Plasmozytomgruppe mit starker Hämatopoiese ergab zwar keinen erkennbaren Unterschied, trotzdem schienen sie etwas früher aufzutreten als die Plasmozytome ohne Zusatzbefunde. Analysen des Knochenmarks und des Blutes könnten in zukünftigen Studien eine bessere Charakterisierung der Plasmozytome ermöglichen.

Auf retrovirusinduzierte und transplantationsbedingte lymphoproliferative Störungen wird in den "Bethesda Proposals" nicht eingegangen. Eine neuere Arbeit beschreibt lymphoproliferative Erkrankungen bei einer genetisch veränderten Mauslinie, die zeitlich einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom vorausging (16). Bei 10 von 24 analysierten Mäusen fand sich im Alter von sechs Monaten eine poly- bzw. oligoklonale B-Zell-Proliferation mit partieller Zerstörung der Organarchitektur in Milz und Lymphknoten. Plasmazellproliferationen wurden nicht beschrieben. Der vorherrschende Phänotyp der proliferierenden B-Zellen war stark IgM-positiv, schwach IgD-positiv sowie CD23- und CD21-negativ. Ab 15 Monaten starben die Mäuse. Etwa 75 % der beobachteten B-Zell-Lymphome dieser Mäuse waren monoklonale, diffus großzellige, IgM- und IgD-positive sowie CD43-negative B-Zell-Lymphome. Die DLBCL waren IgM-positiv, schwach IgD-positiv und CD23- sowie CD21-negativ; woraus die Arbeitsgruppe folgerte, dass es sich bei der

lymphoproliferativen Erkrankung um ein frühes Entwicklungsstadium eines DLBCL handelte.

Plasmozytome bei der Kontrollgruppe

Grundsätzlich ist die Abgrenzung von nicht-neoplastischen Akkumulationen lymphatischer Zellen zu lymphatischen Neoplasien in der Mauspathologie kein neuartiges Problem (51). Chronische Infektionen sind als Ursache starker reaktiver Plasmazellproliferationen dabei nicht auszuschließen. Aus einer Studie mit über 15000 Mäusen verschiedener Stämme ging hervor, dass insbesondere bei weiblichen Mäusen hyperplastische Läsionen der Lymphknoten mit höherem Lebensalter zunehmen (55). Histologisch unterschieden sich die Gewebe von drei alten Mäusen aus einer Kontrollgruppe nicht von anderen, die histologisch als Plasmozytom klassifiziert worden waren. Die PCR-Analyse mit anschließender Fragmentanalyse dieser Gewebe zeigte das Muster einer polyklonalen Population. Arbeiten über spontane Lymphome bei Mäusen berichten eine altersbedingte Entwicklung von Lymphomen nach 400 und mehr Tagen. In einer Studie von Gimbel et al. (57) entwickelten 16 von 98 Kontrollmäusen (16 %) nach 408 ± 13 Tagen ebenfalls Lymphome. Eine andere Studie mit NMRI-Mäusen als Kontrollgruppe beschreibt bei vier von 50 Mäusen ein malignes Lymphom im Alter von 365 ± 157 Tagen (187). Die Kontrollmäuse aus der vorliegenden Studie mit dem histologischen Befund Plasmozytoms wurden nach 167 bzw. nach 258 Tagen abgetötet. Sie hatten vergrößerte Lymphknoten von 6-20 mm; zwei Mäuse hatten einen vergrößerten Thymus von 9-12 mm. Untersuchungen auf latente Infektionen mit anderen Viren wurden nicht durchgeführt, sodass die Ursache für diese Neoplasien letztendlich nicht geklärt werden konnte.

4.2.2 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)

DLBCL zeichneten sich morphologisch durch große blastische B-Zellen und in fast allen Fällen durch einen hohen Gehalt an reaktiven, infiltrierenden Histiozyten und T-Lymphozyten aus. Befallene lymphatische Organe waren hochgradig von Tumorzellen infiltriert und wiesen in der Regel einen kompletten Verlust der Organarchitektur auf. Die Leber zeigte multifokale, große Infiltrate von Tumorzellen und von reaktiven, kleinen T-Zellen. Bei DLBCL der Maus sind aufgrund starker

Proliferationen reaktiver Lymphozyten die neoplastischen Zellen oftmals kaum erkennbar (50). In den hier untersuchten Fällen waren es vor allem reaktive T-Zellen, die die neoplastischen Zellen zum Teil in großer Anzahl begleiteten. Bei der Klonalitätsanalyse stören reaktive T-Zellen nicht, da sie für den IgH-Lokus nur Keimbahnbanden aufweisen. In der WHO-Klassifikation (89) wird ein zerstörerisches Wachstumsmuster dieser Lymphomart beschrieben, welches auch bei den in dieser Studie analysierten DLBCL vorlag.

Ein DLBCL wurde als immunoblastische Variante klassifiziert. Erwähnenswert ist, dass bei dieser Variante, im Vergleich zu den anderen beiden Varianten, das "Sternenhimmelmuster" sehr stark ausgebildet war.

In der Humanmedizin erfolgt seit kurzer Zeit die Einteilung DLBCL nach ihrem Expressionsmuster in drei Gruppen (174). DLBCL mit einem Keimzentrumsphänotyp scheinen dabei eine bessere Prognose zu haben als DLBCL mit einem Postkeimzentrumsphänotyp (8). Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse wird die biologische Relevanz weiterhin diskutiert (200, 226).

Beim humanen DLBCL treten in 30 bis 40 % der Fälle Brüche und Punktmutationen im BCL-6 Gen auf (217). Sequenzielle Untersuchungen der murinen *bcl-6* Region von murinen DLBCL, Burkitt Lymphomen und Plasmozytomen ergaben jedoch keinen Hinweis auf Translokationen oder Mutationen und ließen vermuten, dass der *bcl-6* Locus der Maus nicht, wie beim Menschen, von somatischen Hypermutationen und Deletionen betroffen ist (80). Mit dem Ziel, eine BCL-6-Translokation im Mausmodell nachzustellen, wurde das murine *bcl-6* stromabwärts des IgH Promoters I_H eingefügt, was nach sechs Monaten bei vier von 24 Mäusen zur Entwicklung eines DLBCL führte (16). Mit steigendem Alter nahm die Häufigkeit an DLBCL zu. Diese Daten sprechen dafür, dass eine unkontrollierte BCL-6 Expression in Mäusen zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen führt, die den humanen DLBCL ähneln. Interessanterweise war die immunhistochemisch nachweisbare BCL-6-Expression bei den Tumoren sehr unterschiedlich ausgeprägt (16).

4.2.3 Follikuläres B-Zell-Lymphom (FBL)

Das murine FBL zeichnet sich durch ein diffuses Wachstumsmuster aus. Zahlreiche isoliert wachsende, neoplastische Follikel, wie sie beim Menschen beschrieben werden, liegen bei der Maus nicht vor. Beim Menschen beschreibt eine retrospektive Studie die Korrelation des follikulären B-Zell-Lymphoms mit einem "Rücken an Rücken" liegenden Wachstumsmuster der Follikel (148). Dieses Muster lag in 85 % der untersuchten Lymphknoten mit follikulärem B-Zell-Lymphom vor, konnte jedoch in keinem Lymphknoten mit florider, reaktiver Lymphadenopathie nachgewiesen werden. Bei humanen follikulären B-Zell-Lymphomen liegt in 70-95 % eine t(14,18) Translokation des *bcl-2*-Gens vor, was zu einer erhöhten Expression dieses anti-apoptotisch wirkenden Proteins in den Tumorzellen führt (152). Während normale humane und murine follikuläre Zentrumszellen kein BCL-2 exprimieren, lässt sich das Protein in humanen neoplastischen Zellen mit der Translokation immunhistochemisch nachweisen. Verschiedene Mausmodelle wurden mit einer imitierenden *bcl-2*-Translokation generiert (28, 128). Die immunologischen Phänotypen der so generierten Tumore wiesen jedoch keine deutlichen Ähnlichkeiten mit humanen follikulären B-Zell-Lymphomen auf. Bei transgenen Mäusen, die über ein BCL-2-IgH-Minigen verfügten (128), wurde moderate Splenomegalie mit Hyperplasie der weißen Milzpulpa durch Proliferation von IgM+, IgD+ und Igκ+ B-Zellen festgestellt. Vereinzelt Lymphknoten waren bei diesen Mäusen um das zwei- bis dreifache angeschwollen. Interessanterweise konnte eine Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen beobachtet werden. Dies deutet auf einen grundlegenden Unterschied zum humanen follikulären B-Zell-Lymphom, bei dem die neoplastischen Zellen einem Differenzierungsblock unterliegen. Transgene Mäuse wiesen medulläre und interfollikuläre Plasmazellproliferationen und Hypergammaglobulinämie auf. Interessanterweise waren etwa 10 % der proliferierenden B220-, IgM- und IgD-positiven B-Zellen über 12 Wochen in Zellkultur lebensfähig. Außerdem wurde berichtet, dass es sich bei den B-Zellen um eine polyklonale Population mit geringer Proliferations- und Apoptoserate handle (79). In einer jüngeren Studie wurde das *bcl-2*-Gen stromabwärts der VavP-regulatorischen Sequenz eingefügt, was zu einer erhöhten Expression des BCL-2 in allen hämatopoietischen Zellen führte (37). Nach einer Latenzzeit von 18 Monaten entwickelten 37 bis 50 % der Mäuse ein follikuläres B-Zell-Lymphom, das dem des

Menschen ähnlich war. Bei 12 % lag ein Plasmozytom vor und <10 % entwickelten großzellige B-Zell-Lymphome, Thymus-Lymphome oder histiozytäre Sarkome.

Der Anteil an proliferierenden und apoptotischen Zellen ist in humanen, folliculären B-Zell-Lymphomen geringer, als in humanen reaktiven Keimzentren (29). Für die Maus wurden spontane Translokationen dieser Art mit einer erhöhten Expression von BCL-2 bislang nicht beschrieben.

Die Unterschiede zwischen murinen und humanen folliculären B-Zell-Lymphomen sind offensichtlich. Die Diagnose des murinen folliculären B-Zell-Lymphoms beruht in erster Linie auf dem Vorliegen einer Mischung aus großen und kleinen Keimzentrumzellen. Für die Diagnosestellung ist der Nachweis von Ki-67 hilfreich, da sich hierbei die Kernmorphologie der proliferierenden Zellen besonders gut beurteilen lässt. Mit einer Anfärbung von membranständigem B220-Protein ist das diffuse Verteilungsbild der Tumorzellen gut darstellbar. Nur in der Humanpathologie werden die CD10- und BCL-6-Expression untersucht. CD10 ist in Zellen von folliculären B-Zell-Lymphomen stärker exprimiert als in reaktiven Keimzentrumzellen (5). Generalisierte folliculäre B-Zell-Lymphome wurden außerdem als p53-positiv beschrieben, was bei reaktiven Zellen nicht nachweisbar war (95). Beim Menschen stehen B-Zellen, die die Igκ-Kette ausbilden, in einem bestimmten Verhältnis zu B-Zellen, die die Igλ-Kette exprimieren (215). Mit einer immunhistochemischen Färbung kann dieses Verhältnis ermittelt werden. Bei Abweichungen zur einen oder anderen Seite liegt der Verdacht nahe, dass es sich um eine klonale Population handelt. Immunhistochemische Untersuchungen dieser Art helfen bei B-Zell Neoplasien der Maus in der Regel nicht weiter, da über 90% der murinen B-Zellen natürlicherweise Igκ exprimieren.

4.2.4 Splenisches Marginalzonen-Lymphom (SMZL)

Die Entwicklung muriner splenischer Marginalzonen-Lymphome beginnt mit einer leichten Verbreiterung der Marginalzone in der Milz, gefolgt von einer deutlichen Marginalzonenhyperplasie und manifestiert sich schließlich als klonaler Tumor. Hierbei werden geringgradig, mittelgradig und hochgradig maligne SMZL unterschieden (192). In älteren Studien wurde dieser Tumor häufig nicht als eigene Tumorform erkannt. Zum einen ähnelt das Spätstadium dem DLBCL und zum anderen können beide Lymphome mitunter nebeneinander in der Milz vorkommen

(49). Von 500 analysierten Lymphomen von NFS.V-Mäusen (kongen für Akv) handelte es sich bei 90 % der Tumore um B-Zell-Lymphome. Es stellte sich heraus, dass davon ca. 40 % SMZL waren (69). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das SMZL häufiger vorkommen könnte als bislang vermutet. Das Infiltrationsverhalten dieses Tumors unterscheidet sich von dem des DLBCL. In der Regel bleibt der Tumor auf die Milz begrenzt. In hochgradigen Stadien können jedoch auch Leber und Mesenteriallymphknoten befallen sein. In den hier untersuchten Fällen konnte die Marginalzonenzelle in einigen Lymphomen mit B220 nicht nachgewiesen werden. In einer Arbeit, in der SMZL-Zellen mittels Flow-Zytometrie untersucht worden waren, waren die Zellen in drei von 52 Fällen stark B220-positiv, in neun von 52 Fällen B220-positiv, in 32 von 52 Fällen nur schwach B220-positiv und in 11 von 52 Fällen B220-negativ (49). Diese Daten zeigen, dass Marginalzonen-Lymphomzellen je nach Differenzierungsstadium die B220-Expression verlieren können. Um die in der vorliegenden Studie B220-negativen Marginalzonen-Tumorzellen eindeutig der B-Zelllinie zuordnen zu können, wurde die CD79acy-Expression untersucht und in allen fraglichen Fällen nachgewiesen. Eine Gedächtnis-B-Zelle, die sich zur Plasmazelle differenziert, verliert ihre B220- nicht aber die CD79acy-Expression. Neoplastische Marginalzonenzellen waren außerdem BCL-2-positiv. Eine Arbeitsgruppe analysierte 69 SMZL und stellte klonale IgH- und Igk-Rearrangierungen fest (141). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Southern Blot und der Igk-Sonde in zwei von zwei untersuchten SMZL, die in Kombination mit Plasmozytomen aufgetreten waren, Klonalität nachgewiesen werden.

