

# **Das von Hippel-Lindau Protein ist essentiell für die Organogenese des Thymus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Anita Hollenbeck**  
aus Dinslaken

Bottrop, Oktober 2014

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Jens Fischer

Korreferent: Prof. Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2014

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	- 1 -
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	- 4 -
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	- 7 -
<b>4</b>	<b>Einleitung</b> .....	- 8 -
4.1	Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus .....	- 8 -
4.1.1	Die Entwicklung von natürlichen regulatorischen T-Zellen .....	- 11 -
4.1.2	Die Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen im Thymus.....	- 11 -
4.2	Naive, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen in der Peripherie.....	- 12 -
4.3	Die Funktion von Thymusepithelzellen .....	- 12 -
4.4	Die Thymusontogenese.....	- 13 -
4.5	Thymusinvolution und -schädigung nach antineoplastischer Therapie .....	- 15 -
4.6	Der Hypoxie-Signalweg .....	- 16 -
4.6.1	Klinische Relevanz des genetischen <i>VHL</i> -Verlustes .....	- 18 -
4.7	Zielsetzung.....	- 19 -
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	- 20 -
5.1	Material .....	- 20 -
5.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	- 20 -
5.1.2	Zelllinien und Medien .....	- 21 -
5.1.3	Lösungen und Puffer .....	- 22 -
5.1.3	Antikörper und Konjugate .....	- 23 -
5.1.4	Kits .....	- 24 -
5.1.5	Primer und Taqman-Sonden.....	- 25 -
5.1.6	Chemikalien und Reagenzien .....	- 26 -
5.1.7	EDV-Programme .....	- 27 -
5.2	Mäuse .....	- 28 -
5.2.1	Allgemeines .....	- 28 -
5.2.2	Mausstämme .....	- 28 -
5.2.3	Haltung und Zucht der Mäuse, Organentnahme .....	- 30 -
5.3	Zellbiologische Methoden.....	- 31 -
5.3.1	Methoden der Zellkultur .....	- 31 -
5.3.1.1	Einfrieren/ Auftauen von Zellen .....	- 31 -
5.3.1.2	Subkultivierung von Zellen .....	- 31 -
5.3.1.3	Lebendzellzahlermittlung mittels Trypanblau.....	- 31 -
5.3.1.4	Inkubation unter hypoxischen Bedingungen .....	- 32 -
5.3.1.5	Erstellen von Wachstumskurven .....	- 32 -

5.3.2	Präparation von Einzelzellsuspensionen von Thymus und Milz .....	- 32 -
5.3.3	Isolation und Anreicherung von Thymusepithelzellen .....	- 32 -
5.3.3.1	Enzymatischer Gewebeverdau.....	- 32 -
5.3.3.2	Anreicherung der TECs durch Percoll-Gradienten-Zentrifugation .....	- 33 -
5.3.4	Durchflusszytometrie .....	- 33 -
5.3.4.1	Durchflusszytometrische Analysen.....	- 35 -
5.3.4.2	Durchflusszytometrische Sortierungen .....	- 35 -
5.3.4.3	Oberflächenfärbung.....	- 35 -
5.3.4.4	Intrazelluläre Färbung .....	- 36 -
5.3.4.5	AnnexinV-Apoptose-Assay.....	- 37 -
5.3.4.6	Zellzyklus-Assay .....	- 37 -
5.3.5	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten.....	- 38 -
5.3.5.1	Gewebe-Einbettung und Schnitte .....	- 38 -
5.3.5.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	- 38 -
5.3.5.3	Perjodsäure-Schiff'sche (PAS)-Reaktion.....	- 39 -
5.3.5.4	Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	- 39 -
5.3.5.5	Mikroskopie.....	- 40 -
5.4	Molekularbiologische Methoden .....	- 40 -
5.4.1	Isolierung genomischer DNA .....	- 40 -
5.4.1.1	DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen.....	- 40 -
5.4.1.2	DNA-Isolierung aus sortierten Thymusepithelzellen .....	- 41 -
5.4.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	- 41 -
5.4.3	Agarosegel-Elektrophorese .....	- 42 -
5.4.4	DNA-Gelextraktion.....	- 42 -
5.4.5	Sanger-Sequenzierung.....	- 43 -
5.4.6	Isolierung von RNA aus Einzelzellsuspensionen.....	- 43 -
5.4.7	Reverse Transkription.....	- 44 -
5.4.8	Quantitative Echtzeit-PCR (q Real-Time-PCR; qRT-PCR).....	- 44 -
5.5	Statistische Analysen .....	- 45 -
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	- 46 -
6.1	Einfluss von Sauerstoff-armen Bedingungen auf das Wachstumsverhalten von kortikalen und medullären Thymusepithelzellkulturen <i>in vitro</i> .....	- 46 -
6.2	<i>In vitro</i> -Sauerstoff-Reduktion aktiviert die Expression von HIF-Zielgenen in Thymusepithelzellkulturen .....	- 49 -
6.3	Einfluss von <i>in vitro</i> Sauerstoff-armen Bedingungen auf die Apoptoserate von kortikalen und medullären Thymusepithelzellkulturen.....	- 51 -
6.4	Einfluss von <i>in vitro</i> Sauerstoff-armen Bedingungen auf den Zellzyklus von	

medullären Thymusepithelzellen .....	- 53 -
6.5 Einfluss des <i>Vhl</i> -Verlustes im Thymusepithel auf die Ausbildung eines funktionellen Thymus .....	- 54 -
6.6 Einfluss des <i>Vhl</i> -Verlustes in Thymusepithelzellen auf die peripheren T- und B-Zellkompartimente .....	- 57 -
6.7 Einfluss des <i>Vhl</i> -Verlustes in Thymusepithelzellen auf die Entstehung der embryonalen Thymusanlage .....	- 61 -
6.8 Einfluss des <i>Vhl</i> -Verlustes auf den Einbau von Glykogen in die embryonale Thymusanlage.....	- 66 -
6.9 Einfluss der Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF1 $\alpha$ -Variante auf die T-Zell- und TEC-Entwicklung .....	- 68 -
6.10 Einfluss der <i>Foxn1-Cre</i> vermittelten Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF2 $\alpha$ -Variante auf den Thymus.....	- 70 -
6.11 Die <i>Foxn1-Cre</i> vermittelte Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF2-Variante führt zu drastischen Veränderungen im peripheren T-Zellkompartiment.....	- 74 -
6.12 Einfluss der <i>Foxn1-Cre</i> vermittelten Deletion von <i>Hif2<math>\alpha</math></i> und <i>Vhl</i> auf die Entwicklung des Thymus und die T-Zellentwicklung.....	- 77 -
6.13 Einfluss der <i>Foxn1-Cre</i> vermittelten Deletion von <i>Hif1<math>\alpha</math></i> und <i>Hif2<math>\alpha</math></i> im <i>Vhl</i> -defizienten Hintergrund in TECs auf die Entwicklung des Thymus .....	- 81 -
<b>7 Diskussion</b> .....	- 88 -
<b>8 Ausblick</b> .....	- 100 -
<b>9 Zusammenfassung</b> .....	- 102 -
<b>10 Summary</b> .....	- 103 -
<b>11 Anhang</b> .....	- 104 -
<b>12 Literaturverzeichnis</b> .....	- 109 -
<b>13 Danksagung</b> .....	- 119 -
<b>14 Lebenslauf</b> .....	- 120 -
<b>15 Erklärung</b> .....	- 122 -

## 1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-amino-actinomycin D
Abb.	Abbildung
AIRE	Auto Immun Regulator
APC	Allophycocyanin
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
bHLH PAS	basic-helix-loop-helix Per-ARNT-Sim
Bnip3	Bcl2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein
bp	Basenpaare
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
B-Zelle	bone marrow derived lymphocyte
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 24
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CCR9	C-C chemokine receptor type 9
CD62L	L-Selektin
CD8ISP	CD8+ immature single-positive
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
Cre	Cre-Rekombinase
Ct	Threshold-Cycle
cTEC	cortical thymic epithelial cell
Cul-2	cullin-2
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	dendritic cell
Ddit4	DNA-damage-induced transcript 4
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dll4	Delta-like ligand 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMOG	Dimethylxalylglycine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	double negative, doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	double positive, doppelt positiv
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
E	embryonaler Tag
E6/E7	virale Onkogene E6/E7
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EPAS	endothelial PAS domain
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
EthBr	Ethidiumbromid
Ex	Exon
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	forward scatter
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FKS	fetales Kälberserum
FOL	follikuläre B-Zelle
Foxn1	Forkhead box N1
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FSC	forward scatter
FVD	Fixable viability dye
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GITC	Guanidiniumisothiozyanat
Glut1	Glukose Transporter 1
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	hypoxia-inducible factor
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRE	hypoxic-response-elements
Ig	Immunglobulin
IL-22	Interleukin 22
IL-7	Interleukin 7
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
K14	Keratin 14
K8	Keratin 8
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyte growth factor
KM	Knochenmark
KO	knockout
Ldha	lactate dehydrogenase A
lin	Linienzelle
LK	Lymphknoten
LOH	loss of heterozygosity
loxP	locus of crossover (X)
LTi	lymphoid tissue inducer
Ly51	6C3/BP-1
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility complex
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTEC	medullary thymic epithelial cell
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
NTC	non template control
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OPF	obere Percoll-Fraktion
pan-Ck	pan-Cytokeratin
PAS	Perjodsäure-Schiff'sche-Reaktion
PAS-D	Perjodsäure-Schiff'sche-Diastase-Reaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
Pgk1	Phosphoglyceratkinase 1
PHD	prolyl hydroxylase domain-containing protein
PI	Propidiumiodid
PMT	photomultiplier tube
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PS	Phosphatidylserin
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Rn	normiertes Reporter-Signal
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	real-time Polymerase Kettenreaktion
SCF	stem cell factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
SP	single positive, einzel positiv
SSC	side scatter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-ALL	akute lymphoblastische Leukämie
Taq	Thermus aquaticus
Tcm	central memory T cell
TCR	T-Zellrezeptor
TEC	thymic epithelial cell
Tem	effector memory T cell
TGFβ	transforming growth factor β
T-LBL	T-lymphoblastisches Lymphom
Treg	regulatorische T-Zelle
T-Zelle	thymus derived lymphocyte
UEA	Ulex europaeus agglutinin
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCB	Cul2, Elongin B und C
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
w/v	weight per volume
WT	wildtype
ZTL	Zentrales Tierlaboratorium
µg	Mikrogramm

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Oberflächenexpression der Thymozyten-Entwicklungsstufen und ihre Darstellung in der Durchflusszytometrie.....	- 10 -
Abb. 2 Der Hypoxie-Signalweg.....	- 17 -
Abb. 3 Analyse der kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71.	- 47 -
Abb. 4 Expressionsanalyse der Gene <i>Vhl</i> , <i>Hif1α</i> und <i>Hif2α</i> von kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71 unter atmosphärischem Sauerstoff (21%).....	- 48 -
Abb. 5 Wachstumskinetiken der kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71 unter hypoxischen Bedingungen.....	- 49 -
Abb. 6 Expressionsanalyse von HIF-Zielgenen in kortikalen und medullären Thymusepithelzellen ANV- und TE-71- nach 18 h Hypoxie-Inkubation.....	- 50 -
Abb. 7 Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von kortikalen und medullären Thymusepithelzellkulturen ANV und TE-71 nach 18 h Hypoxie-Inkubation.....	- 51 -
Abb. 8 Expressionsanalyse der pro-apoptotischen Gene <i>Bnip3</i> und <i>Ddit4</i> in kortikalen (ANV) und medullären (TE-71) Thymusepithelzelllinien nach 18 h Hypoxie-Inkubation (3% O <sub>2</sub> ).-	- 52 -
Abb. 9 Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasezellen von medullären TE-71-Zellen nach 18 h 3% O <sub>2</sub> -Inkubation. ....	- 53 -
Abb. 10 <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Mäuse zeigen makroskopisch keinen Thymus.....	- 55 -
Abb. 11 <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen aller Thymus-spezifischen T-Zell-Entwicklungsstufen aus.....	- 56 -
Abb. 12 <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Mäuse weisen nur vereinzelt EpCAM <sup>+</sup> , CD45 <sup>-</sup> TECs auf.....	- 56 -
Abb. 13 In <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Mäusen ist das periphere reife T-Zellkompartiment fast komplett abwesend.....	- 59 -
Abb. 14 Expression von CD3e und intrazellulärem TCRβ von residuellen peripheren Milz-T-Zellen in <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Mäusen.....	- 60 -
Abb. 15 <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Mäuse zeigten unauffällige Gesamtzahlen der B220 <sup>+</sup> -B-Zellen und der folliculären B-Zellen.....	- 60 -
Abb. 16 <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Embryonen weisen verkleinerte und orthotop angelegte Thymusanlagen auf.....	- 61 -
Abb. 17 Die Thymusanlagen der <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Embryonen wiesen eine unzureichende Thymozytenentwicklung auf.....	- 62 -
Abb. 18 Die Thymusanlagen von <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Embryonen zeigen eine weniger ausgeprägte Besiedlung mit Thymozyten.....	- 63 -
Abb. 19 Die Thymusanlagen von E15,5 <i>VhIKO</i> <sup>Foxn1</sup> -Embryonen zeigten nur vereinzelt Expression der epithelialen Marker EpCAM und pan-CK.....	- 64 -

Abb. 20 Den Thymusanlagen von E15,5-VhIKO <sup>Foxn1</sup> Embryonen fehlen cTEC-primed <i>default</i> -Progenitoren, sowie die Expression von MHC Klasse II-Molekülen. ....	- 65 -
Abb. 21 In den Thymusanlagen von E15,5 VhIKO <sup>Foxn1</sup> -Embryonen liegt eine starke Akkumulation von Kohlenhydraten vor. ....	- 66 -
Abb. 22 Die Thymusanlagen von E15,5 VhIKO <sup>Foxn1</sup> -Embryonen zeigen starke Glykogeneinlagerungen.....	- 67 -
Abb. 23 HIF1dPA <sup>Foxn1</sup> -Mäuse zeigten eine normale Thymusentwicklung. ....	- 70 -
Abb. 24 HIF2dPA <sup>Foxn1</sup> -Mäuse zeigen einen anatomisch veränderten Thymus. ....	- 70 -
Abb. 25 In HIF2dPA <sup>Foxn1</sup> -Mäusen ist die T-Zellentwicklung gestört. ....	- 71 -
Abb. 26 In HIF2dPA <sup>Foxn1</sup> -Mäusen ist das medulläre TEC-Kompartiment nur rudimentär vorhanden. ....	- 72 -
Abb. 27 HIF2dPA <sup>Foxn1</sup> -Thymi zeigen eine abnormale Organstruktur mit vermehrt Kohlenhydrateinlagerungen.....	- 73 -
Abb. 28 Die <i>Foxn1-Cre</i> vermittelte Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF2 $\alpha$ -Variante führte zur Induktion von den HIF-Zielgenen <i>Glut1</i> und <i>Vegf</i> in TECs.....	- 73 -
Abb. 29 In HIF2dPA <sup>Foxn1</sup> -Mäusen liegt das periphere reife Milz-T-Zellkompartiment vermindert vor. ....	- 75 -
Abb. 30 HIF2dPA <sup>Foxn1</sup> -Mäuse zeigen den Verlust von naiven T-Zellen und ein aktiviertes Effektor-Gedächtnis-T-Zell-Kompartiment. ....	- 75 -
Abb. 31 Die nahezu komplette Abwesenheit des mTEC-Kompartimentes in HIF2dPA <sup>Foxn1</sup> -Mäusen ging konform mit dem Verlust an CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> T-Zellen in der Milz. ....	- 76 -
Abb. 32 Vhl;Hif2 $\alpha$ KO <sup>Foxn1</sup> -Mäuse zeigen kleine Thymi. ....	- 77 -
Abb. 33 In Vhl;Hif2 $\alpha$ KO <sup>Foxn1</sup> -Mäusen ist die Thymozytenentwicklung partiell gerettet. ....	- 78 -
Abb. 34 In Vhl;Hif2 $\alpha$ KO <sup>Foxn1</sup> -Mäusen ist das TEC-Kompartiment geringfügig wieder hergestellt.....	- 79 -
Abb. 35 Die Thymi von Vhl;Hif2 $\alpha$ KO <sup>Foxn1</sup> -Mäusen zeigten in histologischen Untersuchungen eine abnormale Thymusstruktur. ....	- 79 -
Abb. 36 In Vhl;Hif2 $\alpha$ KO <sup>Foxn1</sup> -Mäusen ist der reife periphere T-Zellpool in der Milz nicht gerettet. ....	- 80 -
Abb. 37 Die simultane Deletion von <i>Hif1<math>\alpha</math></i> und <i>Hif2<math>\alpha</math></i> rettet den athymischen VhIKO <sup>Foxn1</sup> -Phänotyp komplett.....	- 82 -
Abb. 38 Die zusätzliche Deletion von <i>Hif1<math>\alpha</math></i> und <i>Hif2<math>\alpha</math></i> rettet das fehlende Thymozyten-Kompartiment der VhIKO <sup>Foxn1</sup> -Mäuse komplett. ....	- 83 -
Abb. 39 Die zusätzliche Deletion von <i>Hif1<math>\alpha</math></i> und <i>Hif2<math>\alpha</math></i> rettet das fehlende TEC-Kompartiment der VhIKO <sup>Foxn1</sup> -Mäuse komplett. ....	- 84 -
Abb. 40 Vhl;Hif1 $\alpha$ ;Hif2 $\alpha$ KO <sup>Foxn1</sup> - Thymi zeigen eine normale Thymusstruktur. ....	- 85 -
Abb. 41 Deletionsanalyse der Allele Vhl <sup>loxP</sup> , Hif1 $\alpha$ <sup>loxP</sup> und Hif2 $\alpha$ <sup>loxP</sup> in sortierten TECs.....	- 85 -

Abb. 42 Die gleichzeitige Deletion von <i>Hif1α</i> und <i>Hif2α</i> rettet das fehlende periphere reife Milz- T-Zellkompartiment der $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäuse komplett. ....	- 86 -
Abb. 43 Mögliche unterschiedliche HIF1α-Expressionsniveaus in Kontroll-, $HIF1dPA^{Foxn1}$ - und $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen könnten die Größe des TEC-Kompartimentes bestimmen. ....	- 95 -
Abb. 44 Die bedeutende Rolle des von Hippel-Lindau-Gens innerhalb von TECs für die Entwicklung eines funktionsfähigen Thymus. ....	- 99 -
Abb. 45 Zusammenstellung der Contour plots aus der durchflusszytometrischen Analyse der Thymusanlagen von E15,5- $VhIKO^{Foxn1}$ Embryonen. ....	- 107 -
Abb. 46 Ergänzende Contour plots aus der durchflusszytometrischen Analyse der Thymi von $Vhl;Hif2αKO^{Foxn1}$ -Mäusen. ....	- 108 -

Die Abbildungen dieser Arbeit wurden in Vorbereitung auf eine Publikation angefertigt und sind daher in englischer Sprache verfasst.

### 3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Liste der verwendeten Labormaterialien .....	- 20 -
Tab. 2 Liste der verwendeten Geräte .....	- 21 -
Tab. 3 Verwendete Thymusepithelzelllinien.....	- 21 -
Tab. 4 Liste der verwendeten Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der murinen Thymus-, und Milzzellen.....	- 23 -
Tab. 5 Liste der Fluorochrom-Konjugate zur Nachfärbung biotynlierter Antikörper bzw. zum Nachweis muriner medullärer Thymusepithelzellen.....	- 24 -
Tab. 6 Verwendete unkonjugierte und konjugierte Antikörper für die Immunfluoreszenz an murinen Kryoschnitten.....	- 24 -
Tab. 7 Liste der verwendeten Kits .....	- 24 -
Tab. 8 Liste der verwendeten Genotypisierungs- und Expressionsprimer.....	- 25 -
Tab. 9 Liste der verwendeten Maus-spezifischen real-time PCR TaqMan-Assays .....	- 25 -
Tab. 10 Liste der verwendeten Chemikalien.....	- 26 -

## 4 Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war, die Bedeutung des Hypoxie-Signalweges für die Entwicklung und Funktion des Thymus zu untersuchen.