Bei einem Kontrolltier lag in der Milz eine erheblich verbreiterte Marginalzone vor. Subkapsulär waren bereits kleine Marginalzonenzellknoten vorhanden, die man bei einer reaktiven Marginalzonenhypertrophie nicht zu finden sind. Zusätzlich war der Anteil an Pronormoblasten und basophilen Normoblasten in der roten Pulpa stark erhöht. Die erythroiden Zellen zeigten Anzeichen von Dysplasie.

Bislang gibt es keine Berichte über spontane, splenische Marginalzonen-Lymphome bei NMRI-Mäusen. Auch fällt eine vergleichende Beschreibung der erythroiden Dysplasie schwer, da keine Daten in der Literatur zu spontanen Dysplasien bei NMRI-Mäusen verfügbar sind. Morphologisch glich die Milz dieser Maus den Milzen mit splenischen Marginalzonen-Lymphomen, die mit dysplastischer Hämatopoiese

aufgetreten waren. Es bleibt zu klären, ob bei dieser Maus eventuell eine latente Infektion vorgelegen haben könnte.

4.2.5 Kleinzelliges B-Zell Lymphom (SBL)

Die Diagnose des murinen kleinzelligen B-Zell-Lymphoms beruht hauptsächlich auf der Morphologie, dem Infiltrationsverhalten und dem immunhistochemischen Nachweis von B-Lymphozyten. Die Zellen sind klein, verfügen über wenig Zytoplasma, haben einen runden Kern, mit zum Teil verdichtetem Chromatin und selten prominenten Kernkörperchen. Sie sind positiv für B220 und CD79acy. In den Lebersinusoiden fanden sich diffus verteilte Tumorzellen, wobei es auch noduläre Infiltrationsherde vor allem im Triasbereich gab. In der Milz lag eine starke Infiltration vor, die mit einem Verlust der Organarchitektur einherging. Der mittels PCR mit anschließender Fragmentanalyse untersuchte Fall zeigte ein polyklonales Elektropherogramm. Morphologisch ähneln die murinen kleinzelligen B-Zell-Lymphome dem humanen kleinzelligen lymphozytären Lymphom bzw. der chronisch lymphatischen Leukämie. Bei den menschlichen Tumoren findet sich eine klonale Rearrangierung der IgH- und IgL-Ketten. Etwa bei der Hälfte dieser Neoplasien liegt keine somatische Hypermutation vor; bei der anderen Hälfte ist eine somatische Hypermutation nachweisbar (89). Da beide Befunde regelmäßig beobachtet werden, könnte die chronisch lymphozytische Leukämie zwei Unterformen haben. Eine, die aus naiven B-Zellen hervorgeht und eine Weitere, die sich aus Postkeimzentrumszellen (Gedächtnis-Zellen) entwickelt. Ein Charakteristikum von humanen kleinzellig lymphozytischen Lymphomen bzw. chronisch lymphozytischen Leukämien, ist die stark erhöhte Expression von BCL-2, Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor-1 und -2 (TRAF1, TRAF2) (146). Kürzlich wurde ein Mausmodell für humane chronisch lymphozytische Leukämien etabliert (230). Doppeltransgene Mäuse für TRAF2DN/BCL-2 überexprimierten BCL-2 und TRAF2DN in B-Lymphozyten und hatten bereits zur Geburt eine Splenomegalie entwickelt. Nach sechs Monaten traten die ersten Todesfälle auf und nach 14 Monaten waren 80 % der Mäuse gestorben. Die Tumorzellen dieser Mäuse exprimierten CD5, waren BCL6-negativ, entwickelten sich zu einer klonalen leukämischen Zellpopulation und zeigten sich gegenüber Apoptose resistent; dies

sind Merkmale, welche auch bei humanen chronisch lymphozytischen Leukämien vorkommen.

4.2.6 Akute myeloische Leukämie mit morphologischer Ausreifung (AML)

Die Diagnose einer AML erfordert bei der Maus den Ausschluss einer reaktiven, starken Granulopoiese, zum Beispiel im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen. Äußerst schwer sind septikämische Prozesse von myeloischen Leukämien zu unterscheiden. Hinzu kommt, dass sich bei einigen tumorösen Erkrankungen und lokalen Entzündungsreaktionen neben extramedullärer Hämatopoiese in der Milz, auch in Leber und Lymphknoten eine extramedulläre Hämatopoiese nachweisen lässt. Bei AML ohne morphologische Ausreifung empfiehlt sich zum Nachweis der blastischen Zellen die CAE- oder die MPO-Färbung. Myeloische Leukämien mit morphologischer Ausreifung weisen bei Maus und Mensch große Ähnlichkeiten auf.

4.2.7 Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom (Prä-T LBL)

Beim Vergleich humaner und muriner hämatopoietischer Neoplasien ist beim lymphoblastischen Lymphom vermutlich die größte Übereinstimmung zwischen Maus und Mensch zu finden. Die Tumorzellpopulation ist monoton. Die Zellen haben relativ wenig Zytoplasma, einen runden Kern mit blastischem Chromatin und kleinen Kernkörperchen. Sie sind Tdt- und CD3-positiv. Bei sehr unreifen Zellen zeigte sich CD3 nicht als deutlich brauner Ring entlang der Membran, sondern als blasse, bräunliche, zytoplasmatische Färbung. Aufgrund mangelhafter Qualität der aus dem Paraffinschnitt gewonnenen genomischen DNA, konnten Klonalitätsstudien für diese drei Tumore nicht durchgeführt werden. Die zu erwartenden Fragmentgrößen mit den bislang getesteten Primerpaaren für den TCR β und TCR γ Locus lagen bei 200 bis 320 bp, Größen, die aus der stark fragmentierten DNA nicht amplifizierbar waren.

Beide Tumore zeigten ein sehr aggressives Infiltrationsverhalten und eine hohe Mitoserate. Erwähnenswert ist, dass ein stark vergrößerter Thymus nicht zwangsläufig das Resultat eines T-Zell-Lymphoms sein muss. Die in dieser Studie auffälligen Thymusvergrößerungen gingen fast ausnahmslos auf

Plasmozytominfiltrate zurück. Bei der Maus wurden zudem primär mediastinale B-Zell-Lymphome beschrieben, die zu einem stark vergrößerten Thymus führen (138). Auch wenn sich ein stark vergrößerter Thymus oftmals auf ein Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom zurückführen lässt, sollte eine Vergrößerung des Thymus nicht *per se* als Kriterium für oder gegen eine bestimmte Lymphomart dienen.

4.3 Tumorinduktion durch Akv und Akv-Mutanten

Mit dieser Studie sollte die Frage beantwortet werden, ob und in welchem Ausmaß gezielte Punktmutationen im Enhancerbereich des murinen Leukämievirus Akv die Pathogenität des Virus beeinflussen. Hierzu wurden der Ursprungsklon Akv λ -623, das Leukämievirus Akv1-99 und zehn Akv1-99 Virusmutanten mit spezifischen Punktmutationen in neugeborene NMRI-Inzuchtmäuse *i.p.* inokuliert und die Tumorentstehung untersucht.

Die Pathogenität muriner Leukämieviren und der Phänotyp des induzierten Tumors werden weitgehend von den LTRs kontrolliert (212). Als Ursachen für die lymphominduzierenden Eigenschaften nicht akut transformierender MLV werden mehrere Mechanismen diskutiert. Dazu zählen die direkte Beeinflussung der Wirtszelle durch die Virusreplikation, die Unterdrückung der Wirtsabwehr sowie die insertionelle Aktivierung von Protoonkogenen in der Zielzelle. Die Infektion einer Zelle mit einfachen Retroviren führt in der Regel zu einer chronisch infizierten Zelle, die zum Dauerausscheider von Nachkommenviren wird (42). Die Infektion der Mäuse führte in allen Fällen zur Virusreplikation und Vergrößerung hämatopoietischer und lymphatischer Organe. Bei vier von 323 infizierten Mäusen (1,2 %) konnte jedoch der Tumorverdacht histologisch nicht bestätigt werden. Zunächst ist festzuhalten, dass die hier untersuchten Mutationen im Enhancer zu keinem Pathogenitätsverlust führten. Bei näherer Betrachtung ließen sich aber interessante Veränderungen des induzierten Tumorspektrums und der Latenzzeiten feststellen.

4.3.1 Charakterisierung der Pathogenität von Akv λ -623

Akv λ -623 induzierte in NMRI-Inzuchtmäusen nach einer mittleren Latenzzeit von 184 ± 26 Tagen mit einer Inzidenz von 100 % hämatopoietische Neoplasien. Darunter waren Plasmozytome (35 %), diffus großzellige B-Zell-Lymphome (32,5 %), folliculäre B-Zell-Lymphome (22,5 %), splenische Marginalzonen-Lymphome (5 %), und kleinzellige B-Zell-Lymphome (5 %). In ähnlichen Studien mit NMRI-Auszuchtmäusen und Akv λ -623 lag die Latenzzeit bei 293 ± 91 Tagen und die Lymphominzidenz bei 76 % (31/41) (57) bzw. bei 249 ± 49 Tagen und einer Lymphominzidenz von 50 % (10/20) (203). Aus einer Untersuchung mit Akv λ -623-infizierten CWD-Mäusen ging hervor, dass ca. 75 % der Mäuse nach einer Latenzzeit von 372 ± 62 Tagen Splenomegalie und Lymphadenopathie entwickelten (212). Detaillierte histologische Klassifizierungen wurden in diesen drei Arbeiten nicht

durchgeführt. Gimbel et al. (57) beobachteten eine primäre Lymphommanifestation in den Lymphknoten, der Milz und der Leber, nicht jedoch im Thymus, sodass sie schlussfolgerten, dass es sich vermutlich nicht um Thymus-Lymphome handelte. Thomas et al. (212) merkten an, dass der Thymus in nur wenigen Fällen vergrößert war. Durch die fehlende Information über die morphologische Klassifizierung der Neoplasien ist es leider nicht möglich, sie mit den hier erhobenen Daten zu vergleichen. Anzumerken ist jedoch, dass die in dieser Studie beobachteten Vergrößerungen des Thymus in der Gruppe Akv λ -623 nicht auf ein T-Zell-Lymphom zurückgingen, sondern ausschließlich durch massive B-Zell- und Plasmazellproliferationen bedingt waren. Ein direkter Vergleich der Latenzzeiten dieser drei Studien ist zudem schwierig, da die Kriterien zur Bestimmung der Latenz nicht identisch waren.

Zu den Arbeiten, die ausführlichere Informationen über die Morphologie von Akv-induzierten Tumoren enthalten, gehört eine Studie von Hori et al. (81), in der 703 NSF.V-Mäuse (kongen für Akv λ -623) untersucht wurden. Über Latenzzeiten wurden in dieser Arbeit keine Angaben gemacht. Neben wenigen T-Zell-Lymphomen, auf die nicht näher eingegangen wurde, stellten sie bei 85 % der Mäuse ein B-Zell-Lymphom fest. Am häufigsten entwickelten sich diffus großzellige B-Zell-Lymphome (39,6 %) und splenische Marginalzonen-Lymphome (31 %). Des Weiteren wurden kleinzellige B-Zell-Lymphome (9 %) und folliculäre B-Zell-Lymphome (6 %) diagnostiziert. Obwohl es sich bei NSF.V-Mäusen um einen anderen als in dieser Studie verwendeten Mausstamm handelt, lässt sich zumindest sagen, dass das Spektrum der induzierten Lymphome ähnlich ist. Eine weitere Studie beschreibt Akv λ -623-induzierte, tumoröse Erkrankungen nach einer Latenzzeit von 349 ± 150 Tagen (115). Bei 93 % der NMRI-Inzuchtmäuse (14/15) wurden überwiegend B-Zell-Lymphome diagnostiziert. Diese Studie umfasste Southern Blot Untersuchungen für das IgH- und Igk-Gen. In allen 11 analysierten Tumoren lag Klonalität vor.

4.3.2 Charakterisierung der Pathogenität von Akv1-99

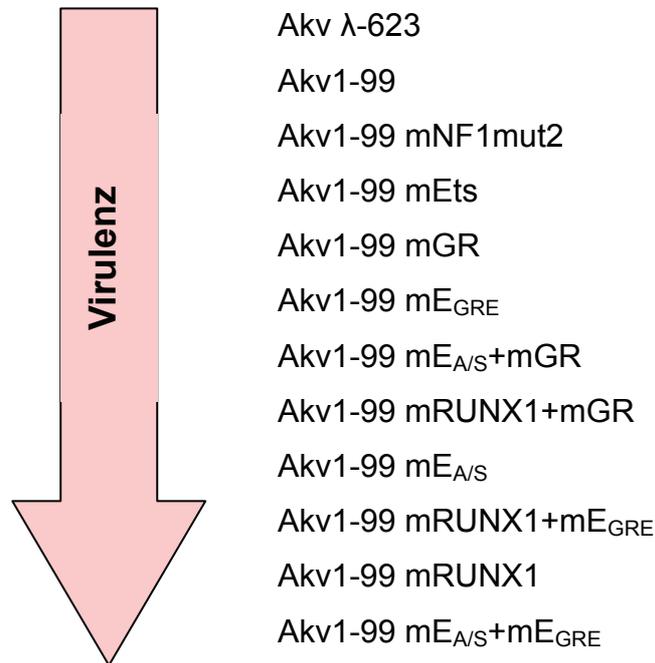
In den mit Akv1-99 infizierten Mäusen entwickelten sich nach einer Latenzzeit von 180 ± 22 Tagen Plasmozytome (77,1 %), diffus großzellige B-Zell-Lymphome (18,8 %), splenische Marginalzonen-Lymphome (8,3 %), folliculäre B-Zell-Lymphome (6,3 %), kleinzellige B-Zell-Lymphome (2,1 %) und Vorläufer-T-Zell lymphoblastische Lymphome (4,2 %). Der größte Unterschied zu Akv λ -623 lag in dem höheren Anteil

an Plasmazytomen bei Akv1-99 (77,1 % versus 35 %). In einer vergleichbaren Studie induzierte Akv1-99 bei 14 von 15 Mäusen nach einer Latenzzeit von 349 ± 50 Tagen überwiegend B-Zell-Lymphome. Bei 11 von 13 Tumoren waren der IgH-Lokus und bei 10 von 13 waren der Igk-Lokus klonal rearrangiert (115). Das Fehlen eines 99 bp Repeats hatte offensichtlich nur eine geringe Auswirkung auf die Pathogenität des Virus. Die Latenzzeiten in den Gruppen Akv λ -623 und Akv1-99 sind nahezu identisch. Expressionsstudien zeigten, dass Akv und Akv1-99 gleichermaßen stark in einer Plasmazytom-Zelllinie (MPC11) exprimiert wurden, was ein Hinweis darauf ist, dass die Abwesenheit dieser zweiten 99 bp-Sequenz im Enhancer nicht essentiell für die Regulation der Virusexpression und Virusreplikation ist (199). Aufgrund der Tatsache, dass Akv λ -623 und Akv1-99 vergleichbare pathogene Eigenschaften und gleiche Latenzzeiten haben, wurde für Mutationen im Enhancerbereich ausschließlich Akv1-99 verwendet.

4.3.3 Bedeutung der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für die Pathogenität

Die Pathogenität der verschiedenen Virusmutanten ist in den Abbildungen 32 und 33 dargestellt. Daraus geht eindeutig hervor, dass Mutationen im Enhancerbereich von Akv1-99 zu einer deutlichen Verschiebung des induzierten Tumorspektrums führten. Während Akv λ -623 und Akv1-99 eine breite Palette an B-Zell-Lymphomen induziert, wurden bei den Mutanten fast ausschließlich Plasmazytome klassifiziert. Verglichen mit Akv λ -623, das in 35 % der Fälle Plasmazytome induzierte, führte bereits die Deletion des 99 bp Repeats bei Akv1-99 zu einer Verdopplung der Plasmazytominzidenz (77,1 %), welche sogar auf 90 bis 100 % bei den Viren mit den gezielten Punktmutationen führte. Interessanterweise wiesen die Mutanten Akv1-99 mGR, Akv1-99 mE_{AS}+mGR, Akv1-99 mRUNX1, Akv1-99 E_{GRE} und Akv1-99 mE_{AS} eine signifikant kürzere Latenzzeit als Akv1-99 auf. Auffällig ist, dass die Mutanten Akv1-99 mEts und Akv1-99 mNF1mut2 mit ähnlichen Latenzzeiten wie Akv1-99 ein größeres Tumorspektrum als andere Mutanten mit Punktmutationen induzierten. Des Weiteren führten Mutationen in Kombination mit einer Mutation im E_{GRE}-Bereich, wie bei Akv1-99 mE_{AS}+mE_{GRE} und Akv1-99 mRUNX1+mE_{GRE}, zu einer deutlich verlängerten Latenzzeit gegenüber den Einzelmutanten. Als Kriterien für die Pathogenität wurden die Latenzzeit, das Tumorspektrum und die Inzidenz berücksichtigt. Gewichtet man die Fähigkeit zur mannigfaltigen Tumormanifestation

am stärksten und berücksichtigt zusätzlich die Latenzzeit und Inzidenz, resultiert für die untersuchten Viren die folgende Auflistung mit abnehmender Virulenz:



Die in dieser Studie untersuchten 12 Viren lassen sich in drei Gruppen einteilen, die sich über die Latenzzeiten und das Tumorspektrum des Virus definieren.

Gruppe I: Sechs Viren (Akv1-99 mGR, Akv1-99 mE_{A/S}+mGR, Akv1-99 mRUNX1, Akv1-99 mE_{GRE}, Akv1-99 mE_{A/S} und Akv1-99 mRUNX1+mGR) führten interessanter Weise schneller zur Tumorentwicklung als Akv1-99. Es wäre möglich, dass die Mutationen dieser Viren einen stärkeren Einfluss auf die Virusexpression in der Wirtszelle und auf das hämatopoietische System, d.h. auf die immunologische Reaktion der Mäuse hatten und sie somit die Entstehung von oligoklonalen und klonalen Populationen in einem kürzeren Zeitintervall begünstigen. In ihrer Fähigkeit, ein breites Tumorspektrum zu induzieren, waren sie jedoch stark eingeschränkt.

Gruppe II: Akv λ -623, Akv1-99, Akv1-99 mNF1mut2 und Akv1-99 mEts wiesen eine vergleichbare Latenzzeit und ein relativ breites Tumorspektrum auf. Im Vergleich zu Akv λ -623 scheint eine Deletion im Enhancerbereich wie bei Akv1-99 maßgeblich zu einer Verschiebung von B-Zell-Lymphomen zugunsten von Plasmozytomen verantwortlich zu sein. Während Akv λ -623 hauptsächlich diffus

großzellige B-Zell-Lymphome, folliculäre B-Zell-Lymphome und Plasmazytome induziert, stieg der Anteil von Plasmazytomen bei Akv1-99 um 42,1 % auf 77,1 % an. Bei Akv mit einem verkürzten Enhancer entwickeln sich demnach bevorzugt Tumore von Plasmazellen. Werden zusätzlich spezifische Mutationen bei einzelnen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen eingefügt, verschiebt sich das Tumorspektrum noch stärker zugunsten des Plasmazytoms. Die in dieser Studie untersuchten Plasmazytome entwickelten sich stufenweise. Einer polyklonalen reaktiven Plasmazellproliferation folgte eine oligoklonale Proliferation von Plasmazellen, aus der sich in der späten Latenzphase echte klonale Plasmazytome entwickeln. Diese Art der Plasmazytomentstehung lässt sich auch bei Akv λ -623 feststellen, jedoch vermag Akv λ -623 in 65 % der Fälle Neoplasien wie diffus großzellige B-Zell-Lymphome (32,5 %) und folliculäre B-Zell-Lymphome (22,5 %) zu induzieren, deren Entwicklung nicht aus einer fehlregulierten Immunantwort von retrovirusinfizierten Zellen resultierte sondern direkt aus einer malignen Zelle hervorging. Bei Akv-Mutanten ging dieses Potential zunehmend verloren. Am deutlichsten ist das bei den Gruppen Akv1-99 $mE_{A/S}+mE_{GRE}$ und Akv1-99 $mRUNX1+mE_{GRE}$ erkennbar, bei denen sich ausschließlich Plasmazytome entwickelten die zusätzlich eine längere Latenzzeit als Akv1-99 aufwiesen.

Gruppe III: Die Doppelmutanten Akv1-99 $mE_{A/S}+mE_{GRE}$ und Akv1-99 $mRUNX1+mE_{GRE}$ hatten im Vergleich zu Akv1-99 eine längere Latenzzeit. Als Einzelmutanten führten diese Viren nach kürzerer Latenzzeit als Akv1-99 zur Tumormanifestation. Eine Zweifachmutation mit mE_{GRE} führte zu den längsten in dieser Studie beobachteten Latenzzeiten. Doppelmutationen, die den Bereich E_{GRE} mit einschlossen, schienen unter den hier untersuchten Viren die schwächste Wirkung auf das hämatopoietische System zu haben.

Die Auswirkungen von Mutationen von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Akv Enhancer unterscheiden sich grundlegend von denen bei SL3-3. SL3-3 ist ein, dem Akv verwandtes, murines Leukämievirus und induziert nach Inokulation bei Mäusen innerhalb eines halben Jahres ausschließlich T-Zell-Lymphome (39, 101, 198). Der Enhancerbereich von SL3-3 enthält im Gegensatz zum Akv zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor RUNX (229). Während Mutationen beider RUNX-Bindungsgebiete bei SL3-3 zu einer verlängerten Latenzzeit und zu einer großen

Anzahl von Tumorarten führten (198), ging die Mutation im RUNX1-Bereich bei Akv mit einer verkürzten Latenzzeit und einer eingeschränkten Fähigkeit ein breites Tumorspektrum zu induzieren einher (Sørensen et al. Manuskript in Vorbereitung). Um die Regulationsmechanismen bei der Tumorentstehung in diesen beiden Modellsystemen näher erklären zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Neben morphologisch monotonen Plasmozytomen wurden in dieser Arbeit Plasmozytome mit zusätzlichen Befunden beschrieben. Von besonderem Interesse waren hierbei Plasmozytome mit dysplastischer Erythropoiese und Plasmozytome mit verstärkter extramedullärer Hämatopoiese. Für die zwei Retroviren Moloney MLV und Rauscher MLV Variante A wurden zwar keine Plasmozytome, aber eine Störung der Hämatopoiese beschrieben. Bei Moloney MLV scheint eine generalisierte hämatopoietische Hyperplasie ein notwendiges Ereignis vor der T-Zell-Lymphommanifestation zu sein (30). Nach einer ersten Infektionswelle von hämatopoietischen Zellen kommt es zur hämatopoietischen Hyperplasie. In einer zweiten Infektionswelle kommt es in T-Lymphozyten zu proviralen Insertionen, die durch die Aktivierung der LTRs Einfluss auf zelluläre Protoonkogene haben. Interessanterweise waren in der vorliegenden Studie die mittleren Latenzzeiten für Plasmozytome mit starker Hämatopoiese und mit dysplastischer Erythropoiese kürzer, als die Latenzzeiten der Plasmozytome ohne diese zusätzlichen Befunde. Die Frage, ob Störungen in der Hämatopoiese möglicherweise bei alle Mäusen in einer frühen Phase der Plasmozytomentwicklung aufgetreten sind, lässt sich nachträglich nicht klären. Zwei weitere Arbeiten beschreiben eine durch das nicht akut transformierende murine Rauscher Leukämie Virus Variante A (RLV-A) induzierte Störung der Erythropoiese. Dieses Virus führte in BALB/c-Mäusen, wahrscheinlich durch einen Reifungsblock in infizierten Erythrozytenvorläuferzellen, zu einer tödlichen Anämie (223). In der Milz und in der Leber lag bei diesen Mäusen eine massive Erythroblastose vor. Gleichzeitig fehlte eine kompensatorische Retikulozytenfraktion im Blut. Dieser Phänotyp konnte experimentell variiert werden. Durch eine Suppression der Erythropoiese mit anschließender Virusinfektion traten Krankheitssymptome erst vier Monate später als in der regulär infizierten Vergleichsgruppe auf. Nach einer massiven Aktivierung der Erythropoiese durch eine experimentell induzierte Anämie, war ein deutlicher Rückgang an erkrankten Mäusen zu verzeichnen. Eine weitere Arbeit über das RLV-A beschreibt während des

Krankheitsverlaufs einen dramatischen Rückgang an erythroiden "Colony Forming Units" (CFU-E) und erythroiden "Blast Forming Units" (BFU-E) im Knochenmark bei gleichzeitigem Anstieg von CFU-E und BFU-E in der Milz (46). Für die Interpretation verstärkter extramedullären Hämatopoiese bei Akv-infizierten Mäusen, wäre es in weiteren Studien hilfreich, Daten über den Status der Blutbildung im Knochenmark sowie über die zelluläre Komponente des Blutes zu erheben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Enhancer des Akv eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielen und Einfluss auf die Latenzzeiten der durch das Virus induzierten hämatopoietischen Neoplasien haben. Die Plasmozytome, die in dieser Studie von Akv λ -623 und Akv-Mutanten induziert worden waren, stellen eine bislang weitgehend unbekannt Form muriner Plasmozytome dar und eröffnen neue Möglichkeiten, die Pathogenese von retrovirusinduzierten Plasmazellneoplasien detaillierter zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Das murine Leukämievirus Akv erzeugt in neugeborenen NMRI-Mäusen Lymphome. Der innerhalb des Long Terminal Repeats in der U3-Sequenz lokalisierte Enhancer von Akv, wird als wesentlicher Regulator der Tumorinduktion angesehen. In dieser Studie wurde die Pathogenität des Wildtyp Akv, des Akv1-99 (einem Akv mit nur einer 99 bp langen Sequenz in der U3-Region) sowie von zehn Akv1-99 Mutanten, die zusätzlich eine Reihe von Basensubstituierungen in verschiedenen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen aufwiesen, analysiert. Nach der Etablierung eines immunhistochemischen Antikörperpanels zur Diagnostik muriner hämatopoietischer Neoplasien und der Etablierung der auf einer PCR basierenden IgH-Fragmentanalyse, wurden die retrovirusinduzierten Tumore entsprechend den "Bethesda Proposals" (94, 138) klassifiziert. Alle untersuchten Viren waren pathogen, jedoch zeigten die Mutanten veränderte Latenzzeiten und Gewebsspezifität. Akv induzierte diffus großzellige B-Zell-Lymphome (32,5 %), folliculäre B-Zell-Lymphome (22,5 %), splenische Marginalzonen-Lymphome (5 %), kleinzellige B-Zell-Lymphome und Plasmazytome (35 %). Virusmutanten induzierten fast ausschließlich Plasmazytome (bis 100 %). Drei Mutanten hatten eine dem Wildtypvirus vergleichbare Latenzzeit. Sechs Mutanten zeigten eine kürzere Latenzzeit als das Wildtypvirus (davon waren bei fünf Mutanten die Latenzzeiten signifikant kürzer). Beide Doppelmutanten, die den Bereich E_{GRE} mit einschlossen, zeigten, im Vergleich zum Wildtypvirus, eine signifikant verlängerte Latenzzeit.