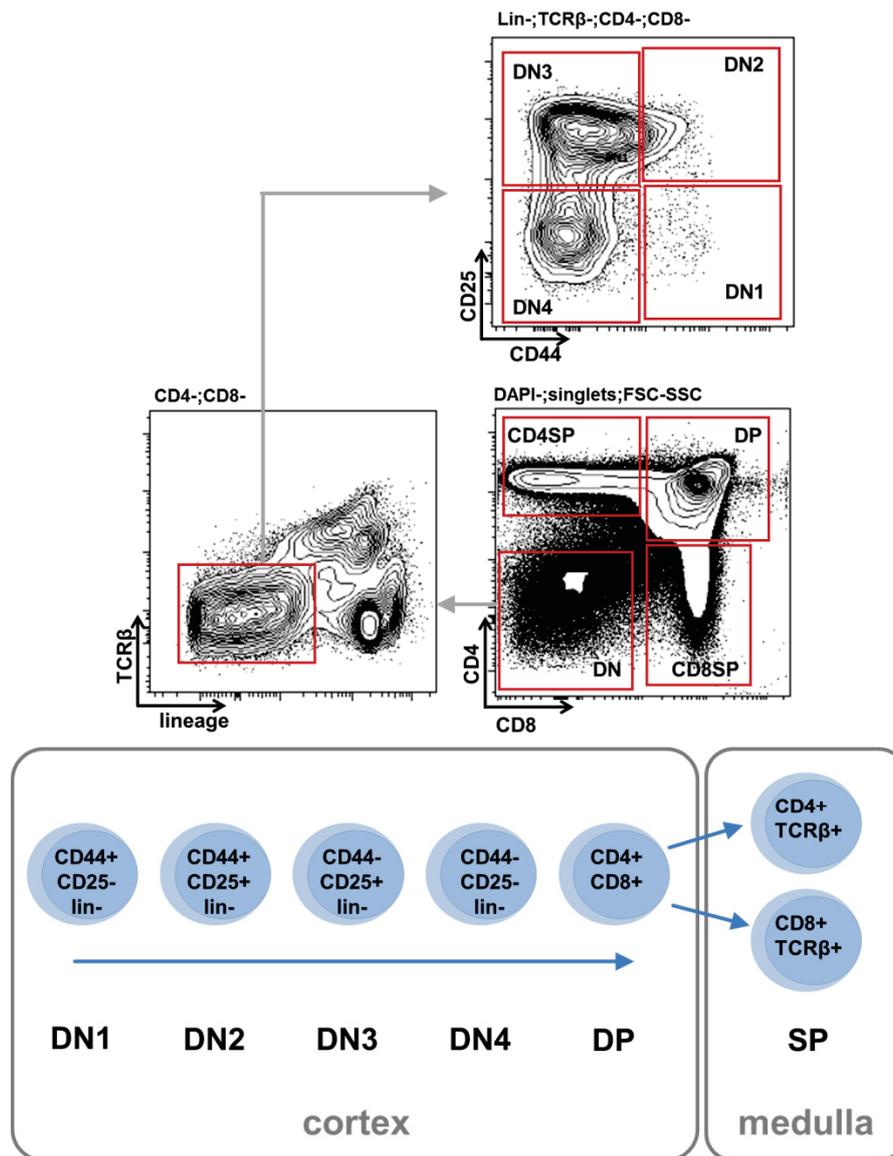
Als häufigste zelluläre Komponente des Thymusstroma kontrollieren die Thymusepithelzellen lebenslang die Entwicklung von immunkompetenten T-Zellen. Das Unvermögen einen funktionellen Thymus auszubilden und zu erhalten kann mit Immundefizienz oder Autoimmunität einhergehen (Rodewald, 2008). Insbesondere nach anti-neoplastischen Therapien wie Chemo- und Strahlentherapie stellt die Thymusinvolutions und die fehlende anschließende Rekonstitution des T-Zellkompartimentes ein häufiges und schwerwiegendes Problem dar. Die im Thymus vorherrschende Hypoxie (Hale et al., 2002) lässt vermuten, dass es regulatorische Mechanismen gibt, die durch den hypoxischen Zustand im Thymus beeinflusst werden und die ordnungsgemäße Heranreifung der Thymozyten regulieren. Möglicherweise spielt hierbei der Hypoxie-Signalweg eine zentrale Rolle. Bis heute sind noch keine Arbeiten publiziert, die die Rolle des Hypoxie-Signalweges in Thymusepithelzellen untersuchten. Im Hinblick auf die Auswirkungen anti-neoplastischer Therapien besteht ein besonderes Interesse, die molekularen Mechanismen des Thymus und die, die zu seiner Involution führen, weiter aufzuklären und neue Ansätze für mögliche therapeutische Zielstrukturen herauszuarbeiten.

### 4.1 Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus

Der Thymus befindet sich im oberen Brustraum apikal des Herzens. Er besteht aus verschiedenen Thymusläppchen, die anatomisch jeweils in Rinde (Kortex) und Innenbereich (Medulla) unterteilt werden können. Im Thymus findet die Entwicklung von T-Zellen (*thymus derived lymphocyte*) mit einem breit gefächerten  $\alpha\beta$  (oder  $\gamma\delta$ ) T-Zell-Rezeptor (TCR)-Repertoire statt, das dem adaptiven Immunsystem die Fähigkeit vermittelt zwischen Selbst- und Fremd-Antigen zu unterscheiden (Kyewski and Klein, 2006; Ramsdell and Fowlkes, 1990). Die kontinuierliche Thymozytenentwicklung wird dabei durch eine konstante Versorgung des Thymus mit hämatopoetischen Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark stammen, gewährleistet (Boehm, 2012). Die in den Thymus einwandernden, multipotenten Progenitorzellen können phänotypisch unterschiedlich ausgestattet sein (Saran et al., 2010) und treten aufgrund begrenzter Räumlichkeiten periodisch an den kortiko-medullären Verbindungen in den Thymus ein (Thompson and Zuniga-Pflucker, 2011). Die anschließende Entwicklung und Reifung erfolgt schrittweise in Abhängigkeit von der stromalen Umgebung. Insbesondere die durch den NOTCH-Rezeptor vermittelte NOTCH-Signalübertragung in T-

Zellvorläufern und das Proliferationssignal IL-7 spielen dabei eine essentielle Rolle. Im Großteil der in den Thymus eintretenden Zellen wird hierdurch die T-Zelllinien-Spezifizierung initiiert. Die Thymozyten verlieren dabei zunehmend das Potential in alternative Zelltypen differenzieren zu können (Thompson and Zuniga-Pflucker, 2011). Während ihres Reifungsprozesses durchwandern die Thymozyten zunächst den Kortex bevor sie in die Medulla eintreten.

Die verschiedenen Entwicklungsstadien der Thymozyten zeichnen sich durch die unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen aus, die den funktionellen Reifungsstatus reflektieren und mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen zur Differenzierung der Subpopulationen herangezogen werden können. Den frühesten eintretenden Progenitorzellen fehlt die Expression der Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 (Shortman and Wu, 1996) (Abb.1). Daher werden sie als doppelt-negative (*double-negatives*, DN) Thymozyten bezeichnet. Entsprechend der Expression von CD44 (Adhäsionsmolekül) und CD25 (IL-7 Rezeptor) werden DN in die vier Subklassen DN1 bis DN4 unterteilt (Zlotnik et al., 1992). Die unreifsten in den Thymus einwandernden Progenitorzellen stellen die CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> DN1 Thymozyten dar, die ein relativ breites Entwicklungspotential für αβ- (und γδ) T-Zellen, aber auch für Dendritische Zellen (DCs), Natürliche Killerzellen (NKs), Makrophagen und B-Zellen besitzen (Shortman and Wu, 1996; Porritt et al., 2004). DN2 Thymozyten sind CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, beginnen zu proliferieren und bewegen sich dabei in Richtung des äußeren Thymuskortex. Im Stadium DN2-DN3 wird die Umlagerung des TCRβ- (sowie TCRγ- und TCRδ-) Locus in der kortiko-medullären Region und dem inneren Kortex initiiert (Thompson and Zuniga-Pflucker, 2011). Im DN3-Stadium (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) werden Thymozyten mit einem funktionellen TCRβ positiv selektiert (β-Selektion)(Rothenberg et al., 2008). Diese stellen die ersten T-Linien-spezialisierten Zellen des Thymus dar. DN4 Thymozyten (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) bilden aus der funktionellen β-Rezeptorkomponente und der prä-T-Zell-Rezeptor-α-Kette den prä-T-Zell-Rezeptor (*pre-TCR*; pTα), dessen Signalübertragung weitere Genumlagerungen am TCRβ- (sowie TCRγ- und TCRδ-) Locus verhindert. Anschließend findet, teilweise über ein intermediäres CD8<sup>+</sup>-Stadium (*CD8 intermediate single positive*, CD8ISP), die Differenzierung in CD4 und CD8 doppelt-positive (*double positives*; DP) Thymozyten statt. DP proliferieren stark und stellen damit die zahlenmäßig stärkste Zellpopulation im Thymus dar. Sie vollziehen die Umlagerung der TCR α-Ketten-Gene und die Bildung des α:β-TCR. In nachfolgenden Selektionsprozessen hängt das Überleben der DP von der Bindungsstärke ihres α:β-TCR zu den exprimierten körpereigenen MHC/Peptid-Komplexen auf kortikalen Thymusepithelzellen (cTECs) ab. DP, deren TCR eine minimale Bindung zu den körpereigenen MHC/Peptid-Komplexen aufweist, erhalten ein Überlebenssignal (Positivselektion) und differenzieren in einzel-positive (*single positive*, SP)



**Abbildung 1 Oberflächenexpression der Thymozyten-Entwicklungsstufen und ihre Darstellung in der Durchflusszytometrie.**

Die frühesten, im Thymuskortex heranreifenden Entwicklungsstufen befinden sich innerhalb der TCRβ- und Linien-negativen Population der CD4CD8-DN Thymozyten und können über die unterschiedliche Expression von CD44 und CD25 in DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+) und DN4 (CD44-CD25-) unterschieden werden. Nach der Hochregulierung von CD4 und CD8 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; DP) findet die terminale Ausreifung zu CD4SP (CD4<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>) und CD8SP (CD8<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>) Thymozyten in der Medulla statt. TCRβ, T-cell receptor β; lineage, reife, ausdifferenzierte hämatopoetische Linienzellen; DN, doppelt negativ; DP, doppelt positiv; SP, einzel (single) positiv.

CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Thymozyten, entsprechend ihrer Bindungsspezifität für MHC-II bzw. MHC-I-Moleküle (Dervovic and Zuniga-Pflucker, 2010; Klein et al., 2009). DP mit ungenügender Bindungsaffinität ihres TCR werden dagegen vernachlässigt und sterben (*death by neglect*, Tod durch Vernachlässigung). Positiv selektionierte SP wandern in die Medulla, wo sie ein über das Todessignal TRAIL vermittelter aktivierungsinduzierter Zelltod erwartet, wenn ihr

TCR zu starke und damit autoreaktive Bindungseigenschaften zu körpereigenen MHC/Peptid-Komplexen aufweist (Negative Selektion). Bei nur 2% der ursprünglich DP Thymozyten besitzt der TCR eine mittlere Affinität zu körpereigenen MHC/Peptid-Komplexen. Nur diese überleben den Selektionsprozess, differenzieren aus und verlassen den Thymus als naive T-Zellen (Thompson and Zuniga-Pflucker, 2011).

#### 4.1.1 Die Entwicklung von natürlichen regulatorischen T-Zellen

Einige CD4<sup>+</sup>SP Thymozyten weisen im medullären Selektionsprozess sehr starke, aber noch keine Apoptose induzierenden Signale des TCR mit MHC/Selbstpeptid-Komplexen auf. Diese erhalten eine besondere Spezialisierung. So entwickeln sich die, in der Thymusmedulla generierten Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, Vorläuferzellen in einem mehrstufigen Prozess zu Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> natürlichen regulatorischen T-Zellen (*nT<sub>regs</sub>*, *natürliche T<sub>regs</sub>*) (Lio and Hsieh, 2008; Hinterberger et al., 2011). Bei der Selektion der regulatorischen T-Zellen spielen medulläre Thymusepithelzellen eine wichtige Rolle (Aschenbrenner et al., 2007). *T<sub>regs</sub>* sind in der Lage überschießende Immunantworten zu unterdrücken. Damit wird ihnen eine wichtige Rolle in der negativen Regulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems zur Vermeidung von Autoimmunphänomenen zugesprochen.

#### 4.1.2 Die Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen im Thymus

Die hohe Variabilität der T-Zell-Rezeptoren wird durch zufällige Umlagerungen der Gene für die leichten und schweren ( $\alpha$ - und  $\beta$ -) Ketten gewährleistet (somatische Rekombination). Fehlerhafte Rekombinationen können zur aberranten Aktivierung von Onkogenen und zur gestörten T-Zellentwicklung führen. Dies kann mit einer erhöhten Anfälligkeit für weitere genetische Ereignisse einhergehen und die Entstehung einer Leukämie begünstigen (Larmonie et al., 2014; Aifantis et al., 2008). Im Thymus können auf diese Weise die malignen hämatologischen Erkrankungen *akute lymphoblastische Leukämie* (T-ALL) und *T-lymphoblastischen Lymphome* (T-LBL) entstehen. Insbesondere bei der Entstehung von Leukämien im Knochenmark spielt das Stroma eine besondere Rolle (Raaijmakers, 2012). Jedoch ist bisher nicht erforscht, welche Rolle das Stroma im Thymus und insbesondere TECs bei der Entstehung von T-Zell-Leukämien spielt.

## 4.2 Naive, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen in der Peripherie

Die aus dem Thymus entlassenen naiven CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zirkulieren in der Peripherie und treten aufgrund der Hochregulierung des *Homing-factors* CD62L (*L-Selektin*) dabei wiederholt in die sekundären lymphoiden Organe (Lymphknoten und Milz) ein (Sallusto et al., 1999). Dort führt die Aktivierung der T-Zellen durch ein von professionellen APCs (*antigen presenting cell, APC*) (DC, Makrophagen und B-Zellen) präsentiertes spezifisches Antigen zur Proliferation und zur Differenzierung in kurzlebige Effektorzellen und langlebige Gedächtniszellen (Sallusto et al., 2004; Kaech and Ahmed, 2001). CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektorzellen tragen zur Beseitigung des Antigens bei. Innerhalb der Gedächtniszellen werden zwei Subpopulationen unterschieden. Die zentralen Gedächtniszellen (*central memory T cells, T<sub>cm</sub>*) (im Maussystem CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) verbleiben im lymphatischen Gewebe und können bei erneutem Antigenkontakt aktiviert werden und sich zu Effektorzellen umwandeln. Die Effektor-Gedächtniszellen (*effector memory cells, T<sub>em</sub>*) (im Maussystem CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) dagegen zirkulieren in der Peripherie und sind in der Lage schnell und effizient auf erneuten Antigenkontakt zu reagieren (Sallusto et al., 2004; Michalek and Rathmell, 2010).

## 4.3 Die Funktion von Thymusepithelzellen

Die thymische T-Zellentwicklung ist kein Thymozyten-autonomer Prozess sondern erfolgt in Abhängigkeit vom umliegenden Stroma, das aus Thymusepithelzellen (*thymic epithelial cells, TECs*), Endothelzellen, Dendritischen Zellen (*dendritic cells, DCs*), Makrophagen und Fibroblasten besteht. Vor der altersassoziierten Thymus-Involution stellen TECs die am häufigsten vorkommende Zellpopulation innerhalb des Thymusstroma dar (Alves et al., 2009). Die funktionelle Bedeutung der TECs zeigt sich dadurch, dass Keimbahn-Mutationen in TECs zu einer eingeschränkten Funktion führen und mit Autoimmunität oder Immundefizienz einhergehen (Romano et al., 2013).

Entsprechend den beiden anatomischen Bereichen des Thymus können die Thymusepithelzellen auch funktionell in kortikale (*cortical TECs, cTECs*) und medulläre Thymusepithelzellen (*medullary TECs, mTECs*) unterteilt werden. Sie exprimieren unterschiedliche membran-ständige Liganden (NOTCH-Ligand *Delta-like 4, DLL4* und Selbst-Peptid/Selbst-MHC-Komplexe), Zytokine (*Interleukin 7, IL-7* und *stem cell factor, SCF* (Rodewald et al., 1995)) und Chemokine (Cxcl12 und Ccl25), die für die unterschiedlichen Phasen der T-Zellentwicklung essentiell sind. cTECs unterstützen die frühe T-Zellentwicklung bis zur positiven Selektion der DP. cTECs exprimieren DLL4, dessen Interaktion mit dem NOTCH1-Rezeptor an Thymusvorläuferzellen für die Spezialisierung in

die T-Zelllinie (*commitment*) wichtig ist (Koch et al., 2008). Des Weiteren sekretieren cTECs IL-7 und unterstützen damit die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der sich entwickelnden DN Thymozyten (Zamisch et al., 2005). Die von cTECs exprimierte MHC-Komplexe regulieren über die Präsentation von Selbst-Peptid die positive Selektion von DP mit einer mittelstarken Bindungsaffinität ihres TCR $\beta$ .

Mit Eintritt der positiv selektierten CD4<sup>+</sup>SP und CD8<sup>+</sup>SP in die Medulla regulieren die medullären Thymusepithelzellen die für die finale T-Zellausreifung erforderlichen Prozesse. mTECs vermitteln über den Transkriptionsfaktor Auto-Immun-Regulator (*Auto-immune-regulator*, AIRE) die Expression verschiedener peripherer Gewebeantigene. Damit haben sie eine wichtige Rolle in der Induktion von Selbsttoleranz. Die Präsentation der Selbstantigene gegenüber CD4<sup>+</sup>SP und CD8<sup>+</sup>SP erfolgt gemeinsam durch AIRE<sup>+</sup>mTECs und thymische DCs. Beide Zellpopulationen sind ebenso für die, durch ein induziertes Apoptoseprogramm erfolgende, negative Selektion von autoreaktiven Thymozyten verantwortlich (Negativselektion) (Perry et al., 2014; Anderson et al., 2002). mTECs exprimieren neben MHC class I/II auch die kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 (Rossi et al., 2002). Somit ermöglichen mTECs TCR-MHC und CD28-CD80/86-Interaktionen (Lio and Hsieh, 2008; Lio et al., 2010; Vang et al., 2010; Cowan et al., 2013) und regulieren die Entwicklung von Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> nT<sub>reg</sub>-Vorläuferzellen und Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> aus CCR7<sup>+</sup>CCR9<sup>-</sup> SP4 Thymozyten (Cowan et al., 2013).

#### 4.4 Die Thymusontogenese

In der Maus entsteht die frühe Thymusanlage gemeinsam mit der Nebenschilddrüsenanlage durch Ausknospung aus dem endodermalen Epithel der dritten Kiementasche (Gordon et al., 2004). Die im ventralen Bereich der Ausknospung liegende Thymusanlage zeichnet sich ab E10,5 durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Foxn1* (*Forkheadbox 1*) aus. *Foxn1* gilt als zentraler Regulator für die TEC-Entwicklung (Corbeaux et al., 2010). Mutationen im *Foxn1*-Gen gehen mit einer gestörten T-Zellentwicklung und einer fehlenden Körperbehaarung (*nude* Phänotyp/Nacktmaus) einher (Nehls et al., 1994). *Foxn1*-defizienten TECs fehlt die Expression der Chemokine Ccl25 und Cxcl12, des Wachstumsfaktors SCF und des NOTCH-Liganden DLL4. Dadurch sind diese TECs nicht in der Lage hämatopoetische Vorläuferzellen, die normalerweise ab E11 in die Thymusanlage einwandern, herbeizulocken und die T-Zellentwicklung zu induzieren (Calderon and Boehm, 2012). Ab E12 findet die Besiedlung der Thymusanlage mit Endothelzellen statt. Diese bilden ab E13 vaskuläre Strukturen mit Lumina (Mori et al., 2010). Weiterhin führt die *Foxn1*-abhängige Expression von *Vegf* (*vascular endothelial growth factor*) zu Verästelungen des

Gefäßsystems im Thymusstroma (Muller et al., 2005). Von E14 an können das cTEC- und mTEC-Kompartiment voneinander unterschieden werden (Gordon and Manley, 2011). Diese können aufgrund ihrer Expression von Ly51 und Keratin 8 (cTECs) bzw. der Fähigkeit UEA (*Ulex europaeus agglutinin*) zu agglutinieren und der Expression von Keratin 14 (mTECs) voneinander unterschieden werden.