Die histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung der 323 analysierten hämatopoietischen Neoplasien erbrachte 83,8 % Plasmazytome, 6,9 % diffus großzellige B-Zell-Lymphome, 4,5 % folliculäre B-Zell-Lymphome, 4,2 % splenische Marginalzonen-Lymphome, jeweils 1,2 % kleinzellige B-Zell-Lymphome und akute myeloische Leukämien und 0,9 % Vorläufer-T-Zell lymphoblastische Lymphome. Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Enhancer für die Pathogenität und Gewebsspezifität von Akv hin. Dieses Modell ist geeignet, Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen murinen und humanen hämatopoietischen Neoplasien und deren Klassifikation detailliert herauszuarbeiten.

6 Englische Zusammenfassung

Histological, immunohistochemical and molecular biological characterisation of retrovirus-induced murine haematopoietic neoplasms

The murine leukaemia virus Akv has lymphomagenic properties in newborn inbred NMRI mice. The enhancer in the U3 long terminal repeat sequence of the Akv genome is a major determinant of retroviral lymphomagenesis. In this study, the pathogenicity of wild-type Akv, Akv1-99, an Akv lacking one 99 bp repeat in the U3 sequence, and a panel of ten Akv1-99 mutants containing mutations in the different transcription factor binding sites, was analysed. The retrovirus-induced haematopoietic tumours were classified according to the Bethesda Proposals (94, 138), based on histological and immunohistochemical analyses, and IgH gene rearrangements. All viruses were pathogenic. Tumour incidence ranged from 90 % to 100 %. The mutant viruses, however, differed in their latency periods and tissue specificity. Akv induced diffuse large B-cell lymphomas (32.5 %), follicular B-cell lymphomas (22.5 %), splenic marginal zone lymphomas (5 %), small B-cell lymphomas (5 %), and plasmacytomas (35 %). The mutant viruses induced almost exclusively plasmacytomas (up to 100 %). The latency periods of three mutant viruses were comparable to that of Akv; six mutant viruses showed a shorter latency (five latency periods were significantly shorter), and two mutant viruses with an additional mutation in the E_{GRE} binding site induced tumours after significantly prolonged latency. These results suggest that mutations of transcription factor binding sites in the Akv enhancer maintained the pathogenicity of the viruses but resulted in a smaller spectrum of haematopoietic tumours with different impact on the latency.

Comprehensive histological, immunohistochemical, and molecular analyses of 323 retrovirus-induced haematopoietic tumours (83.8 % plasmacytomas, 6.9 % diffuse large B-cell lymphomas, 4.5 % follicular B-cell lymphomas, 4.2 % splenic marginal zone lymphomas, 1.2 % small B-cell lymphomas, 1.2 % acute myeloid leukaemias, and 0.9 % precursor-T-cell lymphoblastic lymphomas) illustrated the importance of transcription factor binding sites of Akv and its impact on viral virulence and disease specificity. This model facilitates the dissection of disease-determining sequences in the retroviral genome and discloses differences and similarities between human and murine haematopoietic neoplasms.

7 Literaturverzeichnis

1. 1982. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* **49**:2112-35.
2. **Abelson, H. T., and L. S. Rabstein.** 1970. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res* **30**:2213-22.
3. **Albritton, L. M., J. W. Kim, L. Tseng, and J. M. Cunningham.** 1993. Envelope-binding domain in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses. *J Virol* **67**:2091-6.
4. **Attie, E.** 1966. [Proposal of an international classification of Hodgkin's disease]. *Rev Med Moyen Orient* **23**:200-4.
5. **Barcus, M. E., L. S. Karageorge, Y. L. Veloso, and M. J. Kornstein.** 2000. CD10 expression in follicular lymphoma versus reactive follicular hyperplasia: evaluation in paraffin-embedded tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **8**:263-6.
6. **Beasley, B. E., and W. S. Hu.** 2002. cis-Acting elements important for retroviral RNA packaging specificity. *J Virol* **76**:4950-60.
7. **Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan.** 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**:451-8.
8. **Berglund, M., U. Thunberg, R. M. Amini, M. Book, G. Roos, M. Erlanson, J. Linderoth, M. Dictor, M. Jerkeman, E. Cavallin-Stahl, C. Sundstrom, S. Rehn-Eriksson, C. Backlin, H. Hagberg, R. Rosenquist, and G. Enblad.** 2005. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol* **18**:1113-20.
9. **Blair, D. G., and M. Athanasiou.** 2000. Ets and retroviruses - transduction and activation of members of the Ets oncogene family in viral oncogenesis. *Oncogene* **19**:6472-81.
10. **Boenisch, T.** 2001. Background, p. 34-38. *In* T. Boenisch (ed.), *Handbook Immunochemical Staining Methods*, 3rd ed. DAKO Corporation, Carpinteria.
11. **Bowerman, B., P. O. Brown, J. M. Bishop, and H. E. Varmus.** 1989. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev* **3**:469-78.
12. **Brown, R. W., and R. Chirala.** 1995. Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* **8**:515-20.
13. **Caliendo, M., D. Radic, and S. L. Thomsen** 2002, posting date. SAS Statistical Analysis System; Eine erste anwendungsorientierte Einführung für Ökonometriker. [Online.]
14. **Cameron, E. R., and J. C. Neil.** 2004. The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. *Oncogene* **23**:4308-14.
15. **Canela, A., J. Martin-Caballero, J. M. Flores, and M. A. Blasco.** 2004. Constitutive expression of tert in thymocytes leads to increased incidence and dissemination of T-cell lymphoma in Lck-Tert mice. *Mol Cell Biol* **24**:4275-93.
16. **Cattoretti, G., L. Pasqualucci, G. Ballon, W. Tam, S. V. Nandula, Q. Shen, T. Mo, V. V. Murty, and R. Dalla-Favera.** 2005. Deregulated BCL6

- expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* **7**:445-55.
17. **Celander, D., B. L. Hsu, and W. A. Haseltine.** 1988. Regulatory elements within the murine leukemia virus enhancer regions mediate glucocorticoid responsiveness. *J Virol* **62**:1314-22.
 18. **Chadburn, A., C. Metroka, and J. Mouradian.** 1989. Progressive lymph node histology and its prognostic value in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. *Hum Pathol* **20**:579-87.
 19. **Charles A. Janeway, P. T., Mark Walport.** 2004. *Immunobiology*, 6th ed. Churchill Livingstone.
 20. **Chatis, P. A., C. A. Holland, J. E. Silver, T. N. Frederickson, N. Hopkins, and J. W. Hartley.** 1984. A 3' end fragment encompassing the transcriptional enhancers of nondefective Friend virus confers erythroleukemogenicity on Moloney leukemia virus. *J Virol* **52**:248-54.
 21. **Chattopadhyay, S. K., D. R. Lowy, N. M. Teich, A. S. Levine, and W. P. Rowe.** 1975. Qualitative and quantitative studies of AKR-type murine leukemia virus sequences in mouse DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **39 Pt 2**:1085-101.
 22. **Cheung, W. C., J. S. Kim, M. Linden, L. Peng, B. Van Ness, R. D. Polakiewicz, and S. Janz.** 2004. Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest* **113**:1763-73.
 23. **Chu, A. C., and D. M. MacDonald.** 1979. Identification in situ of T lymphocytes in the dermal and epidermal infiltrates of mycosis fungoides. *Br J Dermatol* **100**:177-82.
 24. **Clynes, R., J. Wax, L. W. Stanton, S. Smith-Gill, M. Potter, and K. B. Marcu.** 1988. Rapid induction of IgM-secreting murine plasmacytomas by pristane and an immunoglobulin heavy-chain promoter/enhancer-driven c-myc/v-Ha-ras retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:6067-71.
 25. **Coffin, J. M.** 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview.
 26. **Coffin, J. M., J. P. Stoye, and W. N. Frankel.** 1989. Genetics of endogenous murine leukemia viruses. *Ann N Y Acad Sci* **567**:39-49.
 27. **Colomo, L., F. Loong, S. Rives, S. Pittaluga, A. Martinez, A. Lopez-Guillermo, J. Ojanguren, V. Romagosa, E. S. Jaffe, and E. Campo.** 2004. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol* **28**:736-47.
 28. **Cory, S., A. W. Harris, and A. Strasser.** 1994. Insights from transgenic mice regarding the role of bcl-2 in normal and neoplastic lymphoid cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **345**:289-95.
 29. **Czader, M., J. Mazur, M. Pettersson, J. Liliemark, M. Stromberg, B. Christensson, B. Tribukait, G. Auer, A. Ost, and A. Porwit.** 1996. Prognostic significance of proliferative and apoptotic fractions in low grade follicle center cell-derived non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* **77**:1180-8.
 30. **Davis, B. R., B. K. Brightman, K. G. Chandy, and H. Fan.** 1987. Characterization of a preleukemic state induced by Moloney murine leukemia virus: evidence for two infection events during leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:4875-9.
 31. **Dejardin, J., G. Bompard-Marechal, M. Audit, T. J. Hope, M. Sitbon, and M. Mougel.** 2000. A novel subgenomic murine leukemia virus RNA transcript results from alternative splicing. *J Virol* **74**:3709-14.

32. **Deringer, M. K.** 1962. Development of tumors, especially mammary tumors, in agent-free strain DBA/2eB mice. *J Natl Cancer Inst* **28**:203-10.
33. **Deringer, M. K.** 1959. Occurrence of tumors, particularly mammary tumors, in agentfree strain C3HeB mice. *J Natl Cancer Inst* **22**:995-1002.
34. **Dittmer, J.** 2003. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* **2**:29.
35. **Dunn, T. B.** 1954. Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. *J Natl Cancer Inst* **14**:1281-433.
36. **Eason, D. D., C. LeBron, D. Coppola, L. C. Moscinski, S. Livingston, E. T. Sutton, and G. Blanck.** 2003. Development of CD30+ lymphoproliferative disease in mice lacking interferon regulatory factor-1. *Oncogene* **22**:6166-76.
37. **Egle, A., A. W. Harris, M. L. Bath, L. O'Reilly, and S. Cory.** 2004. VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* **103**:2276-83.
38. **Ethelberg, S., B. Hallberg, J. Lovmand, J. Schmidt, A. Luz, T. Grundstrom, and F. S. Pedersen.** 1997. Second-site proviral enhancer alterations in lymphomas induced by enhancer mutants of SL3-3 murine leukemia virus: negative effect of nuclear factor 1 binding site. *J Virol* **71**:1196-206.
39. **Ethelberg, S., J. Lovmand, J. Schmidt, A. Luz, and F. S. Pedersen.** 1997. Increased lymphomagenicity and restored disease specificity of AML1 site (core) mutant SL3-3 murine leukemia virus by a second-site enhancer variant evolved in vivo. *J Virol* **71**:7273-80.
40. **Ethelberg, S., B. D. Tzschaschel, A. Luz, S. J. Diaz-Cano, F. S. Pedersen, and J. Schmidt.** 1999. Increased induction of osteopetrosis, but unaltered lymphomagenicity, by murine leukemia virus SL3-3 after mutation of a nuclear factor 1 site in the enhancer. *J Virol* **73**:10406-15.
41. **Faccini, J., D. Abbott, and G. Paulus.** 1990. *Mouse Histopathology*, p. 18-36. Elsevier, Amsterdam.
42. **Fan, H.** 1997. Leukemogenesis by Moloney murine leukemia virus: a multistep process. *Trends Microbiol* **5**:74-82.
43. **Farmilo, A. J., R. H. Stead, and K. N. Atwood.** 2001. Fixation, p. 18-22. *In* T. Boenisch (ed.), *Handbook Immunohistochemical Staining Methods*, 3rd ed. DAKO Corporation, Carpinteria.
44. **Faxvaag, A., T. Moen, and A. B. Dalen.** 1993. Polyclonal activation of B-lymphocytes and induction of autoimmunity in retrovirus infected NMRI mice. *Scand J Immunol* **38**:459-62.
45. **Felgar, R. E.** 2001. Murine lymphomas: are there counterparts in the revised European-American classification of lymphoid neoplasms? *Leuk Res* **25**:1029-30.
46. **Ferdinand, P. M., J. LoBue, J. D. Lutton, A. Weitz-Hamburger, and T. N. Fredrickson.** 1985. Erythroid progenitors in Rauscher leukemia virus variant-A-induced erythropoietic dysplasia in mice. *Exp Hematol* **13**:719-21.
47. **Finke, D., F. Baribaud, H. Diggelmann, and H. Acha-Orbea.** 2001. Extrafollicular plasmablast B cells play a key role in carrying retroviral infection to peripheral organs. *J Immunol* **166**:6266-75.
48. **Fredrickson, T. N., J. W. Hartley, H. C. Morse, 3rd, S. K. Chattopadhyay, and K. Lennert.** 1995. Classification of mouse lymphomas. *Curr Top Microbiol Immunol* **194**:109-16.

49. **Fredrickson, T. N., K. Lennert, S. K. Chattopadhyay, H. C. Morse, 3rd, and J. W. Hartley.** 1999. Splenic marginal zone lymphomas of mice. *Am J Pathol* **154**:805-12.
50. **Fredrickson, T. N., H. C. Morse, 3rd, R. A. Yetter, W. P. Rowe, J. W. Hartley, and P. K. Pattengale.** 1985. Multiparameter analyses of spontaneous nonthymic lymphomas occurring in NFS/N mice congenic for ecotropic murine leukemia viruses. *Am J Pathol* **121**:349-60.
51. **Fredrickson, T. N., Y. Tang, S. K. Chattopadhyay, H. C. Morse, 3rd, and J. W. Hartley.** 1993. Retrovirus-induced lymphoproliferation as a model for developing diagnostic criteria for malignant lymphoma in mice. *Toxicol Pathol* **21**:219-28.
52. **Friend, C.** 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* **105**:307-18.
53. **Frith, C. H., T. M. Davis, L. A. Zolotor, and J. W. Townsend.** 1980. Histiocytic lymphoma in the mouse. *Leuk Res* **4**:651-62.
54. **Frith, C. H., J. M. Ward, and M. Chandra.** 1993. The morphology, immunohistochemistry, and incidence of hematopoietic neoplasms in mice and rats. *Toxicol Pathol* **21**:206-18.
55. **Frith, C. H., and L. D. Wiley.** 1981. Morphologic classification and correlation of incidence of hyperplastic and neoplastic hematopoietic lesions in mice with age. *J Gerontol* **36**:534-45.
56. **Gifford, R., and M. Tristem.** 2003. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* **26**:291-315.
57. **Gimbel, W., J. Schmidt, R. Brack-Werner, A. Luz, P. G. Strauss, V. Erfle, and T. Werner.** 1996. Molecular and pathogenic characterization of the RFB osteoma virus: lack of oncogene and induction of osteoma, osteopetrosis, and lymphoma. *Virology* **224**:533-8.
58. **Golay, J., M. Introna, and T. Graf.** 1988. A single point mutation in the v-ets oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell differentiation. *Cell* **55**:1147-58.
59. **Golemis, E. A., N. A. Speck, and N. Hopkins.** 1990. Alignment of U3 region sequences of mammalian type C viruses: identification of highly conserved motifs and implications for enhancer design. *J Virol* **64**:534-42.
60. **Graham, F. L., and A. J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456-67.
61. **Greene, W. C.** 1993. AIDS and the immune system. *Sci Am* **269**:98-105.
62. **Gronostajski, R. M., S. Adhya, K. Nagata, R. A. Guggenheimer, and J. Hurwitz.** 1985. Site-specific DNA binding of nuclear factor I: analyses of cellular binding sites. *Mol Cell Biol* **5**:964-71.
63. **Gross, L.** 1955. [Is mouse leukemia due to a virus? New experiments on transmission of leukemia in the mouse by filtered extract.]. *Rev Hematol* **10**:509-15.
64. **Haas, M., and A. Meshorer.** 1979. Reticulum cell neoplasms induced in C57BL/6 mice by cultured virus grown in stromal hematopoietic cell lines. *J Natl Cancer Inst* **63**:427-39.
65. **Hallberg, B., and T. Grundstrom.** 1988. Tissue specific sequence motifs in the enhancer of the leukaemogenic mouse retrovirus SL3-3. *Nucleic Acids Res* **16**:5927-44.
66. **Hallberg, B., J. Schmidt, A. Luz, F. S. Pedersen, and T. Grundstrom.** 1991. SL3-3 enhancer factor 1 transcriptional activators are required for tumor formation by SL3-3 murine leukemia virus. *J Virol* **65**:4177-81.

-
67. **Hans, C. P., D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, R. D. Gascoyne, J. Delabie, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, E. Campo, R. M. Braziel, E. S. Jaffe, Z. Pan, P. Farinha, L. M. Smith, B. Falini, A. H. Banham, A. Rosenwald, L. M. Staudt, J. M. Connors, J. O. Armitage, and W. C. Chan.** 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**:275-82.
 68. **Harris, N. L., E. S. Jaffe, H. Stein, P. M. Banks, J. K. Chan, M. L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peeters, B. Falini, K. C. Gatter, and et al.** 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**:1361-92.
 69. **Hartley, J. W., S. K. Chattopadhyay, M. R. Lander, L. Taddesse-Heath, Z. Naghashfar, H. C. Morse, 3rd, and T. N. Fredrickson.** 2000. Accelerated appearance of multiple B cell lymphoma types in NFS/N mice congenic for ecotropic murine leukemia viruses. *Lab Invest* **80**:159-69.
 70. **Hartley, J. W., and W. P. Rowe.** 1976. Naturally occurring murine leukemia viruses in wild mice: characterization of a new "amphotropic" class. *J Virol* **19**:19-25.
 71. **Hartley, J. W., N. K. Wolford, L. J. Old, and W. P. Rowe.** 1977. A new class of murine leukemia virus associated with development of spontaneous lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:789-92.
 72. **Hays, E. F., and D. L. Vredevoe.** 1977. A discrepancy in XC and oncogenicity assays for murine leukemia virus in AKR mice. *Cancer Res* **37**:726-30.
 73. **Herr, W.** 1984. Nucleotide sequence of AKV murine leukemia virus. *J Virol* **49**:471-8.
 74. **Herr, W., V. Corbin, and W. Gilbert.** 1982. Nucleotide sequence of the 3' half of AKV. *Nucleic Acids Res* **10**:6931-44.
 75. **Herr, W., D. Schwartz, and W. Gilbert.** 1983. Isolation and mapping of cDNA hybridization probes specific for ecotropic and nonectropic murine leukemia proviruses. *Virology* **125**:139-54.
 76. **Heston, W. E., G. Vlahakis, and Y. Tsubura.** 1964. Strain Dd, a New High Mammary Tumor Strain, and Comparison of Dd with Strain C3h. *J Natl Cancer Inst* **32**:237-51.
 77. **Hilbert, D. M., M. Kopf, B. A. Mock, G. Kohler, and S. Rudikoff.** 1995. Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J Exp Med* **182**:243-8.
 78. **Hilkens, J., A. Colombatti, M. Strand, E. Nichols, F. H. Ruddle, and J. Hilgers.** 1979. Identification of a mouse gene required for binding of Rauscher MuLV envelope gp70. *Somatic Cell Genet* **5**:39-49.
 79. **Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber, and S. J. Korsmeyer.** 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**:334-6.
 80. **Hori, M., C. F. Qi, T. A. Torrey, K. Huppi, and H. C. Morse, 3rd.** 2002. The Bcl6 locus is not mutated in mouse B-cell lineage lymphomas. *Leuk Res* **26**:739-43.
 81. **Hori, M., S. Xiang, C. F. Qi, S. K. Chattopadhyay, T. N. Fredrickson, J. W. Hartley, A. L. Kovalchuk, G. W. Bornkamm, S. Janz, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. M. Ward, and H. C. Morse, 3rd.** 2001. Non-Hodgkin lymphomas of mice. *Blood Cells Mol Dis* **27**:217-22.

82. **Huang, S. Y., H. F. Tien, F. H. Su, and S. M. Hsu.** 2004. Nonirradiated NOD/SCID-human chimeric animal model for primary human multiple myeloma: a potential in vivo culture system. *Am J Pathol* **164**:747-56.
83. **Ichikawa, M., T. Asai, S. Chiba, M. Kurokawa, and S. Ogawa.** 2004. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle* **3**:722-4.
84. **Ichikawa, M., T. Asai, T. Saito, G. Yamamoto, S. Seo, I. Yamazaki, T. Yamagata, K. Mitani, S. Chiba, H. Hirai, S. Ogawa, and M. Kurokawa.** 2004. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* **10**:299-304.
85. **Ihle, J. N., and D. R. Joseph.** 1978. Genetic analysis of the endogenous C3H murine leukemia virus genome: evidence for one locus unlinked to the endogenous murine leukemia virus genome of C57BL/6 mice. *Virology* **87**:298-306.
86. **Ihle, J. N., and D. R. Joseph.** 1978. Serological and virological analysis of NIH (NIH X AKR) mice: evidence for three AKR murine leukemia virus loci. *Virology* **87**:287-97.
87. **J. Han J. M. von Kriecken, J. t. V.** 1992. Spleen, p. 253-260. *In* S. S. Sternberg (ed.), *Histology for Pathologists*. Raven Press, New York.
88. **Jacobsen, M., P. P. Clausen, and S. Smidth.** 1980. The effect of fixation and trypsinization on the immunohistochemical demonstration of intracellular immunoglobulin in paraffin embedded material. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* **88**:369-76.
89. **Jaffe, E., N. Harris, H. Stein, J. Vardiman, and (Eds.).** 2001. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon.
90. **Juan Rosai, L. V. A.** 2004. Lymph Nodes, p. 1877-2017. *In* J. Rosai (ed.), *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, 9th ed, vol. 2. Mosby, New York.
91. **Kaplan, H. S.** 1967. On the natural history of the murine leukemias: presidential address. *Cancer Res* **27**:1325-40.
92. **Kawamoto, H., T. Ikawa, K. Ohmura, S. Fujimoto, and Y. Katsura.** 2000. T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver. *Immunity* **12**:441-50.
93. **Klinken, S. P., T. N. Fredrickson, J. W. Hartley, R. A. Yetter, and H. C. Morse, 3rd.** 1988. Evolution of B cell lineage lymphomas in mice with a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome, MAIDS. *J Immunol* **140**:1123-31.
94. **Kogan, S. C., J. M. Ward, M. R. Anver, J. J. Berman, C. Brayton, R. D. Cardiff, J. S. Carter, S. de Coronado, J. R. Downing, T. N. Fredrickson, D. C. Haines, A. W. Harris, N. L. Harris, H. Hiai, E. S. Jaffe, I. C. MacLennan, P. P. Pandolfi, P. K. Pattengale, A. S. Perkins, R. M. Simpson, M. S. Tuttle, J. F. Wong, and H. C. Morse, 3rd.** 2002. Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood* **100**:238-45.
95. **Konikova, E., and J. Kusenda.** 2001. P53 protein expression in human leukemia and lymphoma cells. *Neoplasma* **48**:290-8.
96. **Kovalchuk, A. L., J. S. Kim, S. S. Park, A. E. Coleman, J. M. Ward, H. C. Morse, 3rd, T. Kishimoto, M. Potter, and S. Janz.** 2002. IL-6 transgenic mouse model for extraosseous plasmacytoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1509-14.