Beide Subpopulationen, cTECs und mTECs, stammen von gemeinsamen bipotenten TEC-Progenitorzellen (Rossi et al., 2006; Bleul et al., 2006). Möglicherweise durchlaufen diese zunächst ein vorgegebenes Stadium, in dem cTEC-Marker exprimiert werden, bevor die Spezialisierung in die kortikale oder medulläre Linie erfolgt (Alves et al., 2014). Ein Verlust der endodermalen Vorläuferzellen kann zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr ausreichend kompensiert werden. Dies spricht für ein nur gering ausgeprägtes Selbsterneuerungspotential von TECs (Jenkinson et al., 2008). Wird dagegen ein defizientes *Foxn1*-Allel postnatal genetisch in ein funktionsfähiges *Foxn1*-Allel revertiert so kommt es zur Entwicklung von kleinen Einheiten funktionstüchtigem Thymusgewebe mit medullären und kortikalen Strukturen. Die bipotenten TEC-Progenitorzellen stammen in adulten Mäusen von selten auftretenden *Foxn1*-negativen Zellen (Ucar et al., 2014). In Einzelzell-Assays unter Einsatz der Sphären-Kulturmethode zeigten *Foxn1*-negative Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie das Potential, sich in cTECs und mTECs zu entwickeln. Demnach erscheint *Foxn1* vornehmlich für die terminale Differenzierung und den Erhalt von TECs erforderlich zu sein (Ucar et al., 2014).

In 4 bis 6 Wochen alten Mäusen werden etwa 10% der Linien-determinierten cTECs und mTECs pro Tag erneuert. Damit stellen TECs eine sehr dynamische Zellpopulation dar (Shakib et al., 2009; Gray et al., 2006). Die initiale Entwicklung von cTECs erfolgt ohne Wechselwirkung mit T-Vorläuferzellen (Klug et al., 2002). Für die terminale Ausreifung zu CD40<sup>+</sup>MHCII<sup>high</sup> exprimierenden cTECs und die Expression von DLL4 ist dagegen die Interaktion mit DP-Thymozyten erforderlich (Klug et al., 2002; Fiorini et al., 2008). In Studien an chimären Mäusen konnte gezeigt werden, dass aus vereinzelt mTEC-Progenitorzellen sich entwickelnde medulläre Thymusareale hervorgehen, die im adulten Stadium zu größeren medullären Arealen verschmelzen (Rodewald et al., 2001). Innerhalb des mTEC-Kompartimentes können reifere AIRE<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>MHCII<sup>high</sup> mTECs (mTEC<sup>high</sup>) aus CD80<sup>-</sup>MHCII<sup>low</sup> mTECs (mTEC<sup>low</sup>) hervorgehen (Rossi et al., 2007; Gabler et al., 2007). Bisher ist allerdings unklar, wie groß der Anteil von Progenitorzellen innerhalb dieser mTEC<sup>low</sup>-Population ist. Die finale Ausreifung und Expansion der reiferen AIRE<sup>+</sup>mTEC<sup>high</sup> erfolgt durch die Interaktion mit *lymphoid tissue inducer* (LTi) und CD4<sup>+</sup>SP-Thymozyten, die CD40 und *receptor activator NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) exprimieren (Rossi et al., 2007; Irla et al., 2008; Akiyama et al., 2008).

Ein weiterer Signalweg, der die Entwicklung und Funktion der mTECs beeinflusst, ist der Lymphotoxin  $\beta$ -Signalweg (Venzani et al., 2007; Mouri et al., 2011; Boehm et al., 2003).

In Abhängigkeit von mehreren Faktoren, wie Sauerstoffaktivität und Gefäßdichte, variiert der Sauerstoffpartialdruck innerhalb von unterschiedlichen Organsystemen. Mit der Hilfe von Meßsonden konnte bei Mäusen festgestellt werden, dass der Thymus zu den Organen mit dem verhältnismäßig niedrigsten Sauerstoffpartialdruck gehört. Im Thymus waren die gemessenen Werte im Mittel unter 10 mmHg ( $<1,35\text{kPa}$ ) (Braun et al., 2001). Bemerkenswerterweise wird der Hypoxie-Signalweg ab einem Sauerstoffpartialdruck unter 10 mmHg in Zellen aktiviert (Jiang et al., 1996). Dies spricht dafür, dass unter normalen Bedingungen im Thymus der Hypoxie-Signalweg aktiviert ist. Mit einer Hypoxie-Markersubstanz (Pimonidazole) konnte im Speziellen nachgewiesen werden, dass TECs einem hypoxischen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt sind (Hale et al., 2002). Zur Rolle des Hypoxie-Signalweges in TECs gibt es bisher keine publizierten Daten.

#### **4.5 Thymusinvolution und -schädigung nach antineoplastischer Therapie**

Der Thymus produziert vom fetalen bis zum postnatalen Stadium die meisten T-Zellen und ist während dieser Periode am größten ausgeprägt. Die vor Beginn der Pubertät beginnende physiologische Rückbildung (Involution) betrifft Thymozyten und TECs gleichermaßen. Während die Gesamt-TEC/Thymozyten-Ratio unverändert bleibt, steigt die Zellularität der nicht-stromalen Zellen, insbesondere der Adipozyten beträchtlich. Innerhalb der TEC-Subpopulationen finden sich weniger mTEC<sup>high</sup>, jedoch entsprechend mehr cTECs. (Heng et al., 2010; Gray et al., 2006) Der Thymus behält zeitlebens die Fähigkeit, unreife Thymozyten-Progenitoren zu immunkompetenten T-Zellen zu entwickeln.

Chemo- oder/und Strahlentherapie werden häufig als Prækonditionierung zur Behandlung (Knochenmarkstransplantation, Hochdosistherapie mit autologer Stammzellrückgabe) von unterschiedlichen Krebserkrankungen eingesetzt. Die Wirkung von Chemo- und Strahlentherapie wird durch den Hypoxie-Signalweg beeinflusst (Moeller et al., 2004; Moeller et al., 2005). Beide Therapieformen werden nicht selten von einer kurzen aplastischen Phase und einer ausgedehnten T-Zelldefizienz begleitet (Mackall et al., 1997; Krenger et al., 2011). Aufgrund der verzögerten Rekonstitution des reifen T-Zellkompartimentes treten häufig opportunistische Infektionen auf (Mackall et al., 1997; Seggewiss and Einsele, 2010). Die Regeneration des peripheren T-Zellpools kommt anschließend einerseits durch die klonale Expansion von überlebenden peripheren T-Zellen zustande (Jameson, 2005), andererseits durch das thymische Heranreifen von *de novo* naiven T-Zellen mit diversen TCR.

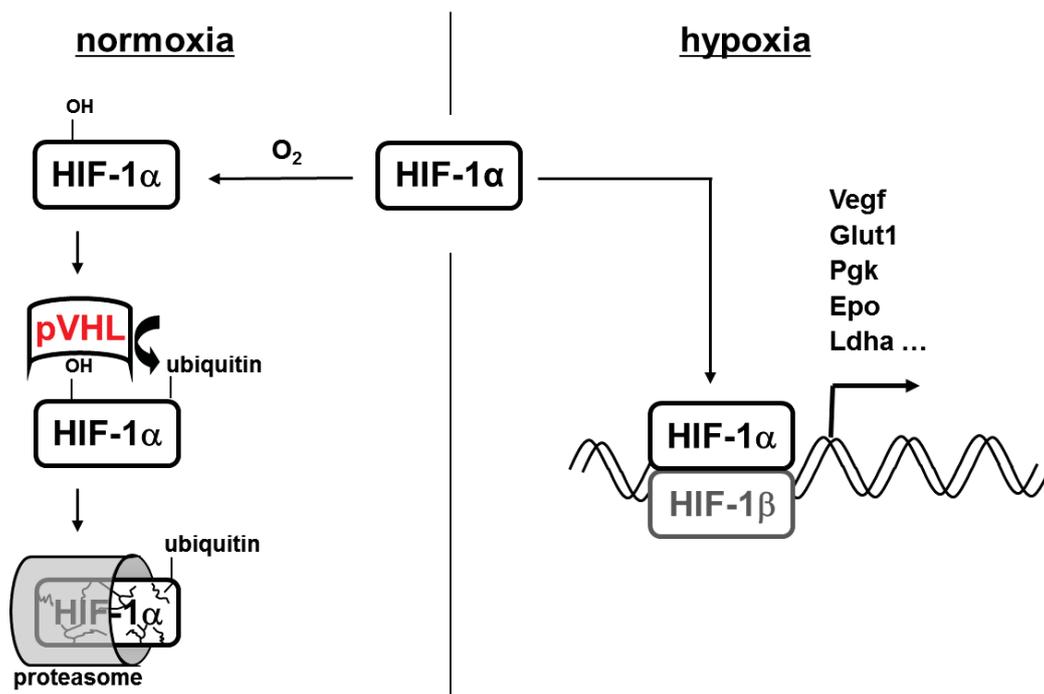
Sowohl Chemo- als auch Strahlentherapie wirken zytotoxisch auf TECs, insbesondere auf mTECs. Damit wird der inhibitorische Effekt auf die T-Zellentwicklung verstärkt (Adkins et al., 1988; Williams et al., 2009). Weitere Gegebenheiten, die in diesem Zusammenhang die TEC-Funktion und die T-Zell-Regeneration zusätzlich negativ beeinflussen, sind die altersassoziierte natürliche Thymusinvolution und die Transplantat-Wirt-Reaktion bei allogener KM-Transplantation (Krenger et al., 2011). Bestrahlung führt zu einer Dosis-abhängigen qualitativen und quantitativen Inhibition der thymischen T-Zellentwicklung. In bestrahlten Mäusen erfolgt die Rekonstitution des T-Zellkompartimentes, abhängig von der Strahlendosis (subletal oder letal gefolgt von einer KM-Transplantation) innerhalb weniger Tage oder Wochen, deutlich schneller als die des TEC-Kompartimentes (Randle-Barrett and Boyd, 1995; Kelly et al., 2008). Auch in der chemotherapeutischen Behandlung mit Cyclophosphamid (200mg/kg über 2 Tage) oder Dexamethason (einmalig 20mg/kg) zeigen sich TECs sensibler für schädigende Effekte und zeigen deutlich später regenerierte Zellzahlen (Fletcher et al., 2009).

#### 4.6 Der Hypoxie-Signalweg

In allen aeroben Organismen wird Sauerstoff ( $O_2$ ) zur Energiegewinnung und damit zur Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels benötigt. Glukose und Fette werden innerhalb verschiedener aerober Prozesse abgebaut, die Abbauprodukte (Pyruvat und Fettsäuren aus Glukose bzw. Fett) in den mitochondrialen Zitratzyklus geleitet und die gewonnene Energie innerhalb der Atmungskette durch oxydative Phosphorylierung in ATP konserviert. Der Oxygenierungszustand der Zelle wird durch die Sauerstoffverfügbarkeit und den –verbrauch bestimmt. Eine Unterversorgung mit  $O_2$  bedeutet zellulären Stress, der mit der Bildung von freien Radikalen und dem Risiko von Schäden für Proteine und DNA einhergeht. Um die Sauerstoff-Homeostase aufrecht zu erhalten, haben Metazoen daher einen aufwändigen Mechanismus entwickelt, der die zelluläre und systemische Anpassung an hypoxische Bedingungen ermöglicht. Dieser wird über den Hypoxie-Signalweg (*hypoxia-response pathway*) reguliert (Semenza, 2012; Majmundar et al., 2010; Zepeda et al., 2013).

Die zentralen Komponenten des Hypoxie-Signalweges stellen die *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktoren *hypoxia-inducible factors* (HIF) dar. HIFs sind heterodimere Proteine, die aus einer instabilen Sauerstoff-sensitiven  $\alpha$ -Untereinheit (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ ) und einer stabilen nukleären  $\beta$ -Untereinheit (HIF1 $\beta$ ), die auch als ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) bezeichnet wird, bestehen. Beide Untereinheiten werden konstitutiv exprimiert: HIF1 $\alpha$  ubiquitär, HIF2 $\alpha$  (Epas1, *endothelial PAS domain 1*) eher gewebe-spezifisch. Eine weitere Isoform, HIF3 $\alpha$ , wurde in Säugetieren bisher nur begrenzt

nachgewiesen. Unter Normoxie werden die instabilen HIF $\alpha$ -Untereinheiten von Prolylhydroxylasen (PHD) an bis zu zwei Prolinresten hydroxyliert. Damit wird die hochaffine Bindung an das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) ermöglicht. Als Erkennungskomponente einer E3-Ligase vermittelt pVHL die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von HIF $\alpha$  (Abb. 2). Unter hypoxischen Bedingungen ist die Hydroxylierung durch PHD gehemmt. Es erfolgt eine Stabilisierung der HIF $\alpha$ -Untereinheiten, die Translokation in den Nukleus und die Dimerisierung mit der stabilen HIF1 $\beta$ -Untereinheit. Die Bindung der Heterodimere an konservierte Erkennungssequenzen innerhalb *hypoxia responsive elements* (HRE) aktiviert Gene, die die zelluläre Anpassung an Hypoxie vermitteln. Die HIF-Zielgene greifen in zelluläre Prozesse ein, die die Zellproliferation hemmen, die Apoptose steigern, die Rate der oxydativen Phosphorylierung vermindern und die anaerobe Glykolyserate (*Glut1*, *Slc2a1*) steigern, um den Sauerstoffverbrauch zu vermindern. Gleichzeitig werden Gene aktiviert, die die Produktion von angiogenen Faktoren (*Vegf*) erhöhen, um die Sauerstoffzufuhr zu verstärken (Kaelin, Jr., 2008; Keith et al., 2012).



**Abbildung 2 Der Hypoxie-Signalweg.**

Der Hypoxie-Signalweg kontrolliert auf molekularer Ebene die zelluläre Anpassung an Hypoxie. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1 $\alpha$  kontinuierlich von Prolylhydroxylasen in einer Reaktion, die Sauerstoff erfordert, hydroxyliert, von pVHL (von Hippel-Lindau Protein) ubiquitinyliert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Unter hypoxischen Bedingungen ist die Hydroxylierung inhibiert. HIF1 $\alpha$  akkumuliert, transloziert in den Nukleus, wo es mit HIF1 $\beta$  Dimere bildet, die zur Aktivierung von HIF-Zielgenen wie zum Beispiel *Vegf*, *Glut1*, *Pgk*, *Epo* und *Ldha* führt.

Der Tumorsuppressor *Vhl* wird ubiquitär exprimiert und besteht aus 3 Exonen. Das Protein pVHL kann in Zytoplasma und Zellkern detektiert werden. Als Multi-Adaptorprotein wird pVHL eine Vielzahl an Transkriptions-abhängigen und unabhängigen Funktionen zugeschrieben. Durch die Interaktion mit zum Beispiel Kollagen IV und Fibronectin unterstützt pVHL den Aufbau der extrazellulären Matrix (ECM). Gleichzeitig reguliert pVHL das mikrotubuläre Zytoskelett. Auf transkriptionellem Wege werden beispielsweise das zelluläre Überleben (NF- $\kappa$ B), Zellzyklusarrest und Apoptose (p53) und Seneszenz (p400) beeinflusst. Die am besten beschriebene pVHL-Funktion ist jedoch die als Erkennungs-Untereinheit eines VCB (Cul2, Elongin B und C) E3-Ligase Komplexes, der innerhalb des Hypoxie-Signalweges HIF $\alpha$  Sauerstoff-abhängig negativ reguliert (Frew and Krek, 2008).

#### 4.6.1 Klinische Relevanz des genetischen *VHL*-Verlustes

Das von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom) ist ein autosomal-dominant vererbtes Tumordispositions-Syndrom, das mit einer heterozygoten Keimbahn-Mutation im *VHL*-Gen (Chromosom 3) einhergeht. Erst die Mutation oder Deletion des unmutierten *VHL*-Allels (*loss of heterozygosity*, LOH) führt zur Entstehung von hoch vaskularisierten Tumoren in den betroffenen Geweben (zentrales Nervensystem, Nieren, Pankreas)(Lonser et al., 2003). Es wurden bisher keine Untersuchungen zum lymphatischen Immunsystem bei VHL-Patienten veröffentlicht.

pVHL kontrolliert über HIF auch immunologische Vorgänge. Innerhalb des angeborenen Immunsystems benötigen zum Beispiel myeloide Zellen wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen HIF für Infiltrationsvorgänge. Der Verlust von VHL führt über erhöhte HIF-Expression zu gesteigerten akuten Entzündungsprozessen (Cramer et al., 2003). Innerhalb der Zellen des erworbenen Immunsystems reguliert HIF1 die Balance zwischen T<sub>reg</sub><sup>-</sup> und T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung (Dang et al., 2011). *Vhl*-Defizienz in CD8<sup>+</sup>-Zellen unterstützt HIF-abhängig die Effektorfunktion bei chronischen Infektionen und führt zu letaler Immunopathology (Doedens et al., 2013). HIFs können dazu unter normoxischen Bedingungen über externe Stimuli, die über Toll-like Rezeptoren und TCR vermittelt werden aktiviert werden und Einfluss üben.

Eine spezifische homozygote Keimbahn-Mutation des *VHL*-Gens liegt bei der kongenitalen autosomal rezessiven Chuvash Polyzytämie vor. Das veränderte pVHL-Protein verliert die Fähigkeit mit *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1) einen heterodimeren E3-Ligase-Komplex zu bilden um den proteasomalen Abbau von phosphorylierten JAK2 zu initiieren. Damit ist eine konstitutive Aktivierung des JAK2-STAT5-Signalweges gegeben (Russell et al.,

2011). Die Erkrankung geht mit einer Polyzytämie einher. In diesen Patienten sind keine lymphatischen Erkrankungen bekannt.

#### **4.7 Zielsetzung**

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des Hypoxie-Signalweges, im Speziellen des negativen Regulators pVHL in Thymusepithelzellen zu untersuchen.

Es war geplant, die Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* durchzuführen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

**Tabelle 1** Liste der verwendeten Labormaterialien

Artikel	Hersteller
Cell-Coun-Tainer 1 mit Deckel	Ratiolab, Dreieich
Deckgläschen 24 x 40mm	Menzel, Braunschweig
Deckgläser, plan geschliffen (24x24mm)	Menzel, Braunschweig
Einfriergefäße Cryo.s™	Greiner Bio-One, Solingen
Einfrierkontainer Nalgene® Mr. Frosty	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS-Röhrchen 5ml	BD Biosciences, Heidelberg
Färbeküvetten Rotilabo®	Roth, Karlsruhe
ImmEdge-Pen	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Kanülen 20G	BD Diagnostics
Microtest™ U-Bottom, 96 well	BD Biosciences, Heidelberg
Microtomklingen Feather® Typ S35	pfm medical, Köln
Mikrozentrifugengefäße 1,5ml	StarLab, Ahrensburg
Mullkompressen	Beese Medical, Barsbüttel
Multiwell™ 12 well, Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg
Multiwell™ 24 well, Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg
Multiwell™ 6 well, Tissue culture treated	BD Biosciences, Heidelberg
Neubauer Kammer 0,1mm	Assistent, Sondheim
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Objektträgerhalter Rotilabo®	Roth, Karlsruhe
PCR-Streifen, 0,2ml Gefäße und Deckel	Greiner Bio-One, Solingen
Pipettenspitzen 10, 20, 100, 200, 1000µl	StarLab, Ahrensburg
Pipettierhilfe	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt
Spritzen 1ml	Terumo Europe, Belgien
Stabpipetten	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturflaschen, 75cm <sup>2</sup> mit Filtercap	Greiner Bio-One, Solingen
Zellsieb 40µm, 100µm (Nylon)	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen Falcon, 15 ml, steril	Greiner Bio-One, Solingen
Zentrifugenröhrchen Falcon, 50 ml, steril	Greiner Bio-One, Solingen

**Tabelle 2** Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage ALJ 220-4NM	Kern, Balingen
Autoklav D-65	Systec, Wettenberg
Cellsorter FACSAria II	BD Biosciences, Heidelberg
Cellsorter FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer BD LSRII	BD Biosciences, Heidelberg
Geldokumentationsystem	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoresekammer Sub-Cell®GT	BioRAD, München
Genetic sequencer 3130XL	Firma Applied biosystems
Inkubator	Thermo Scientific, Braunschweig
Kryomikrotom Leica CM1850 UV	Leica Biosystems, Wetzlar
Mikroskop BZ-9000	Keyence, Osaka, JP
Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Mikroskop DM1000LED	Leica Biosystems, Wetzlar
Photometer plus	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage EW 4200-2NM	Kern, Balingen
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank Laminar Flow	BSH AG, Dettingen
Thermocycler Flex Cycler	Analytik Jena, Jena
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Vortexer Genius 3	IKA, Staufen
Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Allegra 6KR	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Allegra X-15R	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

### 5.1.2 Zelllinien und Medien

**Tabelle 3** Verwendete Thymusepithelzelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Referenz
ANV41.2	murines Thymusepithel von k14 E6/E7 hyperplastischen Thymi; kortikale Eigenschaften	Andrew G. Farr University of Washington, Seattle, USA (Nelson et al., 1998)
	enzymatisch dissoziiertes murines	Andrew G. Farr

TE-71	Thymusstroma; medulläre Eigenschaften	University of Washington, Seattle, USA (Farr et al., 1989)
-------	--	---

### Zusammensetzung der Medien für die Zellkultur

Medium für ANV-Zellen: D'MEM mit GlutMAX™, 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin

Medium für TE-71-Zellen: IMDM, 15% FKS, 1% Penicillin-Streptomycin

Einfriermedium: 90% FKS, 10% DMSO

### 5.1.3 Lösungen und Puffer

FACS-Puffer: PBS  
1 % NaN<sub>3</sub>  
+ 2% FKS

Schwanzlyse-Puffer: 20ml 5M NaCl  
+ 5ml 0,5M EDTA (pH8,5)  
+ 50ml 0,1M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5)  
+ 12,5ml 20% SDS  
+ 0,5mg/ml Proteinase K  
ad 500ml mit A.dest auffüllen

TAE-Puffer (50x): 242g Tris Base  
+ 57,1ml Eisessig  
+ 100ml 0,5M EDTA (pH 8)  
ad 1000ml mit A.dest auffüllen

Tris-HCl-Puffer (1M): 121,14g Tris Base  
ad 1000ml mit A.dest auffüllen  
mit HCl auf pH 8,5 einstellen

Percoll-Lösungen: 1,124g/ml  
1 Volumen 10x PBS  
+ 9 Volumen Percoll 1,13g/ml

1,115g/ml  
0,726ml 1x PBS  
+ 9,274ml 1,124g/ml Percoll

1,065g/ml  
4,76ml 1x PBS  
+ 5,24ml 1,124g/ml Percoll

### 5.1.3 Antikörper und Konjugate

**Tabelle 4** Liste der verwendeten Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der murinen Thymus- und Milzzellen

Spezifität	Konjugation	Klon	Hersteller
AA4.1	PE	AA4.1	eBioscience
Bp-1 (Ly-51)	PE	Bp-1	BDPharmingen
CD19	PerCP-Cy5.5	1D3	BDPharmingen
CD19	eF450	eBio1D3	eBioscience
CD21/35	APC	7G6	BDPharmingen
CD23	PE-Cy7	B3B4	BioLegend
CD25	eF450	eBio3C7	eBioscience
CD25	AF488	eBio3C7	eBioscience
CD28	PE-Cy7	LG.7F9	eBioscience
CD31	PerCP-Cy5.5	390	eBioscience
CD326 (EpCAM)	APC	G8.8	eBioscience
CD3e	PerCP-Cy5.5	145-2C11	eBioscience
CD4	PE-Cy7	RM4-5	BDPharmingen
CD4	Pacific blue	RM4-5	BDPharmingen
CD4	PerCP-Cy5.5	RM4-5	eBioscience
CD44	FITC	IM7	BDPharmingen
CD45	PE-Cy7	30-F11	BDPharmingen
CD45R/B220	PerCP-Cy5.5	RA3-6B2	eBioscience
CD62L	PE	MEL-14	BDPharmingen
CD69	FITC	H1.2F3	BDPharmingen
CD8	eF780	53-6.7	eBioscience
CD8	PerCP-Cy5.5	53-6.7	BDPharmingen
c-kit (CD117)	APC	2B8	BDPharmingen
Gr1	PerCP-Cy5.5	RB6-8C5	BDPharmingen
IgD	FITC	11-26c	eBioscience
IgM	bio	ILL42	eBioscience
Mac1	PerCP-Cy5.5	M1/70	BDPharmingen
MHCII	APCeF780	M5114.15.2	eBioscience
Nk1.1	PerCP-Cy5.5	PK136	eBioscience
Notch1	PE	HMN1-12	Biolegend
TCR-beta	bio	H57-597	eBioscience
TCR-beta	PE	H57-597	BDPharmingen
TCR-beta	PerCp-Cy5.5	H57-597	eBioscience
Ter119	PerCP-Cy5.5	TER119	eBioscience

**Tabelle 5** Liste der Fluorochrom-Konjugate zur Nachfärbung biotynilierter Antikörper bzw. zum Nachweis muriner medullärer Thymusepithelzellen

Fluorochrom	Hersteller
Streptavidin-PE-Cy7	BDPharmingen
Streptavidin-APCeF780	eBioscience
Ulex europeus agglutinin-FITC	Vector Laboratories

**Tabelle 6** Verwendete unkonjugierte und konjugierte Antikörper für die Immunfluoreszenz an murinen Kryoschnitten

Spezifität	Hersteller
<b>Unkonjugierte Primärantikörper</b>	
K8 (TROMA) (rat)	Developmental Studies
K14 (rabbit)	Covance
<b>Konjugierte Primär- und Sekundärantikörper</b>	
AF488 anti-rat IgG	Invitrogen
EpCAM-APC (G8.8)	ebioscience
FITC pan-Cytokeratin (C-11)	Sigma
PE anti-rabbit IgG	Invitrogen

#### 5.1.4 Kits

**Tabelle 7** Liste der verwendeten Kits

Kits	Hersteller
Advantage® RT for PCR Kit	ClonTech, Heidelberg
AnnexinV Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, Heidelberg
APC BrdU Flow-Kit der	Firma BD Pharmingen
Fast Frozen Stain Kit	Polysciences, Warrington, PA, USA
PAS-Färbesystem	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAamp DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taqman Assays	Applied Biosystems, Darmstadt

### 5.1.5 Primer und Taqman-Sonden

**Tabelle 8** Liste der verwendeten Genotypisierungs- und Expressionsprimer mit Arbeitsgruppeninterner ID (#)

ID	interner Name	Sequenz in 5' - 3' Richtung	Zielsequenz
# 12	ROSA_rep_161	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT	ROSA-Reporter-Lokus
# 13	ROSA_rep_162	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC	ROSA-Reporter-Lokus
# 14	ROSA_rep_163	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG	ROSA-Reporter-Lokus
# 17	hprt_f	TCG TGA TTA GCG ATG ATG AAC C	Hprt-mRNA
# 18	hprt_r	CTG GCA ACA TCA ACA GGA CTC C	Hprt-mRNA
# 74	Vhlh-F1	TCA GGT ATG TGT GTG CGC AA	Vhl-Lokus
# 75	Vhlh-F2	CCT GCC TTG GTG ATG ACA AC	Vhl-Lokus
# 76	Vhlh-R1	ACC TGA GAG CGG CTT CAC TT	Vhl- Lokus
# 200	HIF_fwd2	GCA GTT AAG AGC ACT AGT TG	HIF-DF
# 329	Foxn1.1	CAG CCA ACT TAT TTG TTA GCC AG	Foxn1-Lokus
# 330	Foxn1.4	CTT CTG TGT GTA ACC TTG GAG	Foxn1-Lokus
# 331	betaG1	GAG GTC ATC AGT ATA TGA AAC AG	Foxn1-Lokus
# 334	HIF1_fwd3	TGA GCT TGC TCA TCA GTT GC	Hif1-mRNA
# 335	HIF1_rev3	CCC CAT GTA TTT GTT CAC GTT	Hif1-mRNA
# 338	VHL_fwd3	CCC ATG ATG GAC TTC TGG TT	Vhl-mRNA
# 339	VHL_rev3	TGG CTC AGT CGC TGT ATG TC	Vhl-mRNA
# 378	Fx E8 fw	GAT GGA GAC CTT GGG ACT GA	Foxn1-mRNA
# 379	Fx E9 rv	CTG CCT CAT TGC CTG TTT CT	Foxn1-mRNA
# 385	HIF1a_fwd9	TTG GAA ATG TTA AAT AAA AGC TTG G	Hif1α-Lokus
# 386	HIF1a_rev8	TTG CAT TTC CCT GTT TAC TGT AT	Hif1α-Lokus
# 426	P1	CAG GCA GTA TGC CTG GCT AAT TCC AGT T	Hif2α-Lokus
# 427	P2	CTT CTT CCA TCA TCT GGG ATC TGG GAC T	Hif2α-Lokus
# 428	P3	GCT AAC ACT GTA CTG TCT GAA AGA GTA GC	Hif2α-Lokus
# 430	Vhl-F1n1	GTG TGT GCG CAA ACT GCA TG	Vhl-Lokus
# 432	Vhl-F2n1	TTG GTG ATG ACA ACT TGG AGG	Vhl Lokus
# 435	Vhl-R1n2	GAG CGG CTT CAC TTG TTT TTC	Vhl-Lokus
# 436	nest385a	GAA ATG TTA AAT AAA AGC TTG GAC	Hif1α-Lokus
# 437	nest386a	CCC TGT TTA CTG TAT AAA GAT TAG	Hif1α-Lokus
# 438	nest200a	GCA CTA GTT GAT CTT TCC G	Hif1α-Lokus
# 490	EPAS1 Sense	CCA GCA CTG CTT CAG TAC CA	Hif2-mRNA
# 491	EPAS1 Antis.	GTG TCT TGG AAG GCT TGC TC	Hif2-mRNA

**Tabelle 9** Liste der verwendeten Maus-spezifischen real-time PCR TaqMan-Assays

Symbol	Gen	Exon	Assay ID
Hprt	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	6.-7.	Mm00446968_m1
Vhl	von Hippel-Lindau	1.-2.	Mm00494136_m1
Hif1α	hypoxia inducible factor 1, α subunit	13.-14.	Mm00468878_m1
Hif2α	endothelial PAS domain protein 1	6.-7.	Mm01236112_m1

Glut1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transp.), member 1	8.-9.	Mm00441480_m1
Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	5.-6.	Mm00435617_m1
Ldha	lactate dehydrogenase A	6.-7.	Mm01612132_g1
Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	2.-3.; 3.-4.	Mm00554300_m1
Vegf	vascular endothelial growth factor A	2.-3.	Mm01281447_m1
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	4.-5.	Mm01275600_g1
Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	2.-3.	Mm00512504_g1

### 5.1.6 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 10** Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
10x PBS	Ambion, Life technologies, Darmstadt
Aceton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose Nusieve	Lonza, Basel, CH
Agarose Ultrapure	Invitrogen, Darmstadt
Ampuwa	Braun, Ecotainer, Melsungen
Collagenase	Roche Diagnostics, Mannheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diastase ( $\alpha$ -Amylase)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dispase	Gibco, Life technologies, Darmstadt
DMEM, high glucose, GlutMAX™ supplement, pyruvate	Gibco, Life technologies, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dnase	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	Promega, Mannheim
D-PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}$ , w/o $\text{Mg}^{2+}$ )	Invitrogen, Darmstadt
D-PBS CTS™	Invitrogen, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eindeckmedium CitraMount™	Polysciences, Warrington, PA, USA
Eindeckmedium Vectashield®HardSet® mit DAPI	Vector Laboratories,
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Invitrogen, Darmstadt
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gel Loading Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GoTaq®Hot Start Polymerase	Promega, Mannheim
Größenstandard N3026: $\phi$ X174 DNAHaeIII Digest	NEB, Frankfurt am Main

IMDM Medium	Gibco, Life technologies, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Promega, Mannheim
Mercapthoethanol	BioRad, Münschen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	CabioChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PCR-Puffer	Promega, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Percoll™	GE Healthcare, SE
PI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Gibco, Life technologies, Darmstadt
Tissue-Tek®O.C.T.™ Compound, Sakura®	Finetek, Alphen aan de Rijn, NL
Tris Ultra Pure	Invitrogen, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TrypLE™Express	Gibco, Life technologies, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe
Z-Pak™ Balanced Electrolyte Solution	Beckman Coulter, Krefeld

### 5.1.7 EDV-Programme

Die Auswertung der aus der Durchflusszytometrie hervor gegangenen Messdaten erfolgte mit Hilfe der FACS DIVA (BD Biosciences)- und der Flow Jo 9.5.1 (Miltenyi Biotec)-Software. Zur Auswertung der Daten aus der RT-qPCR wurde StepOnePlus (Applied Biosystems) verwendet. Alle statistischen Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 und GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) ermittelt. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde die BZ Analyzer Software (Keyence) genutzt. Primer wurden mit Hilfe von Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entworfen.

## 5.2 Mäuse

### 5.2.1 Allgemeines

Um die Funktion des Hypoxie-Signalweges im Thymusepithel zu untersuchen, wurden Mausmutanten gezüchtet, bei denen die zentralen Gene des Hypoxie-Signalweges spezifisch im Thymusepithel ausgeschaltet (*Vhl*, *Hif1α*, *Hif2α*) oder überexprimiert (*Hif1α*, *Hif2α*) wurden. Dies wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems erreicht. Die Ermittlung des genetischen Status der Tiere erfolgte mit Hilfe von Genotypisierungs-PCRs an der genomischen DNA (gDNA) aus Schwanzspitzen drei Wochen alter Mäuse (PCR-Protokolle siehe Anhang). Der Nachweis der spezifischen *Foxn1-Cre*-vermittelten Rekombination wurde an sortierten Thymusepithelzellen ebenfalls mittels PCR durchgeführt. (PCR-Protokolle siehe Anhang). Die für die PCRs verwendeten Primer stammten aus Publikationen oder wurden spezifisch für die transgenen Sequenzen entworfen. Im letzteren Fall wurden die Amplifikate mittels Sangersequenzierung verifiziert.

### 5.2.2 Mausstämme

**C57BL/6** (The Harlan Laboratories, C57BL/6JOlaHsd)

Der Inzuchtstamm C57BL/6 war Ausgangsstamm für alle in dieser Arbeit gezüchteten und analysierten Mäuse. Die Mäuse stammen von The Harlan Laboratories und wurden aus dem zentralen Tierlabor (ZTL) des Uniklinikum Essens bezogen.

**Foxn1-Cre** (The Jackson Laboratory #018448)

Der Transkriptionsfaktor Foxn1 gilt als Masterregulator für die Generierung und Entwicklung von Thymusepithelzellen (TECs) und wird vom embryonalen Stadium E11,5 in TECs exprimiert. Inaktivierende *Foxn1*-Mutationen in Mäusen lassen die Thymusanlage verkümmern und führen zu einem athymischen Phänotyp. In den hier aufgeführten Foxn1-Cre-Mäusen liegt die Cre-Kassette innerhalb der 3'UTR von Exon 9 des *Foxn1*-Gens. Die *Foxn1-Cre*-vermittelte Rekombination von geflochten Genen findet spezifisch in Thymusepithelzellen und Keratinozyten-Subpopulationen der Haut statt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Foxn1-Cre-Mäuse stammen von Nancy Manley (University of Georgia, USA) und wurden von The Jackson Laboratory (#018448) bezogen. Die Primer #329, #330 und #331 (Tab. 8) zur Genotypisierung der Mäuse wurden von Ralph Waldschütz (Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen) etabliert und ermöglichen die Amplifikation des WT- und des Foxn1-Cre-Produktes in einer Multiplex-PCR (siehe Anhang).

**Vhl<sup>loxP</sup>** (The Jackson Laboratory #012933)

Zur Generierung eines konditionalen *Vhl*-Allels wurden in *Vhl<sup>loxP</sup>*-Mäusen Promotor und Exon1 des *Vhl*-Gens von loxP-Sequenzen flankiert. Mäuse, die homozygot sind für das loxP-flankierte *Vhl*-Allel sind unauffällig. Eine Cre-vermittelte Rekombination führt in Cre-exprimierenden Zellen zur Deletion des Promotors sowie von Exon 1 und damit zur Inaktivierung des Gens.

Die hier eingesetzten *Vhl<sup>loxP</sup>*-Mäuse stammen von Dr. Rudolph Jaenisch (Whitehead Institute (MIT)) und wurden uns von Ekkehard Lausch (UK Mainz, aktuell UK Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden über 10 Generationen in den C57BL/6 Hintergrund gekreuzt. Zur Ermittlung des WT, des geflochten und des deletierten *Vhl*-Allels wurden die Primer #74, #75 und #76 verwendet (siehe Tab. 8 und Anhang).

**Hif1 $\alpha$ <sup>loxP</sup>** (The Jackson Laboratory #007561)

In *Hif1 $\alpha$ <sup>loxP</sup>*-Mäusen ist das Exon 2 des *Hif1 $\alpha$* -Genes mit loxP-Sequenzen flankiert. Mäuse, die homozygot sind für das loxP-flankierte *Hif1 $\alpha$* -Allel sind unauffällig. In Cre-exprimierenden Zellen führt die Rekombination des geflochten Allels zur Inaktivierung von *Hif1 $\alpha$* .

Die Mäuse stammen von Randall Johnson (UC-San Diego) und wurden von The Jackson Laboratory (#007561) bezogen. Der Nachweis des *Hif1 $\alpha$* -Genotyps (WT, gefloxt und deletiert) erfolgte in einer Multiplex-PCR unter Einsatz der von der Arbeitsgruppe entworfenen Primer #200, #385 und #386 (siehe Tab. 8 und Anhang).

**Hif2 $\alpha$ <sup>loxP</sup>** (*Epas1<sup>loxP</sup>*) (The Jackson Laboratory #008407)

Zur Generierung eines konditionalen *Hif2 $\alpha$* -Allels wurde in *Hif2 $\alpha$ <sup>loxP</sup>*-Mäusen das Exon 2 des endothelialen PAS-Domänen-Protein-1-Lokus (*Epas1* oder *Hif2 $\alpha$* ) von loxP-Seiten flankiert. Homozygote Mäuse sind lebensfähig und unauffällig. Eine Cre-vermittelte Rekombination verursacht die Gewebe-spezifische Inaktivierung des *Hif2 $\alpha$* -Allels.

Die hier analysierten *Hif2 $\alpha$ <sup>loxP</sup>*-Mäuse stammen von Celeste Simon (University of Pennsylvania) und wurden von The Jackson Laboratory (#008407) bezogen. In der Multiplex-PCR zur Bestimmung des Genotyps amplifizieren die Primer #426, #427 und #428 das WT, das geflochte sowie das deletierte *Hif2 $\alpha$* -Allel (siehe Tab. 8 und Anhang).

**HIF1dPA** (The Jackson Laboratory #009673)

**HIF2dPA** (The Jackson Laboratory #009674)

pVHL wird im Hypoxie-Signalweg eine bedeutende Rolle als negativer Regulator von HIF zugewiesen da es hydroxylierte Prolinreste von HIF-Proteinen erkennt, ubiquitinyliert und diese zum proteasomalen Abbau führt. Kaelin et al. konnten zeigen, dass eine bestimmte Modifikation von HIF-Proteinen die Erkennung und Markierung durch VHL verhindert und damit zur Stabilisierung von HIF-Proteinen führt. Die Arbeitsgruppe von Kaelin ersetzte in HIF $\alpha$ -cDNA die Sequenz für Prolinreste durch jene für Alaninreste (HIF1dPA, HIF2dPA) und markierte sie durch Hämagglutinin (HA). Über homologe Rekombination wurde die veränderte HA-markierte cDNA in den Maus ROSA26-Lokus inseriert und eine konstitutive *HIF*-Expression verursacht. Zum Ziel einer Cre-Rekombinase-vermittelten zellspezifischen Überexpression der *HIF2*-Genvariante wurde vor dem 5'-Ende der cDNA eine loxP-STOP-loxP Kasette vorgeschaltet. Damit führte ausschließlich die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des STOP-Elementes zu einer Gewebe-spezifischen Expression einer *HIF*-Variante, deren Proteinprodukt einer pVHL vermittelten Degradation nicht mehr zugeführt werden kann.

Die HIFdPA-Mäuse dieser Arbeit stammen von William G. Kaelin (Dana Faber Cancer Institute) und wurden von The Jackson Laboratory (HIF1dPA #009673; HIF2dPA #009674) bezogen. Der Nachweis des modifizierten *Hif $\alpha$* -Genotyps erfolgte über eine Multiplex-PCR (siehe Anhang) mit den Primern #12, #13 und #14 (siehe Tab. 8) und erlaubte die Diskriminierung von WT- und des transgenen Allels.

**Nude NMRI Mäuse** (The Harlan Laboratories, HsdCpb:NMRI-*Foxn1*<sup>nu</sup>)

Die in dieser Arbeit analysierten *Nude* Mäuse stammen von The Harlan Laboratories und wurden vom ZTL des Universitätsklinikums Essen bezogen.