97. **Kremer, M., A. D. Cabras, F. Fend, S. Schulz, K. Schwarz, H. Hoefler, and M. Werner.** 2000. PCR analysis of IgH-gene rearrangements in small lymphoid infiltrates microdissected from sections of paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Hum Pathol* **31**:847-53.
98. **Kusic, B., M. Dominis, S. Dzebro, and M. Antica.** 2003. Molecular insight into the diagnosis of lymphoma. *Int J Mol Med* **12**:667-71.
99. **Lange, K., W. Uckert, T. Blankenstein, R. Nadrowitz, C. Bittner, J. C. Renaud, J. van Snick, A. C. Feller, and H. Merz.** 2003. Overexpression of NPM-ALK induces different types of malignant lymphomas in IL-9 transgenic mice. *Oncogene* **22**:517-27.
100. **Latarjet, R., and J. F. Duplan.** 1962. Experiment and discussion on leukaemogenesis by cell-free extracts of radiation-induced leukaemia in mice. *Int J Radiat Biol* **5**:339-44.
101. **Lawrenz-Smith, S. C., A. C. Massey, D. J. Innes, and C. Y. Thomas.** 1994. Pathogenic determinants in the U3 region of recombinant murine leukemia viruses isolated from CWD and HRS/J mice. *J Virol* **68**:5174-83.
102. **Leib-Mosch, C., J. Schmidt, M. Etzerodt, F. S. Pedersen, R. Hehlmann, and V. Erfle.** 1986. Oncogenic retrovirus from spontaneous murine osteomas. II. Molecular cloning and genomic characterization. *Virology* **150**:96-105.
103. **Lennert, K.** 1975. Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)* **Suppl 6**:1-16.
104. **Lennert, K., and N. Mohri.** 1974. [Histological classification and occurrence of Hodgkin's disease]. *Internist (Berl)* **15**:57-65.
105. **Lennert, K., H. Stein, and E. Kaiserling.** 1975. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer* **31 SUPPL 2**:29-43.
106. **Lenz, J., D. Celander, R. L. Crowther, R. Patarca, D. W. Perkins, and W. A. Haseltine.** 1984. Determination of the leukaemogenicity of a murine retrovirus by sequences within the long terminal repeat. *Nature* **308**:467-70.
107. **Lenz, J., and W. A. Haseltine.** 1983. Localization of the leukemogenic determinants of SL3-3, an ecotropic, XC-positive murine leukemia virus of AKR mouse origin. *J Virol* **47**:317-28.
108. **Leong, A. S., I. J. Forbes, P. A. Cowled, R. E. Sage, R. B. Black, B. Dale, and P. D. Zalewski.** 1979. Surface marker studies in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Pathology* **11**:461-71.
109. **Levy, J. A.** 1973. Xenotropic viruses: murine leukemia viruses associated with NIH Swiss, NZB, and other mouse strains. *Science* **182**:1151-3.
110. **Levy, R., R. Warnke, R. F. Dorfman, and J. Haimovich.** 1977. The monoclonality of human B-cell lymphomas. *J Exp Med* **145**:1014-28.
111. **Li, J., H. Shen, K. L. Himmel, A. J. Dupuy, D. A. Largaespada, T. Nakamura, J. D. Shaughnessy, Jr., N. A. Jenkins, and N. G. Copeland.** 1999. Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nat Genet* **23**:348-53.
112. **Long, R. E., G. Knutsen, and M. Robinson.** 1986. Myeloid hyperplasia in the SENCAR mouse: differentiation from granulocytic leukemia. *Environ Health Perspect* **68**:117-23.
113. **Look, A. T.** 1997. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**:1059-64.
114. **Lovmand, J.** 1996. Transcriptional control and pathogenicity of Akv murine leukemia virus. University of Aarhus, Aarhus.

115. **Lovmand, J., A. B. Sørensen, J. Schmidt, M. Ostergaard, A. Luz, and F. S. Pedersen.** 1998. B-Cell lymphoma induction by akv murine leukemia viruses harboring one or both copies of the tandem repeat in the U3 enhancer. *J Virol* **72**:5745-56.
116. **Lovmand, S., N. O. Kjeldgaard, P. Jorgensen, and F. S. Pedersen.** 1990. Enhancer functions in U3 of Akv virus: a role for cooperativity of a tandem repeat unit and its flanking DNA sequences. *J Virol* **64**:3185-91.
117. **Lowy, D. R., S. K. Chattopadhyay, N. M. Teich, W. P. Rowe, and A. S. Levine.** 1974. AKR murine leukemia virus genome: frequency of sequences in DNA of high-, low-, and non-virus-yielding mouse strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:3555-9.
118. **Lowy, D. R., E. Rands, S. K. Chattopadhyay, C. F. Garon, and G. L. Hager.** 1980. Molecular cloning of infectious integrated murine leukemia virus DNA from infected mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:614-8.
119. **Lukes, R. J., and J. J. Butler.** 1966. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res* **26**:1063-83.
120. **Lukes, R. J., and R. D. Collins.** 1974. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* **34**:suppl:1488-503.
121. **Lukes, R. J., and R. D. Collins.** 1975. New approaches to the classification of the lymphomata. *Br J Cancer* **31 SUPPL 2**:1-28.
122. **Lund, A. H., and M. van Lohuizen.** 2002. RUNX: a trilogy of cancer genes. *Cancer Cell* **1**:213-5.
123. **Lung, M. L., J. W. Hartley, W. P. Rowe, and N. H. Hopkins.** 1983. Large RNase T1-resistant oligonucleotides encoding p15E and the U3 region of the long terminal repeat distinguish two biological classes of mink cell focus-forming type C viruses of inbred mice. *J Virol* **45**:275-90.
124. **Macintyre, E., D. Willerford, and S. W. Morris.** 2000. Non-Hodgkin's Lymphoma: Molecular Features of B Cell Lymphoma. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*:180-204.
125. **Marcu, K. B., J. Banerji, N. A. Penncavage, R. Lang, and N. Arnheim.** 1980. 5' flanking region of immunoglobulin heavy chain constant region genes displays length heterogeneity in germlines of inbred mouse strains. *Cell* **22**:187-96.
126. **Marti, G. E., R. A. Metcalf, and E. Raveche.** 1995. The natural history of a lymphoproliferative disorder in aged NZB mice. *Curr Top Microbiol Immunol* **194**:117-26.
127. **Mathe, G., D. Belpomme, and D. Dantchev.** 1976. [Non-Hodgkin hematosarcomas. Classification of the Reference Center of the World Health Organization (WHO)]. *Ann Anat Pathol (Paris)* **21**:285-300.
128. **McDonnell, T. J., N. Deane, F. M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J. P. McKearn, and S. J. Korsmeyer.** 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**:79-88.
129. **McNeil, N., J. S. Kim, T. Ried, and S. Janz.** 2005. Extrasosseous IL-6 transgenic mouse plasmacytoma sometimes lacks Myc-activating chromosomal translocation. *Genes Chromosomes Cancer* **43**:137-46.
130. **McQuaid, S., R. McConnell, J. McMahon, and B. Herron.** 1995. Microwave antigen retrieval for immunocytochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded post-mortem CNS tissue. *J Pathol* **176**:207-16.
131. **Mikaelian, I., L. B. Nanney, K. S. Parman, D. F. Kusewitt, J. M. Ward, D. Naf, D. M. Krupke, J. T. Eppig, C. J. Bult, R. Seymour, T. Ichiki, and J. P.**

- Sundberg.** 2004. Antibodies that label paraffin-embedded mouse tissues: a collaborative endeavor. *Toxicol Pathol* **32**:181-91.
132. **Mikkers, H., and A. Berns.** 2003. Retroviral insertional mutagenesis: tagging cancer pathways. *Adv Cancer Res* **88**:53-99.
133. **Miller, R. T., P. E. Swanson, and M. R. Wick.** 2000. Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: a concise review with practical considerations. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **8**:228-35.
134. **Miyakawa, Y., Y. Ohnishi, M. Tomisawa, M. Monnai, K. Kohmura, Y. Ueyama, M. Ito, Y. Ikeda, M. Kizaki, and M. Nakamura.** 2004. Establishment of a new model of human multiple myeloma using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Biochem Biophys Res Commun* **313**:258-62.
135. **Moloney, J. B.** 1964. The Rodent Leukemias: Virus-Induced Murine Leukemias. *Annu Rev Med* **15**:383-92.
136. **Morgan, J. M., H. Navabi, and B. Jasani.** 1997. Role of calcium chelation in high-temperature antigen retrieval at different pH values. *J Pathol* **182**:233-7.
137. **Moriyama, Y., S. Aoki, M. Urushiyama, M. Ohnishi, H. Hirose, S. Koyama, M. Hanano, I. Fuse, K. Takai, R. Nagayama, M. Fujiwara, K. Kishi, M. Takahashi, T. Koike, C. Sakai, M. Kashimura, H. Takahashi, R. Miura, A. Aoyagi, M. Sanada, A. Hattori, A. Shibata, and S. Shinada.** 1982. [FAB classification, response to therapy, and survival in adult patients with acute leukemia]. *Rinsho Ketsueki* **23**:1706-12.
138. **Morse, H. C., 3rd, M. R. Anver, T. N. Fredrickson, D. C. Haines, A. W. Harris, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. C. Kogan, I. C. MacLennan, P. K. Pattengale, and J. M. Ward.** 2002. Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood* **100**:246-58.
139. **Morse, H. C., 3rd, J. F. Kearney, P. G. Isaacson, M. Carroll, T. N. Fredrickson, and E. S. Jaffe.** 2001. Cells of the marginal zone--origins, function and neoplasia. *Leuk Res* **25**:169-78.
140. **Morse, H. C., 3rd, T. McCarty, C. F. Qi, T. A. Torrey, Z. Naghashfar, S. K. Chattopadhyay, T. N. Fredrickson, and J. W. Hartley.** 2003. B lymphoid neoplasms of mice: characteristics of naturally occurring and engineered diseases and relationships to human disorders. *Adv Immunol* **81**:97-121.
141. **Morse, H. C., 3rd, C. F. Qi, S. K. Chattopadhyay, M. Hori, L. Taddesse-Heath, K. Ozato, J. W. Hartley, B. A. Taylor, J. M. Ward, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and T. N. Fredrickson.** 2001. Combined histologic and molecular features reveal previously unappreciated subsets of lymphoma in AKXD recombinant inbred mice. *Leuk Res* **25**:719-33.
142. **Morse III, H., M. Anver, T. Fredrickson, C. Haines, A. Harris, N. Harris, E. Jaffe, S. Kogan, I. MacLennan, and J. Ward.** 2002. Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. SUPPLEMENTARY INFORMATION.
143. **Mosier, D. E., R. A. Yetter, and H. C. Morse, 3rd.** 1987. Functional T lymphocytes are required for a murine retrovirus-induced immunodeficiency disease (MAIDS). *J Exp Med* **165**:1737-42.
144. **Mosier, D. E., R. A. Yetter, and H. C. Morse, 3rd.** 1985. Retroviral induction of acute lymphoproliferative disease and profound immunosuppression in adult C57BL/6 mice. *J Exp Med* **161**:766-84.
145. **Mucenski, M. L., H. G. Bedigian, M. M. Shull, N. G. Copeland, and N. A. Jenkins.** 1988. Comparative molecular genetic analysis of lymphomas from six inbred mouse strains. *J Virol* **62**:839-46.

146. **Munzert, G., D. Kirchner, H. Stobbe, L. Bergmann, R. M. Schmid, H. Dohner, and H. Heimpel.** 2002. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* **100**:3749-56.
147. **Muriaux, D., J. Mirro, K. Nagashima, D. Harvin, and A. Rein.** 2002. Murine leukemia virus nucleocapsid mutant particles lacking viral RNA encapsidate ribosomes. *J Virol* **76**:11405-13.
148. **Nathwani, B. N., C. D. Winberg, L. W. Diamond, R. M. Bearman, and H. Kim.** 1981. Morphologic criteria for the differentiation of follicular lymphoma from florid reactive follicular hyperplasia: a study of 80 cases. *Cancer* **48**:1794-806.
149. **Nebl, G., N. Mermod, and A. C. Cato.** 1994. Post-transcriptional down-regulation of expression of transcription factor NF1 by Ha-ras oncogene. *J Biol Chem* **269**:7371-8.
150. **Neeson, P., and Y. Paterson.** 2004. A new multi-parameter flow cytometric assay for monitoring lymphoma growth and spread in a pre-clinical murine model for human lymphoma. *Cytometry* **60A**:8-20.
151. **Nexo, B. A.** 1977. A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies. *Virology* **77**:849-52.
152. **Ngan, B. Y., Z. Chen-Levy, L. M. Weiss, R. A. Warnke, and M. L. Cleary.** 1988. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *N Engl J Med* **318**:1638-44.
153. **Nicklas, W., P. Baneux, R. Boot, T. Decelle, A. A. Deeny, M. Fumanelli, and B. Illgen-Wilcke.** 1999. Implications of infectious agents on results of animal experiments. Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde--Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS). *Lab Anim* **33 Suppl 1**:S39-87.
154. **Nielsen, A. A., A. B. Sorensen, J. Schmidt, and F. S. Pedersen.** 2005. Analysis of wild-type and mutant SL3-3 murine leukemia virus insertions in the c-myc promoter during lymphomagenesis reveals target site hot spots, virus-dependent patterns, and frequent error-prone gap repair. *J Virol* **79**:67-78.
155. **Nielsen, A. L., P. L. Norby, F. S. Pedersen, and P. Jorgensen.** 1996. Various modes of basic helix-loop-helix protein-mediated regulation of murine leukemia virus transcription in lymphoid cell lines. *J Virol* **70**:5893-901.
156. **Nielsen, A. L., N. Pallisgaard, F. S. Pedersen, and P. Jorgensen.** 1994. Basic helix-loop-helix proteins in murine type C retrovirus transcriptional regulation. *J Virol* **68**:5638-47.
157. **Nieves, A., L. S. Levy, and J. Lenz.** 1997. Importance of a c-Myb binding site for lymphomagenesis by the retrovirus SL3-3. *J Virol* **71**:1213-9.
158. **Nishizuka, Y., and K. Nakakuki.** 1968. Acceleration of leukemogenesis in AKR mice by grafts, cell suspensions, and cell-free centrifugates of thymuses from preleukemic AKR donors. *Int J Cancer* **3**:203-10.
159. **Nordan, R. P., and M. Potter.** 1986. A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro. *Science* **233**:566-9.
160. **Novella, E., I. Giaretta, F. Elice, D. Madeo, A. Piccin, G. Castaman, and F. Rodeghiero.** 2002. Fluorescent polymerase chain reaction and capillary electrophoresis for IgH rearrangement and minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. *Haematologica* **87**:1157-64.
161. **Nunn, M., H. Weiher, P. Bullock, and P. Duesberg.** 1984. Avian erythroblastosis virus E26: nucleotide sequence of the tripartite onc gene and