### 5.2.3 Haltung und Zucht der Mäuse, Organentnahme

Die Mäuse wurden im ZTL des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und unter kontrollierten Umweltbedingungen (22 $\pm$ 2°C Temperatur, 55 $\pm$ 5% Luftfeuchtigkeit, 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus) in Makrolon-Filterkäfigen gehalten. Jungtiere wurden im Alter von 3 Wochen durch PCR-Analyse der Schwanzspitzen-DNA genotypisiert und mit einer individuellen Ohrlochung markiert. Im Alter von 21 Tagen wurden die Tiere entwöhnt und nach Geschlechtern getrennt.

Zur Analyse wurden die Mäuse per Genickbruch oder mit Kohlenstoffdioxid getötet. Thorax und Bauchraum wurden geöffnet, Thymus und Milz entfernt und in PBS/ 2% FKS gegeben. Zum Zwecke der Nachgenotypisierung wurde ein Stück der Niere bei -20°C gelagert.

## **5.3 Zellbiologische Methoden**

### **5.3.1 Methoden der Zellkultur**

#### **5.3.1.1 Einfrieren/ Auftauen von Zellen**

Zur Kryokonservierung der Thymusepithelzelllinien ANV (Nelson et al., 1998) und TE-71 (Farr et al., 1989) wurden durch Zentrifugation (5 Minuten 1800 rpm, Rotanta 460R, Firma Hettich) pelletierte Zellen in einer Konzentration von bis zu  $5 \times 10^7$  Zellen pro ml Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) resuspendiert und in 1,5 ml Einfriereröhrchen aliquotiert. Zum konstanten, aber schonenden Herunterkühlen der Ampullen (1°C/ Minute) bis zu -80°C wurden mit Isopropanol gefüllte Einfrierhilfen (Nalgene® Mr. Frosty) verwendet. Für die Langzeitlagerung erfolgte am nächsten Tag der Transfer in flüssigen Stickstoff.

Das Auftauen der Zellen in den Kryovials erfolgte unter steter Bewegung in fließend heißem Leitungswasser, so lange bis noch Eis zu sehen war. Dann wurde die Zellsuspension sofort in kaltes Medium gegeben und die Zellen durch Abzentrifugieren (5 Minuten 1800 rpm) vom DMSO befreit.

#### **5.3.1.2 Subkultivierung von Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien (ANV und TE-71) wurden in Zellkulturflaschen mit 75cm<sup>2</sup> Kulturfläche gehalten und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte zwei Mal wöchentlich während der logarithmischen Wachstumsphase bei erreichter 95- bis 100 %-iger Konfluenz. Dazu wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin-Lösung (GIBCO TripLE™ Select) benetzt, wieder befreit und für 5 bis 10 Minuten, bis zum Eintreten einer Einzelzellsuspension, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die aus dem Monolayer gelösten Zellen mit frischem Wachstumsmedium (DMEM mit GlutaMax™, 10% FKS, 1% Penicillin-Streptomycin für ANV-Zellen und IMDM, 15% FKS, 1% Penicillin-Streptomycin für TE-71-Zellen) resuspendiert und 1:10 bzw. 1:20 in eine neue Zellkulturflasche verdünnt. Falls erforderlich wurde das Ablösen von TE-71-Zellen durch behutsames Abschieben mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner bio-one) unterstützt.

#### **5.3.1.3 Lebendzellzahlermittlung mittels Trypanblau**

Die Membran toter Zellen ist durchlässig für den Azofarbstoff Trypanblau, der sich an Zellproteine anlagert und die Zelle somit blau färbt. Die Membran intakter Zellen hingegen

kann der Farbstoff aufgrund seiner Größe nicht passieren. Diese Zellen erscheinen leuchtend hell im Mikroskop.

Die zu analysierende Zellsuspension wurde mit Trypanblau vermischt und anschließend in eine Neubauer-Kammer gefüllt. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch Auszählung der ungefärbten Zellen unter einem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Bei einem Kammervolumen von 0,1 µl ergab sich die Gesamtzahl lebender Zellen pro ml aus der Berechnung  $Z \times V \times 10^4$  (Z= Mittelwert der gezählten Zellen aus vier großen Quadraten, V= Verdünnungsfaktor).

#### **5.3.1.4 Inkubation unter hypoxischen Bedingungen**

Zur Inkubation unter reduzierten Sauerstoffbedingungen wurden die Zellen direkt nach der Aussaat in Zellkulturflaschen oder 6- oder 12-Loch-Platten im Hypoxie-Brutschrank (Firma Binder) der Arbeitsgruppe Dr. Hannes Klump des Instituts für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Essen für 18 Stunden inkubiert. In den Inkubator wurde kontrolliert Stickstoff eingeleitet, so dass reduzierte Sauerstoffbedingungen entstanden (5% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub>, 37°C).

#### **5.3.1.5 Erstellen von Wachstumskurven**

Die Erstellung der Wachstumskurven erfolgte in 12-Lochplatten in Triplets über einen Zeitraum von 96 Stunden. Dafür wurden  $2 \times 10^5$  ANV-Zellen bzw.  $1 \times 10^5$  TE-71-Zellen jeweils in einem ml Medium pro Loch ausgesät. Die Ermittlung der Zellzahlen von jeweils 3 Löchern erfolgte nach 16, 43, 65 und 89 Stunden.

### **5.3.2 Präparation von Einzelzellsuspensionen von Thymus und Milz**

Nach der Organentnahme wurden Thymus und Milz von Fett- und Bindegewebe befreit und in Gewebekulturschalen mit 2 ml bzw. 4 ml eiskaltem PBS/ 2% FKS gegeben. Die Organe wurden zwischen den befeuchteten angerauten Flächen zweier Objektträger in eine Einzelzellsuspension überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 100 µl (Thymus) bzw. 40 µl Nylon-Zellsieb (Lymphknoten, Milz) gegeben. Die Zellzahlermittlung erfolgte am Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer der Firma Beckman Coulter.

### **5.3.3 Isolation und Anreicherung von Thymusepithelzellen**

#### **5.3.3.1 Enzymatischer Gewebeverdau**

Der Thymus wurde aus dem oberen Brustraum entnommen, einmal mit Hilfe einer Schere zerteilt und in 500 µl auf 37°C vorgewärmtes RPMI-Medium mit 2% FKS gegeben. Um die

Thymusepithelzellen aus dem Stroma herauszulösen, wurde das Medium mit Kollagenase (1,2 mg/ml), Dispase (1,25 mg/ml) und DNase (1,5 mg/ml) angereichert. Der Verdau wurde nun in mehreren Runden über jeweils 20 Minuten bei 37°C und 900 rpm schüttelnd (Eppendorf Thermomixer comfort) durchgeführt, so oft, bis kein unverdautes Gewebe mehr zu erkennen war (Klein et al., 2000). Dabei wurde nach der Hälfte der jeweiligen Verdauzeit die Dissoziation des Gewebes durch Auf- und Abpipettieren mit Hilfe einer 1000 µl-Pipette unterstützt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Überstände abgenommen, gesammelt und auf Eis gehalten. Anschließend wurden pro ml verdaute Gewebelösung 20 µl 0,5M EDTA hinzugegeben und für max. 5 Minuten bei 37°C rüttelnd inkubiert. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wurde durch einen 100 µm Zellsieb gegeben und durch Zugabe von 50 ml PBS und anschließendes Zentrifugieren (5 Minuten, 1800 rpm, 4°C) einmal gewaschen.

#### **5.3.3.2 Anreicherung der TECs durch Percoll-Gradienten-Zentrifugation**

Das in PBS gewaschene Zellpellet wurde zunächst in 4 ml dichtem (1,115 g/ml) Percoll resuspendiert. In der Zwischenzeit war ein mit 2 ml FKS gefülltes 15 ml-Falcon-Röhrchen durch Rollen komplett an der Innenseite mit dem FKS benetzt worden. Das Serum wurde nun verworfen und die Percoll-Zellsuspension hinein pipettiert. Das Röhrchen wurde im Winkel von 45° gehalten und zuerst mit 2 ml weniger dichtem (1,065 g/ml) Percoll und abschließend mit 2 ml PBS vorsichtig überschichtet. Nach der Dichtegradienten-Zentrifugation (30 Minuten, 3030 rpm ohne Bremse, 4°C (Beckman Coulter Allegra® X-15R)) wurde die obere Percoll-Zellfraktion (OPF) mit Hilfe einer 1000er Pipette entnommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, einmal in PBS gewaschen und anschließend in 500 µl PBS aufgenommen (Danzl et al., 2010; Klein et al., 2000). Die absolute Zellzahl der OPF, die neben den Thymusepithelzellen auch andere Thymusstromazellen wie Dendritische Zellen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen enthält, wurde mit Hilfe der Trypanblaufärbung in der Neubauer-Kammer ermittelt. Zur Bestimmung der Oberflächenmarker wurden die so gewonnenen Zellen gefärbt (siehe 5.3.4.3) und durchflusszytometrisch analysiert.

#### **5.3.4 Durchflusszytometrie**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen aufgrund ihrer morphologischen, molekularen und physikalischen Eigenschaften quantitativ und qualitativ erfassen. Bei dieser Methode werden die zu analysierenden Zellen in einem Durchflusszytometer durch hydrodynamische Fokussierung in einen Einzelstrahl geführt und durch den Messbereich eines fokussierten Laserstrahls vorbeigeführt. Jede Zelle verursacht dabei Streulicht, das von Photoelektronenvervielfachern (*photomultiplier tube*; PMT) aufgenommen und verstärkt

wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC) macht dabei eine Aussage über die Zellgröße, das seitliche Streulicht (*sidewards scatter*; SSC) über die Granularität. Werden Zellen, die an Farbstoffe oder Fluorochrom-konjugierte Antikörper (direkt oder indirekt) gebunden sind, an einem Laserstrahl vorbeigeführt, können die Farbstoffe Photonen absorbieren und dabei in einen angeregten Zustand übergehen. Bei Rückkehr in den Grundenergiezustand wird Energie frei, die sich als Emission von länger welligem Licht (Fluoreszenzlicht) zeigt. Über optische Filter und Spiegel wird das emittierte Licht aufgeteilt und ebenfalls von entsprechenden PMTs detektiert und verstärkt. Je nach Wahl des Antikörpers oder des Farbstoffes kann damit eine Aussage über die Expression von Oberflächen-Markern, intrazellulären Molekülen, dem DNA-Gehalt oder auch dem Lebend-Tod-Zustand der Zelle gemacht werden.

Zur Auftrennung der Fluoreszenzsignale auf verschiedene Detektoren werden unterschiedliche optische Filter verwendet: *Long pass*, *short pass* oder *band pass filter*. Sie unterscheiden sich in ihren Eigenschaften, Photonen durchzulassen, aufzunehmen oder zu reflektieren. *Long pass filter* lassen langwelliges Licht ab einer definierten Wellenlänge passieren und reflektieren kurzwelligeres. *Short pass filter* lassen kurzwelliges Licht kleiner einer definierten Wellenlänge durch und reflektieren dagegen langwelligeres. *Band pass filter* stellen eine Kombination aus Lang- und Kurzpass-Filtern dar und sind nur für ein schmales Spektrum von Licht durchlässig. Dieses wird durch eine definierte zentrale Wellenlänge und eine definierte Bandbreite der Durchlässigkeit angezeigt (z.Bsp. BP 500/50).

Je nach Ausstattung des Durchflusszytometers (Art und Anzahl der Laser, Filter und Spiegel) können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig in der Analyse verwendet werden. Da sich die Emissionsspektren der Fluorochrome und auch der Filterspektren überlagern können, müssen diese Impulse rechnerisch ermittelt und für eine korrekte Interpretation der Daten korrigiert werden. Dieser als Kompensation bezeichnete Vorgang wird mittlerweile standardmäßig per Computer geregelt.

Die durch das schnelle Passieren der Zelle am Laserstrahl verursachte Streuung des Lichtes bzw. Emission des Fluoreszenzlichtes ist von äußerst kurzer Dauer und wird vom Detektor in ein elektrisches Signal (Impuls) verwandelt. Dieses ist proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. Der Impulsprozessor misst die Impulshöhe als maximal digitalisierte Lichtintensität und die Impulsfläche als Flächensummierung von digitalisierten Messungen über einen definierten Zeitraum. Die Impulsweite wird errechnet aus Fläche/Höhe x 64000. Die Daten werden an eine integrierte Software weitergeleitet und in Diagrammen angezeigt: wahlweise in Form von eindimensionalen Histogrammen oder graphischen Darstellungen von Punktwolken (Dotplots).

### 5.3.4.1 Durchflusszytometrische Analysen

In dieser Arbeit wurde das BD LSRII-Durchflusszytometer verwendet. Das Gerät ist mit folgenden Lasern ausgestattet: einem blauen Argonionenlaser (488 nm), einem roten Helium-Neon-Laser (633 nm) und einem violetten Laser (405 nm). Der blaue Laser erzeugt FSC und SSC sowie regt die in dieser Arbeit eingesetzten Fluorophore FITC, AlexaFluor 488, PE, PerCP-Cy5.5, PI und PE-Cy7 an. Der rote Laser regt APC, AlexaFluor 647, APC-Cy7, APC-eFluor780 und APC-Alexa Fluor 750 und der violette Laser DAPI, Pacific Blue, eFluor 450, F2N12S (green) und PI (violet) an.

### 5.3.4.2 Durchflusszytometrische Sortierungen

Eine besondere Form der Durchflusszytometrie ist die Zellsortierung (FACS, *fluorescent activated cell sorter*). Mit ihrer Hilfe lassen sich ganze Zellpopulationen ähnlich der Durchflusszytometrie in ungetrenntem Zustand analysieren und zusätzlich die gewünschten Zellen daraus isolieren. Damit finden Zellerkennung und –separation gleichzeitig statt. FACS-Geräte besitzen vier wesentliche Funktionen. In der Vibrationskammer werden Zellen in feinste Tröpfchen vereinzelt, gemessen und statistisch ausgewertet. In einer Messeinheit wird mit Hilfe eines blauen Lasers (488 nm) über die Vorwärtsstreuung die Größe und über die Seitwärtsstreuung die Granularität der Partikel bestimmt. Über die Darstellung der verschiedenen Oberflächenmarker mittels Fluorochrom-konjugierter Antikörper können unterschiedliche Zellpopulationen erkannt und isoliert werden. In der Sammeleinheit erhalten die, die Zellen enthaltenden, Tröpfchen nach den Sortierkriterien durch Ladung Impulse, passieren ein elektrisches Feld und werden in entsprechende Sammelröhrchen abgelenkt. Der Rechner wandelt die gemessenen Werte in erfassbare Daten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellsortierungen wurden am FACS-DIVA (Digital Vantage) durch Klaus Lennartz am Institut für Zellbiologie am Universitätsklinikum Essen oder am FACS Aria II Flow Cytometer (BD) durch Stefanie Weber, MTLA unserer Arbeitsgruppe, am Institut für Experimentelle Immunologie und Bildgebung des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Für die Isolierung der DNA aus sortierten Zellen wurden diese in Polypropylenröhrchen in 250 µl RPMI 10% FCS aufgefangen, zentrifugiert und das Zellpellet im Qiagen QIAamp DNA Micro Kit eingesetzt. Für die Isolierung der RNA aus den sortierten Zellen wurden diese in 350 µl RLT-Puffer sortiert. Zur Inhibierung der Ribonukleaseaktivität wurde dann 5 µl Mercapthoethanol hinzu gegeben, mit Hilfe einer 20G-Nadel die DNA geschert und bei -80 °C bis zur RNA-Isolierung zwischen gelagert.

### 5.3.4.3 Oberflächenfärbung

Zum Nachweis der Expression von Oberflächenmarkern wurden standardmäßig  $2 \times 10^6$  Zellen einer Einzelzellsuspension in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Um Fc-Rezeptor-

vermittelte unspezifische Bindungen zu blocken wurden 100 µl αCD16/CD32 (Antikörper gegen Maus-Fc-Rezeptor) (1:400 in PBS 2% FKS) hinzu gegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 100 µl FACS-Puffer (PBS/ 2% FKS/ 0,02% NaN<sub>3</sub>) und anschließendem Zentrifugieren bei 1800 rpm für 5 Minuten (Beckman Coulter Allegra® X-15R) wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet mit 40 µl des Mixes aus fluorochrom-konjugierten Antikörpern von Interesse (Tab. 4) resuspendiert. Die Inkubation betrug 20 Minuten auf Eis im Dunkeln. Um mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Lebend-Tod-Diskriminierung durchzuführen, wurde dem FACS-Puffer direkt vor der Analyse 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) oder Propidiumjodid (PI) zugegeben. Falls der Antikörper-Mix unkonjugierte biotynilierte Antikörper enthielt wurde nach dem ersten Färbe- und Waschschrift eine zweite Färbung mit an Streptavidin gekoppelte Fluorophore angeschlossen (Tab. 5). Streptavidin bindet hoch spezifisch an Biotin. Anschließend erfolgte die Aufnahme im DAPI/PI-FACS-Puffer.

Von allen Fluorochrom-konjugierten und biotynilierten Antikörpern wurde die optimale Arbeitskonzentration per Titration ermittelt. Bei neu im Labor eingeführten Antikörpern wurden zum Ausschluss unspezifischer Bindungen Kontrollansätze mit Isotypen-Antikörpern mitgeführt.

Zur Durchführung einer Kompensation (Ermittlung und Korrektur der durch Überlappung von Impulsen entstandenen Signale, s.o.) wurden jeweils alle im Mix enthaltenen Antikörper sowie DAPI bzw. PI als Einzelfarbe an jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Zellen mit geführt und am LSR II-Gerät eingelesen.

#### **5.3.4.4 Intrazelluläre Färbung**

Um die Durchlässigkeit der Zellmembran für die gegen ein intrazelluläres Zielprotein gerichteten Antikörper zu gewährleisten müssen Zellen zunächst fixiert und anschließend permeabilisiert werden. Die Fixierung wurde mit Paraformaldehyd, die Permeabilisierung mit dem Detergenz Saponin durchgeführt. Saponin entfernt Cholesterin aus der Zellmembran, macht sie porös und durchlässig für den Antikörper.

An 2 x 10<sup>6</sup> Zellen wurde zunächst die Oberflächenfärbung, wie unter 5.3.4.3 beschrieben, durchgeführt. Anschließend erfolgten die Fixierung der Zellen innerhalb von 20 Minuten im Dunkeln in Cytofix/Cytoperm (4% Paraformaldehyd/ 0,1% Saponin) der Firma BD, dann zwei-maliges Waschen und Permeabilisieren mit BD Perm/Wash (PBS/ 3% FKS/ 0,1% Saponin) und die 20-minütige Inkubation im mit dem gegen das intrazelluläre Zielprotein gerichteten Antikörper (verdünnt in Perm/Wash). Nach erneutem Waschen in Perm/Wash wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und am LSR II-Gerät analysiert.

### 5.3.4.5 AnnexinV-Apoptose-Assay

Die Apoptose ist eine Form des von einer Zelle intrinsisch durchgeführten programmierten Zelltods. Zellen, die sich in Apoptose befinden durchlaufen verschiedene charakteristische morphologische Veränderungen. Diese beinhalten das Zellschrumpfen, die Aggregation des Chromatins und die Fragmentierung der DNA. Die Zelloberfläche stülpt sich aus, wird abgeschnürt (apoptotic bodies) und kann, bevor sich deren Inhalt in die Umgebung ausschüttet, von Makrophagen phagozytiert werden.

Bereits in der frühen Phase der Apoptose finden Membranveränderungen statt, wie die Umlagerung des Membranphospholipids Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Zellmembran zur Außenseite. AnnexinV kann zur Detektion Apoptose-initiiertes Zellen eingesetzt werden, da es  $\text{Ca}_2^+$ -abhängig hochaffin an extrazellulär exponiertes PS bindet. Fortschreitende Apoptose bis hin zum Zelltod gehen einher mit weiterem Verlust der Membranintegrität. Damit ist auch das intrazellulär liegende PS verstärkt für AnnexinV zugänglich. Zur weiteren Differenzierung von früh und spät apoptotischen bzw. toten Zellen wird daher ein Indikator für tote Zellen (DAPI, TO-PRO®-3 Iodid (TO-PRO), PI) eingesetzt. Die Zellmembranen von lebenden Zellen sind undurchlässig für diese Farbstoffe, die der toten und geschädigten Zellen jedoch durchlässig. In dieser Arbeit wurde TO-PRO®-3 Iodid der Firma life technologies (Anregung/Emission 642/661 nm) eingesetzt. Lebende Zellen sind AnnexinV und TO-PRO negativ, frühe apoptotische Zellen AnnexinV-positiv und TO-PRO-negativ und späte apoptotische und tote Zellen sind positiv für beide.

Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und in 50  $\mu\text{l}$  AnnexinV-Bindungspuffer aufgefangen. Anschließend erfolgte pro Ansatz die Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  AnnexinV-Bindungspuffer, dem 4  $\mu\text{l}$  AnnexinV-FITC und 0,4  $\mu\text{l}$  10 $\mu\text{M}$  TO-PRO zugegeben worden war. Nach der 10-15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln erfolgte unmittelbar die durchflusszytometrische Analyse.

### 5.3.4.6 Zellzyklus-Assay

Die wesentlichste Funktion des Zellzyklus ist die Verdopplung der DNA der Chromosomen und die anschließende Verteilung der Kopien in zwei genetisch identische Tochterzellen. Demzufolge können die Zellen des Zellzyklus in drei verschiedene Populationen bezüglich ihres DNA-Gehaltes eingeteilt werden. G0/1-Phase-Zellen besitzen eine nicht replizierte DNA-Menge, G2/M-Zellen die vollständig verdoppelte DNA-Menge (zweifach des G1-Gehalts) und S-Phase-Zellen einen intermediären DNA-Gehalt.

Wird Zellen über ein kurzes Zeitfenster (30 bis 45 Minuten) in der Wachstumsphase das Thymidinanalogue Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) angeboten so wird dieses in neu synthetisierte DNA der sich in der S-Phase des Zellzyklus befindenden Zellen

eingebaut. Die Menge des inkorporierten BrdU kann anschließend durch spezifische fluoreszierende Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt werden. Bei gleichzeitiger Färbung der DNA mit einem DNA-Farbstoff, wie 7-amino-actinomycin D (7-AAD) können Zellen in ihren verschiedenen Zellzyklusphasen dargestellt werden (G0/1, S oder G2/M-Phase).

Zur Darstellung der Zellzyklusphasen von unter hypoxischen Bedingungen inkubierten Thymusepithelzellen TE-71 wurde in dieser Arbeit das APC BrdU Flow-Kit der Firma BD Pharmingen verwendet. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit 10 µl 1 mM BrdU in PBS pro ml Zellkultur versehen und anschließend nach Herstellerprotokoll weiter bearbeitet. Dieses beinhaltete die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, die intrazelluläre Färbung mit APC-konjugiertem anti-BrdU und die Färbung der DNA mit dem DNA-Farbstoff 7-AAD. Anschließend erfolgte die Analyse am LSR II.

### **5.3.5 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten**

#### **5.3.5.1 Gewebe-Einbettung und Schnitte**

Zur Herstellung histologischer Präparate wurde das Gewebe in Sakura Tissue-Tek O.C.T. Compound, das wasserlösliche Glykole und gefrierschützende Harze enthält, eingebettet und in speziell vorbereiteten Alu-Schälchen über der flüssigen Atmosphäre von Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Mit Hilfe eines kühlbaren Kryomikrotoms (Leica CM1850 UV) wurden später 7 µm dünne Gefrierschnitte hergestellt und auf SuperFrost®Plus-Objektträger (Langenbrinck) gezogen. Die Lagerung der Kryoschnitte erfolgte ebenfalls bei -80°C.

#### **5.3.5.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung**

Um die verschiedenen Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild darzustellen, wurde als Übersichtsfärbung die Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung gewählt. Die Färbung basiert auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption. Hämatoxylin ist bei niedrigem pH-Wert positiv geladen und bindet an negativ geladene, basophile Strukturen wie z.Bsp. DNA und RNA des endoplasmatischen Retikulums, so dass diese blau erscheinen. Eosin ist negativ geladen und färbt positiv geladene, azidophile Strukturen wie Zytoplasma-Proteine und Mitochondrien in verschiedenen Nuancen rot. Zunächst wird mit Hämatoxylin bis zum gewünschten Färbegrad gefärbt (progressive Färbung). Anschließend erfolgen die Überfärbung mit Eosin und die Differenzierung in Ethanol (regressive Färbung).

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte mindestens 30 Minuten bei RT getrocknet und anschließend mit Hilfe des Fast Frozen Stain-Kit (Polysciences) laut Herstellerangaben

gefärbt und unter Verwendung des mit geliefertem CitraMount™-Eindeckmediums eingedeckelt.

#### **5.3.5.3 Perjodsäure-Schiff'sche (PAS)-Reaktion**

Die Perjodsäure-Schiff'sche-Reaktion wird zum Nachweis von Mucopolysacchariden (Glycogen, Stärke, Protein-Kohlenhydrat-Komplexe) in Gewebeschnitten durchgeführt. Perjodsäure ist ein starkes Oxidationsmittel und oxidiert Glykole zu Aldehyden. Diese Aldehydgruppen werden durch das Schiff'sche Reagenz (Fuchsin-schwefelige Säure) in eine rosa bis magentarote, unlösliche Verbindung überführt. Bindegewebsfasern, Basalmembranen und Zellwände erscheinen in dieser Färbung purpurrot, Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau.

Für die PAS-Reaktion wurden die Schnitte mindestens 30 Minuten bei RT getrocknet, fixiert und anschließend mit Hilfe des PAS-stain-Kit (Sigma-Aldrich) laut Herstellerangaben gefärbt und mit CitraMount™-Eindeckmedium eingedeckelt.

Zum Nachweis von Glykogen in PAS-positiven Schnitten wurde ein sukzessiver Kryoschnitt nach der Fixierung für 30 Minuten in einer 0,5%-igen wässrigen Diastase-Lösung ( $\alpha$ -Amylase, Sigma) bei 37°C inkubiert, 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert und anschließend mit Hilfe des PAS-stain-Kits gefärbt. Wenn Glykogen vorhanden war, wurde diese durch Diastase aufgeschlossen und aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit ausgewaschen. Damit war sie in der PAS-Reaktion nicht mehr darstellbar.

#### **5.3.5.4 Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Bei der Immunfluoreszenztechnik werden zur Darstellung zellulärer Proteine Epitop-spezifische Antikörper, die auf das Zielprotein gerichtet sind, verwendet, die durch Kopplung an Fluorophore sichtbar gemacht werden können. Bei der direkten Immunfluoreszenzmethode ist der Fluoreszenzfarbstoff direkt an den Primär-Antikörper, bei der indirekten Methode an einen Sekundär-Antikörper gekoppelt.

Die Gewebeschnitte wurden mindestens 30 Minuten bei RT getrocknet, dann 5 Minuten in Aceton fixiert, komplett getrocknet und mit ImmEdge Pen umrandet. Es wurde einmalig für 3 Minuten mit PBS gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Bindungen und zur Minimierung des Hintergrundes erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit 100  $\mu$ l 10% FKS in PBS. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100  $\mu$ l Fluorophor-konjugiertem Antikörper (Tab. 6) in 1% FKS in PBS für 40 Minuten bei RT im Dunkeln. Nach Ablauf der Zeit wurden ungebundene Antikörper durch Waschen (2 x 3 Minuten in PBS) entfernt. Falls der verwendete Antikörper unkonjugiert war, wurde nach dem ersten Färbe- und Waschschrift eine zweite Färbung mit dem Fluorophor-konjugierten sekundären Antikörper durchgeführt.

Die gefärbten Schnitte wurden mit VECTASHIELD HardSet Mounting Medium, das DAPI enthält, eingedeckelt und lichtgeschützt gelagert. Wegen des möglichen Ausbleichens erfolgten Mikroskopieren und Dokumentation bereits am folgenden Tag.

#### **5.3.5.5 Mikroskopie**

Das Ziel in der Fluoreszenzmikroskopie ist es, Fluorophore mit Licht definierter Wellenlänge anzuregen (Absorptionslicht) und das resultierende länger wellige Fluoreszenzlicht (Emissionslicht) über nur dafür durchlässige Filter einzufangen und detektierbar zu machen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenz- als auch Hellfeldmikroskopischen Untersuchungen und Bilder wurden am BZ-9000 der Firma Keyence im Institut für Immunologie am Uniklinikum Essen (Direktor: Prof. Karl Lang) durchgeführt.

## **5.4 Molekularbiologische Methoden**

### **5.4.1 Isolierung genomischer DNA**

#### **5.4.1.1 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen**

Etwa 0,3 cm Schwanzspitze drei Wochen alter, entwöhnter Mäuse wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Für die DNA-Isolierung wurde jeweils 0,5 ml Lyse-Puffer (0,1M Tris-HCl, 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 20% SDS, 0,2M NaCl und 0,5 mg/ml Proteinase K) hinzu pipettiert und das Gewebe über Nacht bei 55°C und 800 rpm schüttelnd im Eppendorf Thermomixer verdaut. Am nächsten Morgen wurden die unverdauten Reste 15 Minuten bei Raumtemperatur und Maximalgeschwindigkeit pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5417C, 14000 rpm). Anschließend wurde der Überstand in ein neues, steriles Gefäß transferiert. Zur Präzipitation der DNA wurden jeweils 500 µl Isopropanol zum Überstand gegeben und das Gefäß kopfüber bewegt, bis sich die DNA als weißer Niederschlag zeigte, der anschließend pelletiert wurde. Nach ein-minütiger Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit wurde der Überstand verworfen und das Gefäß zur Beseitigung der Restfeuchte kurz auf ein Kleenex-Tuch gestellt. Zur anschließenden Reinigung der DNA wurde jeweils 1000 µl 70 %iger Ethanol hinzu pipettiert und der Überstand ebenfalls nach dem Zentrifugieren verworfen. Zur Beschleunigung des Trockenvorgangs wurden die Eppendorf-Gefäße dann in einem 37°C-warmen Inkubator gehalten und das gewonnene DNA-Pellet in 100 µl sterilem A. dest bei 55°C und schüttelnd bei 800 rpm innerhalb von 30 bis 120 Minuten aufgelöst. Bis zur Durchführung der PCR wurden die Proben bei -20°C gelagert.

#### 5.4.1.2 DNA-Isolierung aus sortierten Thymusepithelzellen

Zur Isolierung von DNA aus sortierten Thymusepithelzellen von Vhl;Hif1 $\alpha$ ;Hif2 $\alpha$ <sup>Foxn1</sup>-Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren wurden 18.000 Zellen im QIAamp DNA Micro Kit der Firma Qiagen eingesetzt und entsprechend den Herstellerangaben verfahren.

#### 5.4.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die selektive Amplifikation von DNA. Dabei dient ein DNA-Abschnitt als Matrize und wird mit Hilfe von DNA-Polymerasen, Primern und dNTPs kopiert und exponentiell innerhalb mehrerer aufeinanderfolgender Zyklen vervielfältigt. Die PCR wird klassischerweise in drei Abschnitte und Temperaturstufen unterteilt. Im ersten Abschnitt findet bei 92 – 98°C die Hitze-Denaturierung der DNA-Doppel-Helix in ihre Einzelstränge statt. Als nächstes wird das Reaktionsgemisch für die Anlagerung der Primer (Annealing) auf ihre optimale Anlagerungs-Temperatur (Annealing-Temperatur) herunter gekühlt (zumeist 50-60°C). Primer sind Oligonukleotide von 20-25 bp Länge, die auch Startermoleküle genannt werden. Sie hybridisieren an der spezifischen Stelle der DNA, von der aus die Synthese des Neustranges in Richtung des Produktes von Interesse starten soll. Im dritten Abschnitt der PCR wird die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der für die Neustrangsynthese benötigten DNA-Polymerase wieder erhöht. Damit wird eine schnelle Verlängerung der Primer (Elongation) sichergestellt. Aus jeder DNA-Matrize, die diesen ersten PCR-Zyklus durchlaufen hat gehen zwei Doppelstränge hervor, die wiederum als Matrizen für den nächsten, gleich ablaufenden Zyklus dienen. In der Regel werden 30-35 Zyklen aufeinander folgend durchgeführt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten PCRs (Protokolle siehe Anhang) dienen der Genotypisierung der zu analysierenden Mäuse und dem Nachweis der von Foxn1-Cre-Rekombinase gesteuerten Gen-Deletionen in FACS-sortierten Thymusepithelzellen der Versuchsmäuse. Alle PCRs wurden mit Puffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs und Taq-Polymerase der Firma Promega durchgeführt. Die verwendeten Primer (Tab. 8) wurden über die Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Die Primer-Informationen stammen aus Publikationen, ansonsten wurden sie in unserer Arbeitsgruppe neu entworfen. Dafür wurden die Gensequenzen mit Hilfe der NCBI-Sequenzdatenbank ermittelt, die entsprechenden Primer mittels Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) konstruiert. Für eine korrekte Interpretation wurden die mit neu entworfenen Primern generierten Amplifikationsprodukte im Agarose-Gel aufgetrennt, aufgereinigt und am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen mit Hilfe der Sanger-Methode sequenziert (siehe 5.4.5).

### 5.4.3 Agarosegel-Elektrophorese

Nukleinsäuren können, aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen am Zucker-Phosphatrückgrat im elektrischen Feld in Richtung Anode aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei sowohl von der Größe der Moleküle als auch von der Porengröße der Agarosegel-Matrix abhängig. Die Detektion der DNA basierte in dieser Arbeit auf der interkalierenden Wirkung des zugesetzten Farbstoffs Ethidiumbromid (EthBr) und dessen Fluoreszenzeigenschaften (Emission bei 590 nm) unter ultravioletter (UV) Bestrahlung (300 nm).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden standardmäßig 1,5 %-ige (w/v) Agarosegele in Tris-Acetat-EDTA- (TAE) Puffer verwendet, die vor der Polymerisation mit EthBr (0,6 µg/ml) versetzt wurden. Wenn eng beieinander liegende Amplifikationsprodukte im Gel und damit eine erschwerte Diskriminierung zu erwarten waren, wurde die Agarose mit einer niedrig schmelzenden Agarose (Nusieve) im Verhältnis 1:3 vermischt und eingesetzt. 10µl des Amplifikationsproduktes aus der PCR wurde mit 4µl Gel Loading Buffer (Sigma) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte innerhalb von 50 Minuten bei konstanter Spannung von 80 Volt bzw. 1 Stunde bei 50 Volt, wenn die niedrig schmelzende Matrix verwendet wurde. Zur Bestimmung der Produktgröße wurde ein Größenstandard (New England Biolabs N3026: φX174 DNAHaeIII Digest) mitgeführt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Auftrennung der DNA am BioDocAnalyzer der Firma Biometra dokumentiert und das entstandene Bild digital gespeichert.

### 5.4.4 DNA-Gelextraktion

Zur Vorbereitung einer Sequenzierung werden PCR-Amplifikationsprodukte zunächst in einem Agarosegel getrennt, die Bande von Interesse per UV-Licht identifiziert und mit einem Skalpell vorsichtig herausgeschnitten. Für ein optimales Sequenzier-Ergebnis müssen störende Faktoren wie Salze, Proteine und Kohlenhydrate entfernt werden. Dies kann standardmäßig mit Hilfe käuflicher Kits erfolgen, deren Methode, ähnlich wie bei der DNA-Isolierung, auf der selektiven Bindung der DNA an Silica-Membranen beruht.

Die Isolierung der zu verifizierenden PCR-Amplifikationsprodukte aus dem Gel wurde mit Hilfe und laut Anweisung des Qiagen QIAquick® Gel Extraction-Kits durchgeführt. Die Elution der aufgereinigten Produkte erfolgte in A. dest.

### 5.4.5 Sanger-Sequenzierung

Um die in der PCR erhaltenen Amplifikationsprodukte korrekt interpretieren zu können, sollten diese bezüglich ihrer Nukleotid-Abfolge untersucht werden. Diese sogenannte DNA-Sequenzierung erfolgte am Genetic sequencer 3130XL der Firma Applied biosystems durch den Sequenzierservice des Instituts für Humangenetik am Universitätsklinikum Essen.

Die dort verwendete Methode beruht auf dem Prinzip des basenspezifischen Kettenabbruchs (Sequenzierung nach Sanger, Didesoxyverfahren). Von der hitzedenaturierten DNA wird mit Hilfe eines Sequenzierungsprimers (passend zur Sequenz von Interesse), dNTPs und einer DNA-Polymerase ein komplementärer Strang synthetisiert. Dabei enthalten die angebotenen Oligonukleotide im Überschuss unterschiedlich Fluoreszenz-markierte 2'-3'-Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Es kommt zu zwei unterschiedlichen Reaktionsereignissen. Bei Einbau der dNTPs kommt es zur Fortsetzung der Synthese. Bei Einbau der ddNTPs ist die Synthese durch die fehlende 3'-Hydroxygruppe terminiert und es kommt zum Abbruch der Reaktion (Kettenabbruch). So entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, deren Enden unterschiedlich Fluorochrom- markiert sind. Diese können mittels Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt, über adäquate Laser angeregt und über ihr Fluoreszenzcharakteristikum von Detektoren erkannt werden.

### 5.4.6 Isolierung von RNA aus Einzelzellsuspensionen

Es wurden das RNeasy<sup>®</sup> Mini-Kit und das RNeasy<sup>®</sup> Micro-Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Die Methode basiert jeweils auf dem Prinzip der selektiven Bindung isolierter RNA an Silicium-Gel-basierte Membranen unter Einsatz der Mikrozentrifugationstechnik.

Biologisches Material wird zunächst in Anwesenheit eines stark denaturierenden Puffers, der Guanidiniumisothioyanat (GITC) und beta-Mercapthoethanol enthält, lysiert und vor Ribonuklease-Aktivität geschützt. Durch die anschließende Zugabe von Ethanol wird die optimale Bindung der isoliert vorliegenden RNA an Silicium-basierte Membranen unterstützt. Kontaminanten werden anschließend in verschiedenen Verdau- (DNase), Wasch- und Zentrifugationsschritten entfernt und die verbleibende RNA mit Hilfe eines Puffers von der Membran eluiert.

Für die Aufreinigung der RNA aus murinen Thymusepithel-Zellkulturen wurden in dieser Arbeit  $1 \times 10^7$  Zellen mittels Zentrifugation (5 Min 1800 rpm) pelletiert und in 700  $\mu$ l, mit beta-Mercapthoethanol angereicherten, RLT-Puffer aufgenommen, geschreddert und für die weitere Isolierungsprozedur bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Für die Isolierung von RNA aus durchflusszytometrisch sortierten Thymusepithelzellen der Versuchsmäuse waren es  $5 \times 10^5$

Zellen und 350 µl des Puffers. Nach dem Auftauen auf Eis wurde entsprechend dem Hersteller-Protokoll der Qiagen Kits vorgegangen. Die Elution wurde jeweils mit 40 µl bzw. 14 µl RNase-freiem Wasser durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung der eluierten RNA durch Messung der Lichtabsorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) am Beckman-Spektral-Photometer. Für weitere Analysen wurde die RNA bei -80°C zwischengelagert.

#### **5.4.7 Reverse Transkription**

Für die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das Advantage<sup>®</sup> RT-for PCR-Kit der Firma Clontech eingesetzt.

RNA und Primer werden anfänglich vermengt und bei 70°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Bei anschließender Inkubation auf Eis wird die Hybridisierung der Primer ermöglicht. Die Erststrangsynthese erfolgt hier unter Einsatz von Oligo(dT)-Primern, die sich charakteristischerweise am Poly-A-Schwanz der messengerRNA (mRNA) anlagern. Damit ist ausschließlich die Transkription der mRNA innerhalb der Gesamt-RNA gewährleistet. Zusätzlich beginnen alle Transkripte am 3'-Ende.

Das Auftauen der Reagenzien und Proben, sowie die Durchführung erfolgten auf Eis. Es wurde standardmäßig 0,2 bis 1µg der Gesamt-RNA in kleine E-cups gegeben. Es wurde entsprechend dem Hersteller-Protokoll gearbeitet. Die Reaktionszeit für die cDNA-Synthese betrug 1 Stunde bei 42°C. Die synthetisierte cDNA wurde abschließend 1:5 mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser verdünnt und bei -80°C gelagert.

#### **5.4.8 Quantitative Echtzeit-PCR (q Real-Time-PCR; qRT-PCR)**

Durch reverse Transkription gewonnene cDNA wurde in der qRT-PCR eingesetzt, um die Genexpression auf mRNA-Ebene zu quantifizieren. Dies erfolgte unter Verwendung der TaqMan-Assays der Firma Applied Biosystems. Anschließend wurde die Expression der mRNA von Interesse zur Expression von „house keeping“-Transkripten in Relation gesetzt und quantifiziert. In dieser Arbeit wurden die Genexpressionsdaten standardmäßig gegen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Hprt) normalisiert.

Das Prinzip des TaqMan-Assays beruht auf der 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase. Zusätzlich zu den Primern werden sequenz-spezifische, zweifach markierte Sonden zur Detektion der Amplifikate eingesetzt. An den 5'-Enden befindet sich jeweils ein Reporterfarbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) und an den 3'-Enden ein Quencher (Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA). Solange die Sonde ungebunden und intakt ist, liegen

Reporter und Quencher nah beieinander und die Fluoreszenz des Reporters wird an den Quencher weiter gegeben (Fluoreszenz-Resonanz-Energie Transfer, FRET); es entsteht kein Fluoreszenzsignal. Hybridisiert dagegen die Sonde mit den Primern an die Zielsequenz, wird die DNA-Polymerase aktiviert. Die Primer werden verlängert und die angelagerte Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut. Der den Reporterfarbstoff enthaltende Teil wird abgespalten. Es kommt zur Trennung von Reporter und Quencher. Damit wird der FRET abgebrochen. Die vom Reporter emittierte Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen und ist direkt proportional zur Zielsequenzmenge. Zur Berechnung der Fluoreszenz ist die passive Referenz ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin) in konstanter Konzentration zugefügt. Der Quotient aus der Reporter- und der ROX-Emissionsintensität wird als normiertes Reporter-Signal ( $R_n$ ) bezeichnet. Im Amplifikationsplot wird dessen Verlauf über die Zeit dargestellt.

Zu jedem TaqMan-Ansatz einer Probe wurde ein Reaktionsansatz ohne cDNA (*no template control*, NTC) mitanalysiert. Alle Analysen wurden in Duplikaten durchgeführt. Dazu wurde jeder TaqMan-Ansatz (TaqMan-Assay Tab. 9, PCR-Protokolle im Anhang) entsprechend den Herstellerangaben in MicroAmp™ 96-Loch-Mikrotiterplatten pipettiert und im Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR-Gerät zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsprotokoll beinhaltete standardmäßig 2 Minuten 50°C, 10 Minuten 95°C, sowie 40 Zyklen mit 15 Sekunden 95°C und 60 Sekunden 60°C. Die Amplifikationsplots (Zyklus versus normiertes Reportersignal) wurden mit Hilfe der StepOne Plus Software dargestellt.

Die relative Quantifizierung der Genexpressionen wurde nach der Delta-Delta- $C_t$ -Methode ( $\Delta\Delta C_t$ ) durchgeführt. Der  $C_t$ -Wert entspricht dem PCR-Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal die Schwelle von Hintergrundfluoreszenz zur Amplifikationsfluoreszenz passiert. Je niedriger dieser Wert ist, desto mehr DNA-Kopien sind in der Ausgangsprobe vorhanden. Die Expression des Zielgens wurde zunächst auf die Expression eines internen Standards (housekeeping gene, Referenzgen) bezogen ( $\Delta C_t$ -Wert). Anschließend wurde der  $\Delta C_t$ -Wert der Probe und der entsprechenden Kontrolle ermittelt. Der Unterschied der Transkriptmengen beider Gruppen ergab sich aus der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## 5.5 Statistische Analysen

Für die Darstellung der Daten dieser Arbeit wurde der arithmetische Mittelwert mit dem Standardfehler (standard error of the mean, SEM) gewählt. Mit Hilfe des zweiseitigen heteroskedatischen studentischen T-Tests wurden die korrespondierenden Signifikanzniveaus berechnet ( $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$ ).

## 6 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, die Funktion des Hypoxie-Signalweges innerhalb von Thymusepithelzellen (TECs) zu untersuchen. TECs sind von zentraler Bedeutung für die Entstehung des Thymus und für die Entwicklung von T-Zellen. Da gezeigt wurde, dass im Thymus Sauerstoff-arme Bedingungen vorherrschen, ist die Arbeitshypothese dieser Arbeit, dass der Hypoxie-Signalweg die Funktion von TECs und damit indirekt die Entwicklung von T-Zellen reguliert.

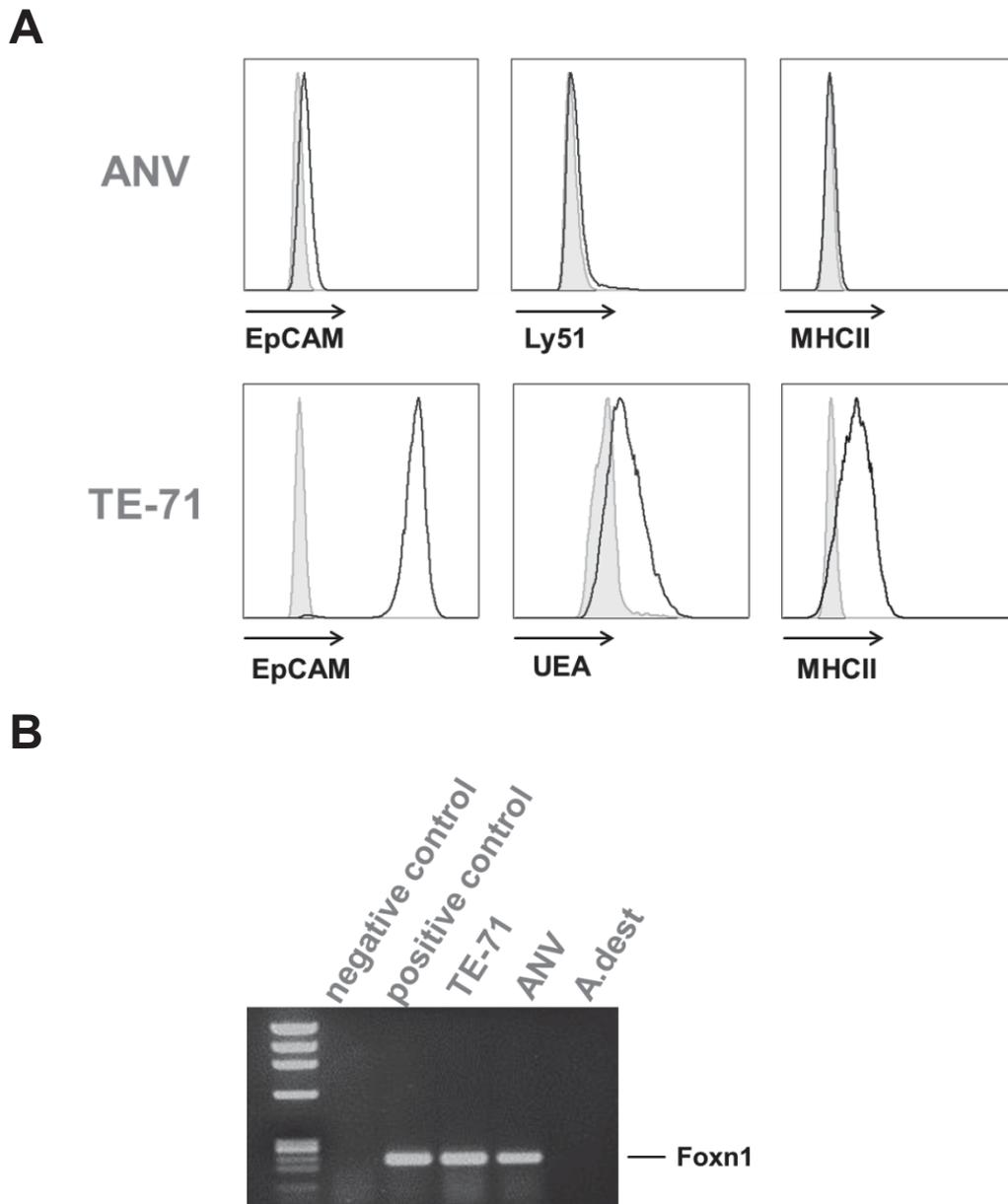
Zunächst wurde der Einfluss von Hypoxie auf Thymusepithelzelllinien *in vitro* untersucht. Hierfür wurden kortikale und medulläre Thymusepithelzelllinien (ANV und TE-71) über einen definierten Zeitraum unter sauerstoffarmen Bedingungen inkubiert und anschließend analysiert. Im Folgenden wurden *in vivo*-Untersuchungen mit Hilfe genetisch modifizierter Mauslinien durchgeführt. Dabei wurden mit Hilfe des Cre-loxP-Systems unter Einsatz des Thymusepithel-spezifischen *Foxn1-Cre* Transgens zentrale Gene des Hypoxie-Signalweges ausgeschaltet oder überexprimiert. Es wurden Mäuse generiert, die einen Einfach-Verlust ( $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}; Hif1\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}; Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ), einen Doppel-Verlust ( $Vhl^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ) oder einen Dreifach-Verlust ( $Vhl^{loxP/loxP};Hif1\alpha^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ) spezifisch im Thymusepithel aufwiesen. Ein weiterer Ansatz, um die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren im Thymusepithel zu untersuchen, bestand in der Analyse von Mäusen mit einer Thymusepithel-spezifischen Überexpression von HIF1 $\alpha$  oder HIF2 $\alpha$  ( $Rosa26^{+/loxP;Hif1dPA};Foxn1^{+/cre}; Rosa26^{+/loxP;Hif2dPA};Foxn1^{+/cre}$ ). Hier ist zu betonen, dass *Foxn1* ebenso in Epithelzellen der Haut exprimiert wird. Somit beeinflusst eine *Foxn1-Cre*-vermittelte Gen-Inaktivierung auch die zelluläre Situation des Hautepithels.

Bei allen *in vivo* Experimenten wurden Wurfgeschwister der Versuchstiere als Kontrollen verwendet. Sowohl die Versuchstiere als auch die Kontrolltiere trugen die gleichen Allele. Jedoch trugen ausschließlich die Versuchstiere das *Foxn1-Cre* Transgen.

### 6.1 Einfluss von Sauerstoff-armen Bedingungen auf das Wachstumsverhalten von kortikalen und medullären Thymusepithelzellkulturen *in vitro*

Im Vergleich zu anderen Organen ist der Thymus hypoxisch. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass TECs einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt sind. Demnach könnten niedrige Sauerstoffkonzentrationen eine Bedeutung innerhalb von TECs haben. Um den Einfluss von reduzierten Sauerstoffbedingungen auf das Wachstumsverhalten von TECs

*in vitro* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die kortikalen bzw. medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71 verwendet.

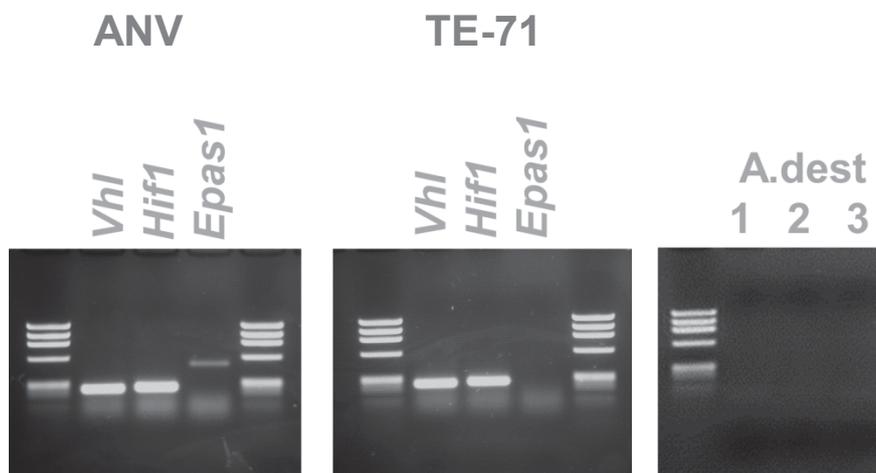


**Abbildung 3 Analyse der kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71.**

(A) Die kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71 wurden mit anti-EpCAM, anti-Ly-51 und anti-MHCII sowie mit UEA gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Im Histogramm werden die gefärbten Zellen (dunkelgraue Linie) gegen die ungefärbten dargestellt (hell grau). (B) Zum Nachweis der TEC-charakterisierenden *Foxn1*-Expression wurde die aus ANV- und TE-71-Zellen gewonnene cDNA mit Hilfe von Expressionsprimern (#378, #379) in der PCR amplifiziert und die Produkte in einem 1,5%-igen EthBr-haltigen Agarose-Gel aufgetrennt. Zur Größenorientierung wurde ein Größenstandard mitgeführt. Die Visualisierung der Amplifikationsprodukte erfolgte unter UV-Bestrahlung; negative control, KM; positive control, Zellen aus Thymusverdau; *Foxn1*-spezifische Bande ~ 250bp.

In der durchflusszytometrischen Analyse zur Verifizierung der Zelllinien zeigten die medullären Zellen TE-71 eine deutliche Expression des *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) sowie eine geringe Ausprägung des Medulla-spezifischen Markers *Ulex europaeus agglutinin* (UEA) und von MHC class II-Molekülen. Die kortikalen Zellen ANV wiesen dagegen weder die Expression von Thymusepithel- bzw. Kortexspezifischen Markern (EpCAM- bzw. Ly51-), noch die Expression von MHC class II-Molekülen auf (Abb. 3A). In der *Foxn1*-Expressions-PCR zeigten beide Zelllinien, ANV und TE-71, *Foxn1*-mRNA-spezifische Banden mit einer Größe von 250bp (Abb. 3B).

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Amplifikationsprodukte aus der *Vhl*-, *Hif1α*- und *Hif2α* (*Epas1*)-Expressions-PCR zeigten beide Zelllinien spezifische Banden für *Vhl*- (250bp) und *Hif1α*-mRNA (250bp). Das spezifische *Hif2α* (*Epas1*)-Produkt (610bp) konnte nur bei der ANV-, nicht aber bei der TE-71-Zelllinie detektiert werden (Abb. 4).

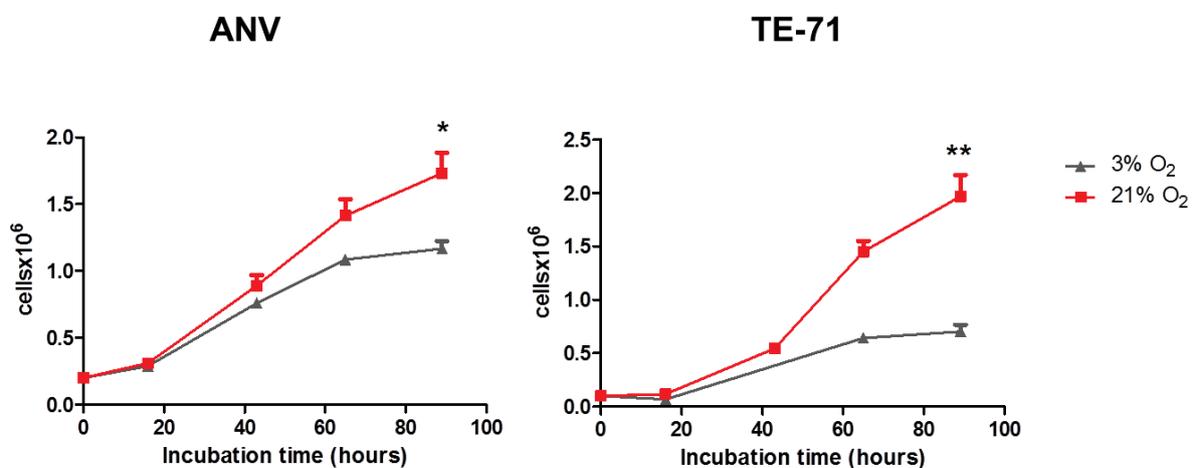


**Abbildung 4 Expressionsanalyse der Gene *Vhl*, *Hif1α* und *Hif2α* von kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71 unter atmosphärischem Sauerstoff (21%).**

Die mit den Expressions-Primern #338 und #339 (*Vhl*), #334 und #335 (*Hif1α*) sowie #239 und #240 (*Epas1*, *Hif2α*) an der cDNA von ANV- und TE-71-Zellkulturen generierten PCR-Produkte wurden in einem 1,5%igen EthBr-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Die Visualisierung der Amplifikationsprodukte erfolgte unter UV-Bestrahlung. Negative Kontrollen: A.dest-Ansätze der *Vhl* (1), *Hif1α* (2) und *Epas1* (3)-PCR. Spezifische Produkte: *Vhl* ~250bp, *Hif1α* ~250bp, *Hif2α* (*Epas1*) 501bp.

Die Expression von *Foxn1* bedeutet, dass beide Zelllinien Thymusepithelialen Ursprungs sind. Die Expression von EpCAM, UEA und MHCII spricht dafür, dass die TE-71-Zelllinie ihre medullären TEC-Eigenschaften erhalten hat. Im Gegensatz dazu hat die ANV-Zelllinie den Epithelzelllinienmarker EpCAM und den Marker Ly-51, der charakteristisch für kortikale TECs ist, verloren. Die Expression der *Vhl*- und *Hif1α* -mRNA in beiden Zelllinien und der *Hif2α* -mRNA in der ANV-Zelllinie lässt vermuten, dass der Hypoxie-Signal-Weg in ANV- und TE-71-Zelllinien eine funktionelle Bedeutung hat.

Innerhalb des Thymus werden TECs kontinuierlich durch Proliferation von bisher nicht genau definierten Vorläuferzellen generiert. Deshalb wurde zunächst der Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffanteile im Zellinkubator auf das Wachstum von den Thymusepithelzelllinien untersucht. Es wurden Wachstumskinetiken über einen Zeitraum von 96 Stunden unter reduzierten (3% O<sub>2</sub>) als auch atmosphärischen (21% O<sub>2</sub>) Sauerstoffbedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ermittelt. Beide Zelllinien zeigten nach 18 Stunden Hypoxie (3%) deutlich unterschiedliche Proliferationsraten im Vergleich zu atmosphärisch inkubierten Zellen. Nach 96 Stunden waren die Zellzahlen von ANV um etwa 30% vermindert im Vergleich zu atmosphärisch inkubierten Zellen, bei TE-71 sogar um mehr als 60 % (Abb. 5).



**Abbildung 5 Wachstumskinetiken der kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71 unter hypoxischen Bedingungen.**

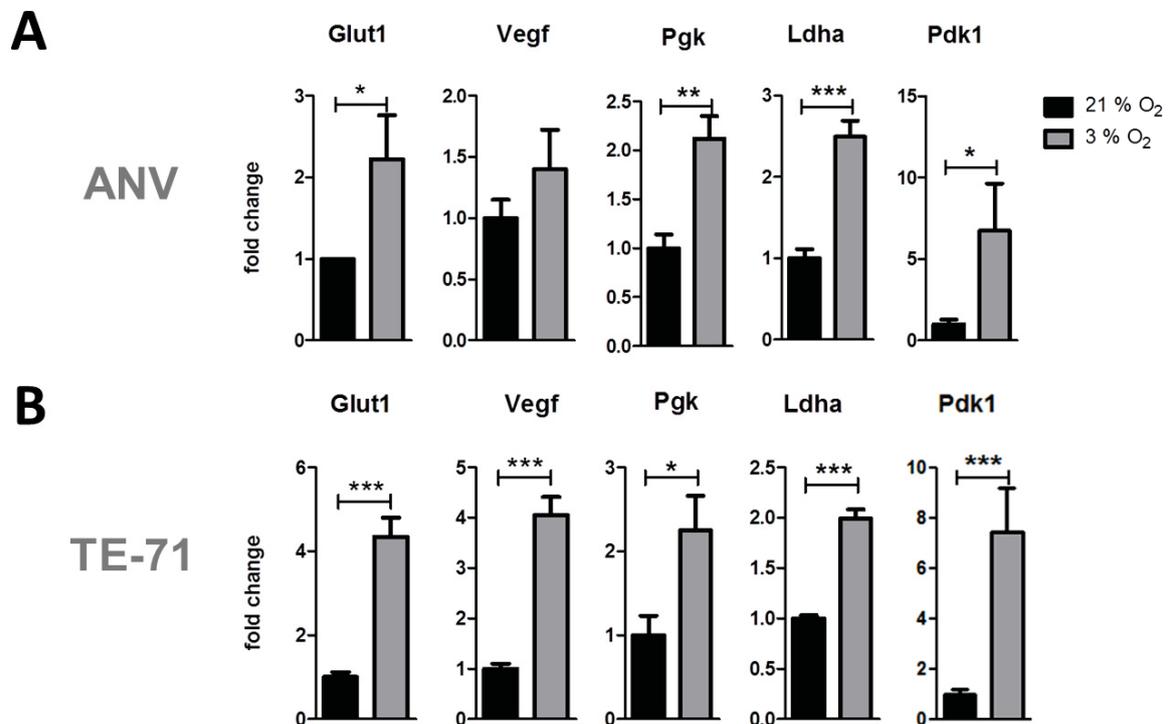
Die kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71 wurden jeweils bei 3% und 21% O<sub>2</sub> in 12-well-Platten inkubiert (Anzahl der ausgesäten Zellen pro Ansatz: ANV  $2 \times 10^5$ , TE-71  $1 \times 10^5$ ). Nach 18, 43, 65 und 89 Stunden wurde mittels Trypanblau-Färbung die Zellzahl in der Neubauerzählkammer ermittelt; Auswertung von n=3 unabhängigen Ansätzen pro Zeitpunkt; \* p< 0.05; \*\* p< 0.005.