- of the LTR, and analysis of the cellular prototype of the viral ets sequence. *Virology* **139**:330-9.
162. **Nunn, M. F., P. H. Seeburg, C. Moscovici, and P. H. Duesberg.** 1983. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* **306**:391-5.
163. **Olsen, H. S., S. Lovmand, J. Lovmand, P. Jorgensen, N. O. Kjeldgaard, and F. S. Pedersen.** 1990. Involvement of nuclear factor I-binding sites in control of Akv virus gene expression. *J Virol* **64**:4152-61.
164. **Paludan, K., H. Y. Dai, M. Duch, P. Jorgensen, N. O. Kjeldgaard, and F. S. Pedersen.** 1989. Different relative expression from two murine leukemia virus long terminal repeats in unintegrated transfected DNA and in integrated retroviral vector proviruses. *J Virol* **63**:5201-7.
165. **Park, S. S., J. S. Kim, L. Tessarollo, J. D. Owens, L. Peng, S. S. Han, S. Tae Chung, T. A. Torrey, W. C. Cheung, R. D. Polakiewicz, N. McNeil, T. Ried, J. F. Mushinski, H. C. Morse, 3rd, and S. Janz.** 2005. Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* **65**:1306-15.
166. **Pattengale, P. K., and C. R. Taylor.** 1983. Experimental models of lymphoproliferative disease. The mouse as a model for human non-Hodgkin's lymphomas and related leukemias. *Am J Pathol* **113**:237-65.
167. **Pattengale, P. K., C. R. Taylor, and C. Pegalow.** 1981. Malignant B-cell lymphoma following and associated with infectious mononucleosis. A comparison of two cases. *Am J Pediatr Hematol Oncol* **3**:35-42.
168. **Pedersen, L., P. G. Strauss, J. Schmidt, A. Luz, V. Erfle, P. Jorgensen, N. O. Kjeldgaard, and F. S. Pedersen.** 1990. Pathogenicity of BALB/c-derived N-tropic murine leukemia viruses. *Virology* **179**:931-5.
169. **Perez-Andres, M., J. Almeida, M. Martin-Ayuso, M. J. Moro, M. A. Garcia-Marcos, I. Moreno, M. Dominguez, J. Galende, N. Heras, M. I. Gonzalez, J. F. San Miguel, and A. Orfao.** 2004. Interaction between clonal plasma cells and the immune system in plasma cell dyscrasias. *J Biol Regul Homeost Agents* **18**:161-5.
170. **Potter, M.** 2003. Neoplastic development in plasma cells. *Immunol Rev* **194**:177-95.
171. **Potter, M., J. Wax, and G. M. Jones.** 1997. Indomethacin is a potent inhibitor of pristane and plastic disc induced plasmacytomagenesis in a hypersusceptible BALB/c congenic strain. *Blood* **90**:260-9.
172. **Potter, M., J. Wax, E. Mushinski, S. Brust, M. Babonits, F. Wiener, J. F. Mushinski, D. Mezebish, R. Skurla, U. Rapp, and et al.** 1986. Rapid induction of plasmacytomas in mice by pristane and a murine recombinant retrovirus containing an avian v-myc and a defective raf oncogene. *Curr Top Microbiol Immunol* **132**:40-3.
173. **Potter, M., and F. Wiener.** 1992. Plasmacytomagenesis in mice: model of neoplastic development dependent upon chromosomal translocations. *Carcinogenesis* **13**:1681-97.
174. **Poulsen, C. B., R. Borup, F. C. Nielsen, N. Borregaard, M. Hansen, K. Gronbaek, M. B. Moller, and E. Ralfkiaer.** 2005. Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol* **74**:453-65.
175. **Qi, C. F., S. K. Chattopadhyay, M. Lander, Y. Kim, T. N. Fredrickson, J. W. Hartley, and H. C. Morse, 3rd.** 1998. Expression of cyclin D1 in mouse B cell lymphomas of different histologic types and differentiation stages. *Leuk Res* **22**:395-404.

176. **Qi, C. F., M. Hori, A. E. Coleman, T. A. Torrey, L. Taddesse-Heath, B. H. Ye, S. K. Chattopadhyay, J. W. Hartley, and H. C. Morse, 3rd.** 2000. Genomic organisation and expression of BCL6 in murine B-cell lymphomas. *Leuk Res* **24**:719-32.
177. **Qi, C. F., M. Hori, L. Taddesse-Heath, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, H. Shen, T. A. Torrey, J. W. Hartley, S. K. Chattopadhyay, T. N. Fredrickson, and H. C. Morse.** 2000. Diffuse large-cell and "true" histiocytic lymphomas of mice. *Curr Top Microbiol Immunol* **252**:301-5.
178. **Quint, W., W. Quax, H. van der Putten, and A. Berns.** 1981. Characterization of AKR murine leukemia virus sequences in AKR mouse substrains and structure of integrated recombinant genomes in tumor tissues. *J Virol* **39**:1-10.
179. **Quint, W., H. van der Putten, F. Janssen, and A. Berns.** 1982. Mobility of endogenous ecotropic murine leukemia viral genomes within mouse chromosomal DNA and integration of a mink cell focus-forming virus-type recombinant provirus in the germ line. *J Virol* **41**:901-8.
180. **Rappaport, H.** 1966. Tumors of the hematopoietic system, p. 97-161, Atlas of Tumor Pathology, section III. Armed Forces Inst. of Pathology, Washington, DC.
181. **Rauscher, F. J.** 1962. A virus-induced disease of mice characterized by erythrocytopoiesis and lymphoid leukemia. *J Natl Cancer Inst* **29**:515-43.
182. **Romeis, B.** 1989. *Mikroskopische Technik*, Peter Böck ed. Urban & Schwarzenberg, München.
183. **Rosenberg, S. A., and H. S. Kaplan.** 1966. [Clinical classification of Hodgkin's disease. Its importance and the influence of general signs]. *Nouv Rev Fr Hematol* **6**:51-4.
184. **Rowe, W. P.** 1972. Studies of genetic transmission of murine leukemia virus by AKR mice. I. Crosses with Fv-1 n strains of mice. *J Exp Med* **136**:1272-85.
185. **Rowe, W. P., and C. A. Kozak.** 1980. Germ-line reinsertions of AKR murine leukemia virus genomes in Akv-1 congenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:4871-4.
186. **Schmidt, C. A., G. Przybylski, D. Vogel, W. D. Ludwig, H. Oettle, A. Neubauer, and W. Siegert.** 1994. Ras point mutations occur in acute myeloid leukemia with illegitimate T-cell receptor delta gene rearrangement. *Leukemia* **8**:102-5.
187. **Schmidt, J., V. Erfle, F. S. Pedersen, H. Rohmer, H. Schetters, K. H. Marquart, and A. Luz.** 1984. Oncogenic retrovirus from spontaneous murine osteomas. I. Isolation and biological characterization. *J Gen Virol* **65 (Pt 12)**:2237-48.
188. **Schmidt, J., A. Luz, and V. Erfle.** 1988. Endogenous murine leukemia viruses: frequency of radiation-activation and novel pathogenic effects of viral isolates. *Leuk Res* **12**:393-403.
189. **Schnittman, S. M., H. C. Lane, S. E. Higgins, T. Folks, and A. S. Fauci.** 1986. Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science* **233**:1084-6.
190. **Serhan, F., M. Penaud, C. Petit, T. Leste-Lasserre, S. Trajcevski, D. Klatzmann, G. Duisit, P. Sonigo, and P. Moullier.** 2004. Early detection of a two-long-terminal-repeat junction molecule in the cytoplasm of recombinant murine leukemia virus-infected cells. *J Virol* **78**:6190-9.

191. **Shi, S. R., R. J. Cote, and C. R. Taylor.** 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* **45**:327-43.
192. **Shin, M. S., T. N. Fredrickson, J. W. Hartley, T. Suzuki, K. Agaki, and H. C. Morse, 3rd.** 2004. High-throughput retroviral tagging for identification of genes involved in initiation and progression of mouse splenic marginal zone lymphomas. *Cancer Res* **64**:4419-27.
193. **Sieweke, M. H., H. Tekotte, J. Frampton, and T. Graf.** 1996. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* **85**:49-60.
194. **Sieweke, M. H., H. Tekotte, J. Frampton, and T. Graf.** 1997. MafB represses erythroid genes and differentiation through direct interaction with c-Ets-1. *Leukemia* **11 Suppl 3**:486-8.
195. **Silva, S., Y. Wang, M. Babonits, S. Imreh, F. Wiener, and G. Klein.** 1997. Spontaneous development of plasmacytomas in a selected subline of BALB/cJ mice. *Eur J Cancer* **33**:479-85.
196. **Smith, C.** 1964. The microscopic anatomy of the thymus, p. 71-84. *In* A. E. G. R. A. Good (ed.), *The thymus in immunobiology*. Haper & Row, New York.
197. **Smotkin, D., A. M. Gianni, S. Rozenblatt, and R. A. Weinberg.** 1975. Infectious viral DNA of murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:4910-3.
198. **Sørensen, K. D., L. Quintanilla-Martinez, S. Kunder, J. Schmidt, and F. S. Pedersen.** 2004. Mutation of all Runx (AML1/core) sites in the enhancer of T-lymphomagenic SL3-3 murine leukemia virus unmasks a significant potential for myeloid leukemia induction and favors enhancer evolution toward induction of other disease patterns. *J Virol* **78**:13216-31.
199. **Sørensen, K. D., A. B. Sørensen, L. Quintanilla-Martinez, S. Kunder, J. Schmidt, and F. S. Pedersen.** 2005. Distinct roles of enhancer nuclear factor 1 (NF1) sites in plasmacytoma and osteopetrosis induction by Akv1-99 murine leukemia virus. *Virology* **334**:234-44.
200. **Soukup, J., L. Krskova, M. Mrhalova, R. Kodet, V. Campr, K. Kubackova, and M. Trneny.** 2003. [Large-cell diffuse B-cell lymphoma: heterogenous origin and prognosis from the aspect of modern diagnosis]. *Cas Lek Cesk* **142**:417-22.
201. **Speck, N. A., B. Renjifo, E. Golemis, T. N. Fredrickson, J. W. Hartley, and N. Hopkins.** 1990. Mutation of the core or adjacent LVb elements of the Moloney murine leukemia virus enhancer alters disease specificity. *Genes Dev* **4**:233-42.
202. **Speck, N. A., B. Renjifo, and N. Hopkins.** 1990. Point mutations in the Moloney murine leukemia virus enhancer identify a lymphoid-specific viral core motif and 1,3-phorbol myristate acetate-inducible element. *J Virol* **64**:543-50.
203. **Speth, C., A. Luz, P. G. Strauss, S. Wendel, R. Zeidler, S. Dorn, V. Erfle, G. Brem, M. Lipp, and J. Schmidt.** 1995. Akv murine leukemia virus enhances lymphomagenesis in myc-kappa transgenic and in wild-type mice. *Virology* **206**:93-9.
204. **Stansfeld, A. G., J. Diebold, H. Noel, Y. Kapanci, F. Rilke, G. Kelenyi, C. Sundstrom, K. Lennert, J. A. van Unnik, O. Mioduszewska, and et al.** 1988. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* **1**:292-3.

205. **Steffen, D. L., S. Bird, and R. A. Weinberg.** 1980. Evidence for the Asiatic origin of endogenous AKR-type murine leukemia proviruses. *J Virol* **35**:824-35.
206. **Stein, H., A. Bonk, G. Tolksdorf, K. Lennert, H. Rodt, and J. Gerdes.** 1980. Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. *J Histochem Cytochem* **28**:746-60.
207. **Steiniger, B., P. Barth, and A. Hellinger.** 2001. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am J Pathol* **159**:501-12.
208. **Swanstrom, L. L.** 1998. Endoscopic surgery for pancreaticobiliary cancer. *Surg Endosc* **12**:370-1.
209. **Szczepanski, T., A. Beishuizen, M. J. Pongers-Willemse, K. Hahlen, E. R. Van Wering, A. J. Wijkhuijs, G. J. Tibbe, M. A. De Bruijn, and J. J. Van Dongen.** 1999. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* **13**:196-205.
210. **Szczepanski, T., M. J. Pongers-Willemse, A. W. Langerak, W. A. Harts, A. J. Wijkhuijs, E. R. van Wering, and J. J. van Dongen.** 1999. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood* **93**:4079-85.
211. **Theriault, C., S. Galoin, S. Valmary, J. Selves, L. Lamant, D. Roda, F. Rigal-Huguet, P. Brousset, G. Delsol, and T. Al Saati.** 2000. PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases. *Mod Pathol* **13**:1269-79.
212. **Thomas, C. Y., M. A. Coppola, C. A. Holland, and A. C. Massey.** 1990. Oncogenicity and U3 region sequences of class II recombinant MuLVs of CWD mice. *Virology* **176**:166-77.
213. **Thornell, A., B. Hallberg, and T. Grundstrom.** 1991. Binding of SL3-3 enhancer factor 1 transcriptional activators to viral and chromosomal enhancer sequences. *J Virol* **65**:42-50.
214. **Utsuyama, M., and K. Hirokawa.** 2003. Radiation-induced-thymic lymphoma occurs in young, but not in old mice. *Exp Mol Pathol* **74**:319-25.
215. **van Dongen, J. J., A. W. Langerak, M. Bruggemann, P. A. Evans, M. Hummel, F. L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurink, R. Garcia-Sanz, J. H. van Krieken, J. Droese, D. Gonzalez, C. Bastard, H. E. White, M. Spaargaren, M. Gonzalez, A. Parreira, J. L. Smith, G. J. Morgan, M. Kneba, and E. A. Macintyre.** 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* **17**:2257-317.
216. **Wang, H., M. P. Kavanaugh, R. A. North, and D. Kabat.** 1991. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* **352**:729-31.
217. **Wang, X., Z. Li, A. Naganuma, and B. H. Ye.** 2002. Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15018-23.

-
218. **Ward, J. M., P. C. Mann, H. Morishima, C. H. Frith.** 1999. Thymus, Spleen, and Lymph Nodes, p. 333-360. *In* M. R. R. (ed.), *Pathology of the mouse*. Cache River Press, Vienna.
219. **Ward, J. M., L. Tadesse-Heath, S. N. Perkins, S. K. Chattopadhyay, S. D. Hursting, and H. C. Morse, 3rd.** 1999. Splenic marginal zone B-cell and thymic T-cell lymphomas in p53-deficient mice. *Lab Invest* **79**:3-14.
220. **Ward, J. M., H. Uno, and C. H. Frith.** 1993. Immunohistochemistry and morphology of reactive lesions in lymph nodes and spleen from rats and mice. *Toxicol Pathol* **21**:199-205.
221. **Weiss, R. A.** 1989. Virology: leukaemia virus receptor. *Nature* **339**:425.
222. **Weitz-Hamburger, A., T. N. Fredrickson, J. LoBue, W. D. Hardy, Jr., J. F. Camiscoli, P. Ferdinand, V. Gallicchio, and A. S. Gordon.** 1975. Stimulation of erythropoietic differentiation in BALB/c mice infected with Rauscher leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* **55**:1171-5.
223. **Weitz-Hamburger, A., T. N. Fredrickson, J. LoBue, W. D. Hardy, Jr., P. Ferdinand, and A. S. Gordon.** 1973. Inhibition of erythroleukemia in mice by induction of hemolytic anemia prior to infection with Rauscher leukemia virus. *Cancer Res* **33**:104-11.
224. **Welterlin, V., A. Debecker, D. Tschieb, C. Zanetti, W. Lange, and P. R. Henon.** 2000. Improvement of clonality detection rate in multiple myeloma using fluorescent IgH PCR with different sets of primers. *J Hematother Stem Cell Res* **9**:983-91.
225. **Wong, K. F., S. F. Yip, C. C. So, G. T. Lau, and Y. M. Yeung.** 2003. Cytomegalovirus infection associated with clonal proliferation of T-cell large granular lymphocytes: causal or casual? *Cancer Genet Cytogenet* **142**:77-9.
226. **Xu, Y., R. W. McKenna, J. E. Doolittle, C. L. Hladik, and S. H. Kroft.** 2005. The t(14;18) in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with germinal center-associated markers and clinical features. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **13**:116-23.
227. **Yoshimura, F. K., J. Tupper, and K. Diem.** 1989. Differential DNA binding of nuclear proteins to a long terminal repeat region of the MCF13 and Akv murine leukemia viruses. *J Virol* **63**:4945-8.
228. **Zaiman, A. L., A. F. Lewis, B. E. Crute, N. A. Speck, and J. Lenz.** 1995. Transcriptional activity of core binding factor-alpha (AML1) and beta subunits on murine leukemia virus enhancer cores. *J Virol* **69**:2898-906.
229. **Zaiman, A. L., A. Nieves, and J. Lenz.** 1998. CBF, Myb, and Ets binding sites are important for activity of the core I element of the murine retrovirus SL3-3 in T lymphocytes. *J Virol* **72**:3129-37.
230. **Zapata, J. M., M. Krajewska, H. C. Morse, 3rd, Y. Choi, and J. C. Reed.** 2004. TNF receptor-associated factor (TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16600-5.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Akv	AKR murines Leukämievirus	MLV	murines Leukämievirus
AML	akute myeloische Leukämie	MoMLV	Moloney murines Leukämievirus
AVM	Abteilung für Vergleichende Medizin	MPO	Myeloperoxidase
bHLH	Basische Helix-Loop-Helix	MZ	Marginalzone
bp	Basenpaare	NF	nuclear factor
CAE	Chlorazetatesterase	Nhg	Neuherberg
CD	cluster of differentiation	NIH	National Institute of Health
CIS	common integration site	NMRI	Naval Medical Research Institute
DAB	Diaminbenzidin	PALS	Periarteriöle lymphatische Scheide
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	PAS	periodic acid-Schiff
env	envelop	PBS	Primer-Bindungs-Stelle
Ets	E26 transforming specific sequence	PCR	polymerase chain reaction
FBL	follicular B-cell lymphoma	PCT	plasmacytoma
FUB	Freie Universität Berlin	pol	polymerase
FV	Friend Virus	Pre-T LBL	Vorläufer-T-Zell lymphoblastisches Lymphom
GAC	Genanalysezentrum	R Region	redundant (engl.: üppig) Region
gag	group antigen	RFB	Reilly-Finkel-Biskis
GC	germinal centre (Keimzentrum)	RUNX	Runt related transcription factor
GR	glucocorticoid receptor	RV	Rauscher Virus
GSF	GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit	SBL	small B-cell lymphoma
HE	Hämalaun-Eosin	SMZL	Splenic marginal zone lymphoma
Ig	Immunglobulin	TCR	T-cell receptor
IHC	Immunhistochemie	Tdt	Terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase
IZW	Institut für Zoo- und Wildtierforschung	TE	Tris-EDTA
kb	Kilobasen	Tris	Tris(hydroxymethyl)methylamine
LK	Lymphknoten	TUM	Technische Universität München
LTR	Long Terminal Repeat	U3	unique (engl.: einzigartig) 3' Sequenz
MAIDS	murines erworbenes Immundefektsyndrom	U5	unique (engl.: einzigartig) 5' Sequenz
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe	UA	University of Aarhus
ML	myeloische Leukämie	WHO	World Health Organisation

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Struktur des HI Virus 1	3
Abb. 2:	Retroviraler Infektionszyklus.....	6
Abb. 3:	Schematische provirale Genomstruktur des Akv	8
Abb. 4:	Schematische Darstellung der reversen Transkription	9
Abb. 5:	Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Akv Enhancer.....	12
Abb. 6:	Mikroskopische Anatomie der murinen Milz	19
Abb. 7:	Lage von Lymphknoten, Thymus und Milz der Maus	22
Abb. 8:	Enhancer-Sequenz von Akv und Akv Mutanten	51
Abb. 9:	Histologie einer Kontrollmilz und von Milzen mit Plasmazytomvarianten.	59
Abb. 10:	Histologie und IHC retrovirusinduzierter follikulärer Hyperplasien, Plasmazytome und diffus großzelliger B-Zell-Lymphome.....	61
Abb. 11:	Histologie und IHC retrovirusinduzierter diffus großzelliger B-Zell- Lymphome und follikulärer B-Zell-Lymphome	63
Abb. 12:	Histologie und IHC retrovirusinduzierter splenischer Marginalzonen- Lymphome, kleinzelliger B-Zell-Lymphome, akuter myeloischer Leukämien und Vorläufer-T-Zell lymphoblastischer Lymphome	67
Abb. 13:	Befunde nach Injektion von Akv und Akv-Mutanten bei NMRI-Mäusen....	69
Abb. 14:	Kinetik der Tumormanifestation	70
Abb. 15:	Latenzzeiten von Plasmazytomen mit und ohne Zusatzbefunden.....	72
Abb. 16:	Elektrophoresegel HindIII-behandelter genomischer DNA und Igk- Hybridisierungsmuster der geblotteten Membran von Plasmazytomen....	74
Abb. 17:	Elektropherogramm-Beispiele von retrovirusinduzierten Tumoren der Maus	75
Abb. 18:	Pathogenität von Akv λ -623.....	78
Abb. 19:	Pathogenität von Akv1-99	79
Abb. 20:	Pathogenität von Akv1-99 mNF1mut2.....	80
Abb. 21:	Pathogenität von Akv1-99 mEts	81
Abb. 22:	Pathogenität von Akv1-99 mE _{GRE}	82
Abb. 23:	Pathogenität von Akv1-99 mGR	83
Abb. 24:	Pathogenität von Akv1-99 mE _{AS}	84
Abb. 25:	Pathogenität von Akv1-99 mE _{AS} +mGR.....	85
Abb. 26:	Pathogenität von Akv1-99 mE _{AS} +mE _{GRE}	86

Abb. 27: Pathogenität von Akv1-99 mRUNX1	87
Abb. 28: Pathogenität von Akv1-99 mRUNX1+mGR	88
Abb. 29: Pathogenität von Akv1-99 mRUNX1+mE _{GRE}	89
Abb. 30: Befunde bei Kontrollmäusen	90
Abb. 31: Überlebenswahrscheinlichkeit von Kontrollmäusen, Akv λ -623- und Akv1-99-infizierten Mäusen	91
Abb. 32: Tumorinzidenz nach Infektion mit Akv und Akv-Mutanten bei NMRI- Mäusen	95
Abb. 33: Tumorlatenzzeiten der einzelnen Versuchsgruppen	98
Abb. 34: Überlebenskurven von Akv1-99 mRUNX1-, Akv1-99 mE _{GRE} - und Akv1-99 mRUNX1+mE _{GRE} -infizierten Mäusen	99
Abb. 35: Überlebenskurven von Akv1-99 mE _{A/S} -, Akv1-99 mE _{GRE} - und Akv1-99 mE _{A/S} +mE _{GRE} -infizierten Mäusen	100

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vergleich der WHO-Klassifikation mit den "Bethesda Proposals"	36
Tab. 2: Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Analysen	45
Tab. 3: Tumorinzidenz nach Infektion mit Akv und Akv-Mutanten bei NMRI- Mäusen	94
Tab. 4: Vergleich der Tumorlatenz von sechs Virusmutanten mit kürzeren Latenzzeiten als Akv1-99	96
Tab. 5: Vergleich der Tumorlatenz von drei Virusmutanten mit Akv1-99 entsprechenden Latenzzeiten	97
Tab. 6: Vergleich der Tumorlatenz von zwei Virusmutanten mit längeren Latenzzeiten als Akv1-99	97

8.4 Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Dr. K. Hagemann für die großzügige Überlassung des Schlüssels zum Mikrokosmos - meinem ersten Histologiebuch, Herrn Prof. Dr. K. D. Weyrauch (FUB) und Herrn Prof. Dr. G. Böhme (ehemals FUB), die mich mit Freude und großem Engagement durch diese neue, mikroskopisch kleine Welt geführt haben, Herrn Dr. H.-W. Fuchs (ehemals FUB), der sich mit außerordentlich viel Zeit und Geduld für die pathologische Ausbildung seiner Studenten eingesetzt hat sowie bei Frau Dr. J. Wissner und Herrn B. Paschmionka (IZW Berlin) für die Einführung in die außerordentlich spannende Pathologie der Zoo- und Wildtiere und die Ermutigung, den Berufsweg eines Pathologen einzuschlagen.

Mein größter Dank geht an meine Betreuerin und Chefin PD Dr. L. Quintanilla-Fend, deren Einsatz für mich und ihre Mitarbeiter bewundernswert ist. Trotz der unendlich vielen Arbeit, versucht sie sich Zeit für die ihr anvertrauten Mitarbeiter zu nehmen. Ganz selbstverständlich ist sie für persönliche Gespräche und die Bewältigung aller Probleme da.

Herrn Prof. Dr. J. Schmidt (AVM) danke ich sehr für sein Engagement, mit dem er sich für mich und diese Arbeit eingesetzt hat und dafür, dass ich einen kleinen Teil zu seinem langjährigen, spannenden Forschungsthema beitragen durfte. Ohne die Hilfe der technischen Assistenten der AVM und der Pathologie (GSF und TUM) wäre diese Arbeit nicht umsetzbar gewesen. Frau K. Reindl, Frau A. Appold, Frau D. Bulian, Frau J. Müller, Frau E. Samson, Frau S. Holthaus, Frau N. Kink, Frau C. Kloth und Frau B. Geist möchte ich deshalb an dieser Stelle noch einmal für die Anleitung und Mitarbeit recht herzlich danken. Dank geht auch an Herrn Dr. P. Lichtner und Frau Dr. G. Eckstein (GAC) für ihre unermüdliche Ausdauer im Kampf mit dem Datenimport in die Datenbank des Kapillar-Elektrophorese-Analysators. Von unschätzbarem Wert war für mich die einmonatige Hospitanz in der Arbeitsgruppe von Prof. F. S. Pedersen (UA). Für die hoch qualifizierte Betreuung, die äußerst nette Gastfreundschaft und die grandiose Weihnachtsfeier möchte ich mich bei allen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe bedanken.

Herrn Prof. W. Schmahl (LMU) danke ich für seine Geduld und Unterstützung, sein Interesse an dieser Arbeit und seine aufmunternden Worte.

"Menschen klein machen", heißt es, sei einfach; "sie groß zu kriegen" eine schwierige Aufgabe. Alle Menschen, die unermüdlich am "Großmachen" arbeiten, bewundere und achte ich von ganzem Herzen. Ich danke meiner wundervollen Familie und meinen lieben Freunden, die mein Leben so unendlich reich machen.

Diese Arbeit wurde vom Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN) unterstützt (Förderkennzeichen: 01GR0103, 01GR0153 und 01GR0430).

ISBN 3-938026-72-3



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>