Zusammenfassend hatte ein reduziertes Sauerstoffangebot von 3% O<sub>2</sub> *in vitro* einen negativen Einfluss auf das Wachstum der TEC-Linien. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Hypoxie auch *in vivo* ein negativer Regulator der Proliferation von TECs darstellt.

## 6.2 *In vitro*-Sauerstoff-Reduktion aktiviert die Expression von HIF-Zielgenen in Thymusepithelzellkulturen

Um zu zeigen, dass die Inkubation der Thymusepithelzellkulturen unter reduzierten Sauerstoffbedingungen mit der Aktivierung des Hypoxie-Signalweges einhergeht, wurde die

Expression von den HIF-Zielgenen *solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1 (Glut1)*, *vascular endothelial growth factor A (Vegf)*, *phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1)*, *lactate dehydrogenase A (Ldha)* und *pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1 (Pdk1)* nach 18 Stunden Inkubation unter Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) analysiert und mit der Expression in atmosphärisch inkubierten Zellen verglichen. In TE-71-Zellen war die Expression dieser Gene unter hypoxischen Bedingungen signifikant hochreguliert, am stärksten bei *Pdk1* mit einer mehr als 7-fachen Aktivierung. Dagegen fiel die Aktivierung dieser Gene in ANV geringer aus, wenngleich *Pdk1* mit einer mehr als 6-fachen Induktion eine ähnlich ausgeprägte Aktivierung wie in TE-71-Zellen zeigte. (Abb. 6)



**Abbildung 6 Expressionsanalyse von HIF-Zielgenen in kortikalen und medullären Thymusepithelzellen ANV- und TE-71- nach 18 h Hypoxie-Inkubation.**

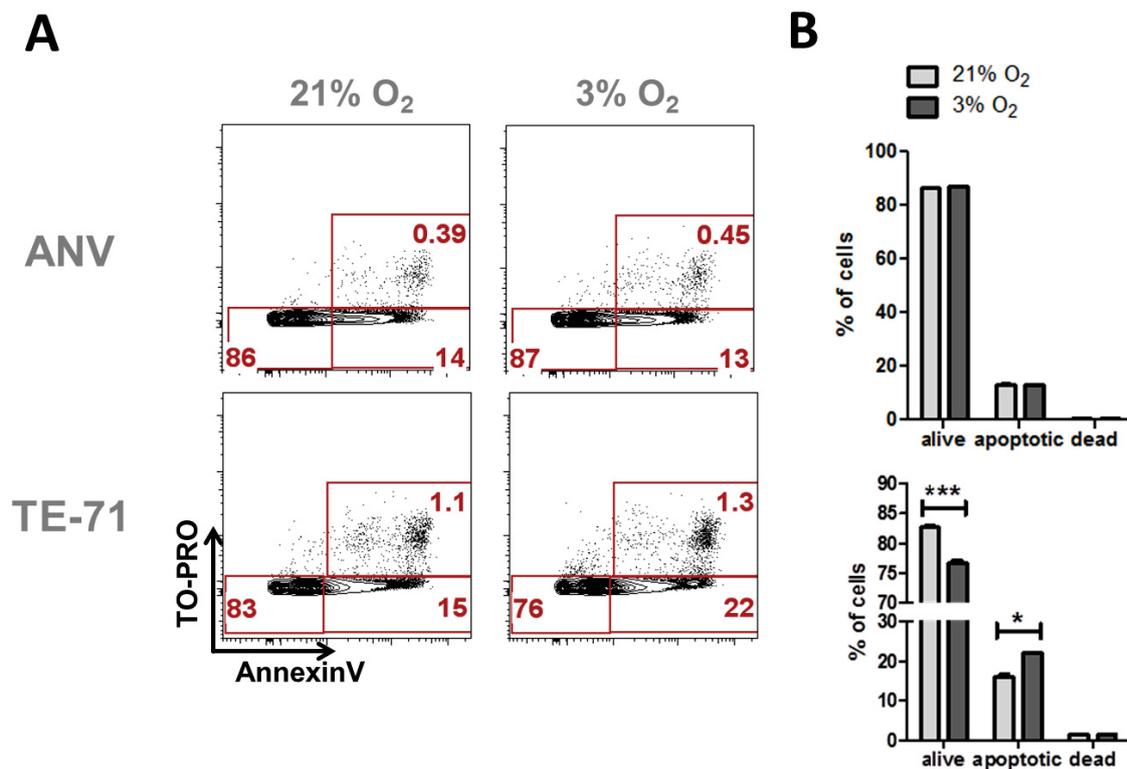
Jeweils  $5 \times 10^5$  ANV- und TE-71-Zellen wurden 18 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (3% O<sub>2</sub>) und Kontrollbedingungen (21% O<sub>2</sub>) inkubiert. Die Expression der Ziel-mRNA wurde gegen die Expression der *Hprt*-mRNA als House-keeping-Transkript, dessen Expression bei 21% und 3% O<sub>2</sub> gleich war, normalisiert. Die Analyse erfolgte in 3 unabhängigen Ansätzen von (A) ANV-Zellen und (B) TE-71-Zellen; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Insgesamt gesehen reagierte die medulläre TEC-Linie TE-71 *in vitro* mit einer höheren Induktion der HIF-Zielgene auf reduzierte Sauerstoffbedingungen als die kortikale TEC-Linie

ANV. Dieses könnte bedeuten, dass die Änderung des Sauerstoffgehaltes *in vivo* einen größeren Effekt in mTECs als in cTECs hat.

### 6.3 Einfluss von *in vitro* Sauerstoff-armen Bedingungen auf die Apoptoserate von kortikalen und medullären Thymusepithelzellkulturen

Vermindertes Wachstum von Zellen kann durch eine geringere Proliferation der Zellen oder eine erhöhte Apoptoserate verursacht werden. Apoptose zeigt sich bereits in der frühen Phase durch Membranveränderungen. Unter anderem findet dabei die Umlagerung des Membranphospholipids Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Zellmembran zur Außenseite statt. AnnexinV kann zur Detektion von PS, der DNA-Farbstoff TO-PRO als Indikator für tote Zellen eingesetzt werden.

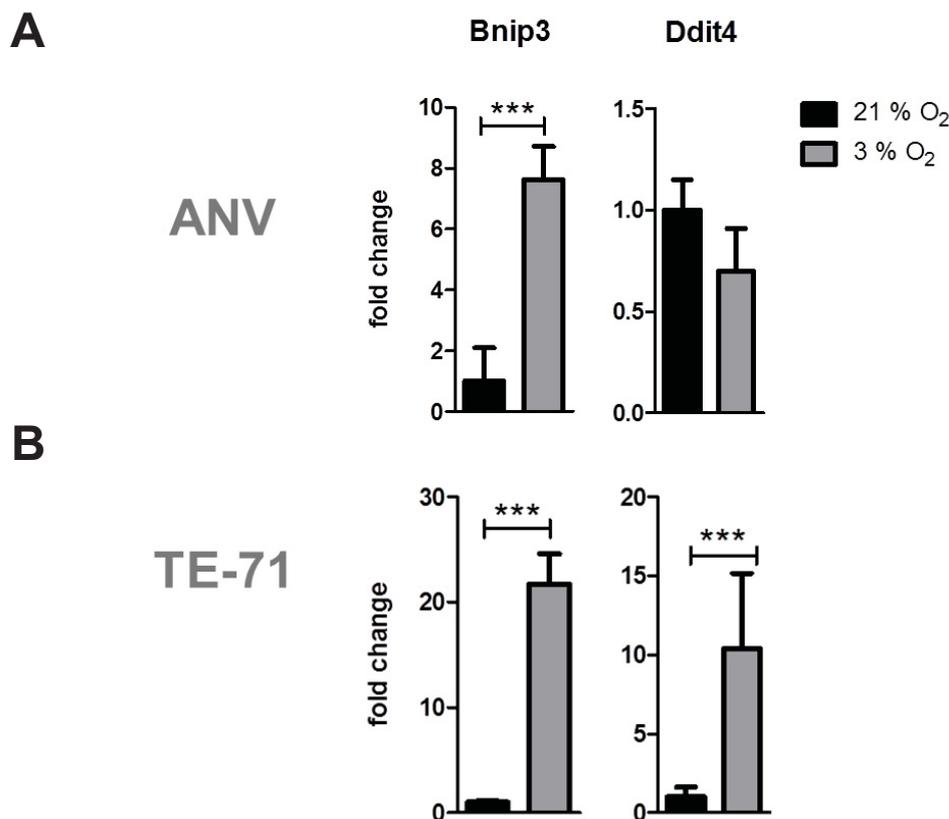


**Abbildung 7** Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von kortikalen und medullären Thymusepithelzellkulturen ANV und TE-71 nach 18 h Hypoxie-Inkubation

Die kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien ANV und TE-71 wurden jeweils bei 3% und 21% O<sub>2</sub> inkubiert ( $5 \times 10^5$  pro Ansatz). Nach 18 Stunden wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des AnnexinV-Apoptose-Assays der Anteil der lebenden (AnnexinV<sup>-</sup>,TO-PRO<sup>-</sup>), apoptotischen (AnnexinV<sup>+</sup>,TO-PRO<sup>-</sup>) und toten (AnnexinV<sup>+</sup>,TO-PRO<sup>+</sup>) Zellen analysiert. (A) Exemplarische durchflusszytometrische Analysen und (B) Quantifizierung: jeweils Auswertung von n=3 unabhängigen Ansätzen; \* p < 0.05.

Um zu untersuchen, ob eine gesteigerte Apoptoserate ursächlich für die reduzierten Zellzahlen in Hypoxie-inkubierten ANV- und TE-71-Zellen verantwortlich war, wurden die aus dem Monolayer gelösten Zellen zusammen mit den Zellen des Kulturüberstandes mit AnnexinV und TO-PRO gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. ANV-Zellen zeigten dabei unveränderte relative Proportionen an apoptotischen (AnnexinV<sup>+</sup>,TO-PRO<sup>-</sup>) und toten Zellen (AnnexinV<sup>+</sup>,TO-PRO<sup>+</sup>). In TE-71-Zellkulturen dagegen war der Anteil an apoptotischen (AnnexinV<sup>+</sup>,TO-PRO<sup>-</sup>) Zellen signifikant erhöht, die der lebenden signifikant erniedrigt im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 7).

In der Genexpressionsanalyse der pro-apoptischen HIF-responsive Gene *BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3* (*Bnip3*) und *DNA-damage-inducible transcript 4* (*Ddit4*) zeigten Hypoxie-inkubierte ANV eine mehr als 7-fach induzierte Expression von *Bnip3* (\*\*\*) aber unauffällige Expressionslevel für *Ddit4* (0,7-fach). In TE-71 dagegen waren *Bnip3* mehr als 21-fach und *Ddit4* mehr als 10-fach hochreguliert im Vergleich zu atmosphärisch inkubierten Zellen (\*\*\*) (Abb. 8).



**Abbildung 8** Expressionsanalyse der pro-apoptischen Gene *Bnip3* und *Ddit4* in kortikalen (ANV) und medullären (TE-71) Thymusepithelzelllinien nach 18 h Hypoxie-Inkubation (3% O<sub>2</sub>).

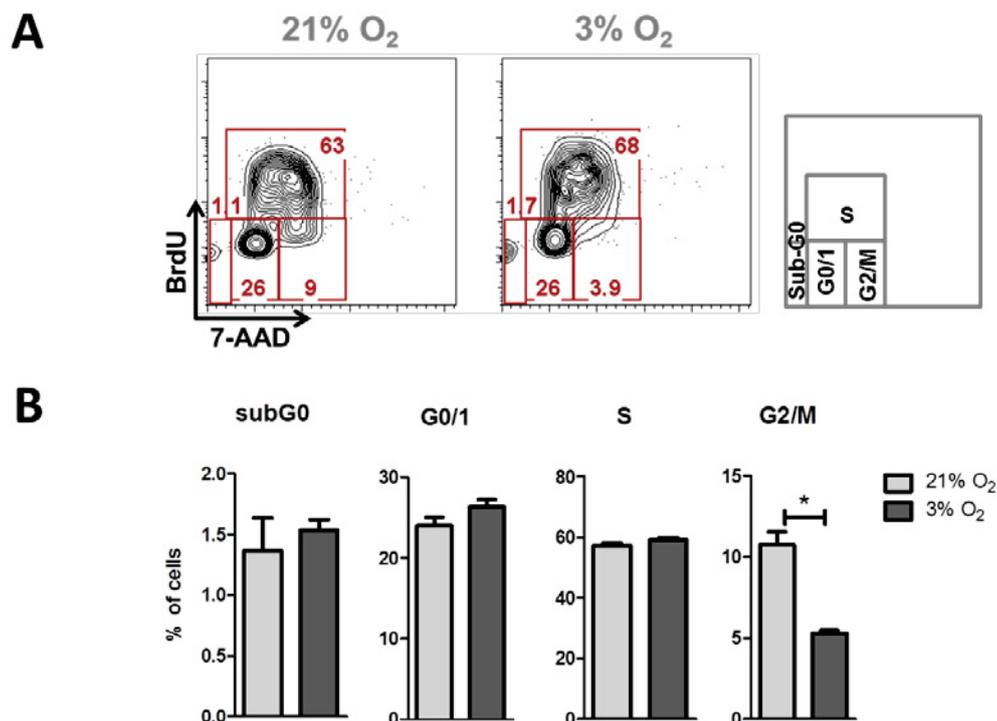
Die Analyse erfolgte nach 18-stündiger Inkubation von jeweils 5 x 10<sup>5</sup> ANV- und TE-71-Zellen unter hypoxischen Bedingungen (3% O<sub>2</sub>) und Kontrollbedingungen (21% O<sub>2</sub>). Die Expression der *Bnip3*-

und *Ddit4*-mRNA wurde gegen die Expression der *Hprt*-mRNA normalisiert. Die Analyse erfolgte in 3 unabhängigen Ansätzen; \*\*\*  $p < 0.001$ .

In Zusammenschau reagierten TE-71-Zellen unter Sauerstoff-armen Bedingungen mit einer erhöhten Apoptoserate, die mit der Hochregulation der pro-apoptotischen Gene *Bnip3* und *Ddit4* verbunden war. In ANV-Zellen blieb der Anteil der apoptotischen Zellen bei weniger aktivierten *Bnip3*-mRNA-Spiegeln dagegen unauffällig.

#### 6.4 Einfluss von *in vitro* Sauerstoff-armen Bedingungen auf den Zellzyklus von medullären Thymusepithelzellen

Die vorausgehenden Daten zeigen, dass die medulläre Zelllinie TE-71 durch Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes stärker im Wachstum und Überleben beeinträchtigt wird als die kortikale Zelllinie ANV. Daher wurden für folgende *in vitro*-Hypoxie-Experimente die TE-71 Zelllinie eingesetzt.



**Abbildung 9** Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasezellen von medullären TE-71-Zellen nach 18 h 3% O<sub>2</sub>-Inkubation.

Die medulläre Thymusepithelzelllinie TE-71 wurde bei 3% und 21% O<sub>2</sub> inkubiert ( $5 \times 10^5$  pro Ansatz). Nach 18 h Inkubation wurden die Zellen über einen Zeitraum von 45 Minuten mit BrdU (10  $\mu$ M) markiert. Der intrazellulären Färbung mit anti-BrdU und 7-AAD folgte die durchflusszytometrische Analyse der relativen Anteile der Zellzyklusphasen. (A) Exemplarische durchflusszytometrische Analysen (B) Auswertung von n=3 unabhängigen Ansätzen; \*  $p < 0.05$ .

Um festzustellen, ob die signifikant erhöhte Anzahl an apoptotischen TE-71-Zellen mit Veränderungen im Zellzyklus einhergeht, wurden unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck (3%) inkubierte TE-71-Zellen mit Hilfe des BrdU-Zellzyklus-Assays durchflusszytometrisch analysiert und mit atmosphärisch inkubierten Kontrollzellen verglichen. Hier wiesen unter hypoxischen Bedingungen inkubierte TE-71-Zellen im Vergleich zu atmosphärisch inkubierten Zellkulturen einen deutlich geringeren Anteil an G2M-Phase-Zellen auf (\*  $p < 0.05$ ) (Abb. 9). Dies bedeutet dass Hypoxie in medullären TECs einen negativen Einfluss auf den Zellzyklus hat.

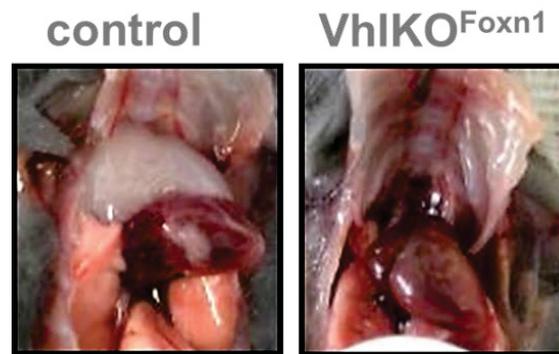
Diese *in vitro* Ergebnisse zeigen, dass ein adäquates Sauerstoffangebot für ANV- und vor allem TE-71-Zellen wichtig war. Reduzierte Sauerstoffbedingungen führten in beiden Zellkultursystemen zu verlangsamtes Wachstum, zur Hochregulierung von HIF-Zielgenen und in TE-71-Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate und dem Verlust von G2M-Phase-Zellen.

## 6.5 Einfluss des *Vhl*-Verlustes im Thymusepithel auf die Ausbildung eines funktionellen Thymus

Die *in vitro* Daten mit den TEC-Zelllinien TE-71 und ANV sprachen dafür, dass eine Verminderung des Sauerstoffangebotes in der Lage ist, Thymusepithelzellen negativ zu regulieren. Ein vermindertes Sauerstoffangebot war mit einer Aktivierung des Hypoxie-Signalweges verbunden. In den folgenden Experimenten war es deshalb das Ziel, den Hypoxie-Signalweg innerhalb von TECs *in vivo* in der Maus zu aktivieren. In den meisten Zelltypen wird der Hypoxie-Signalweg durch das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) negativ reguliert. Deshalb wurde in TECs das *Vhl*-Gen mittels des *Foxn1-Cre*-Transgens inaktiviert.

Zunächst wurde der Einfluss eines *Vhl*-Verlustes in Thymusepithelzellen auf die Entstehung des Thymus untersucht. Zur Generierung von Mäusen mit einem Thymusepithelzell-spezifischen *Vhl*-Verlust wurden *Foxn1-Cre*-Mäuse zunächst mit homozygoten  $Vhl^{loxP}$ -Mäusen verkreuzt. Die heterozygoten Nachkommen ( $Vhl^{+/loxP}; Foxn1^{+/cre}$ ) wurden anschließend mit  $Vhl^{loxP/loxP}$ -Mäusen verkreuzt. Die daraus hervor gegangenen  $Vhl^{loxP/loxP}; Foxn1^{+/cre}$ -Mäuse ( $VhlKO^{Foxn1}$ ) wurden in den erwarteten Mendelschen Verhältnissen geboren und zeigten sich vom äußeren Erscheinungsbild unverändert im Vergleich zu den  $Vhl^{loxP/loxP}; Foxn1^{+/+}$ -Kontroll-Mäusen (control). Es wurden Mäuse unterschiedlichen Alters analysiert. Alle Kontrolltiere zeigten einen ausgebildeten Thymus. Dagegen konnte in keiner der  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäuse (n=50) makroskopisch ein Thymus nachgewiesen werden (Abb. 10). Für den Nachweis der effizienten *Foxn1-Cre* vermittelten

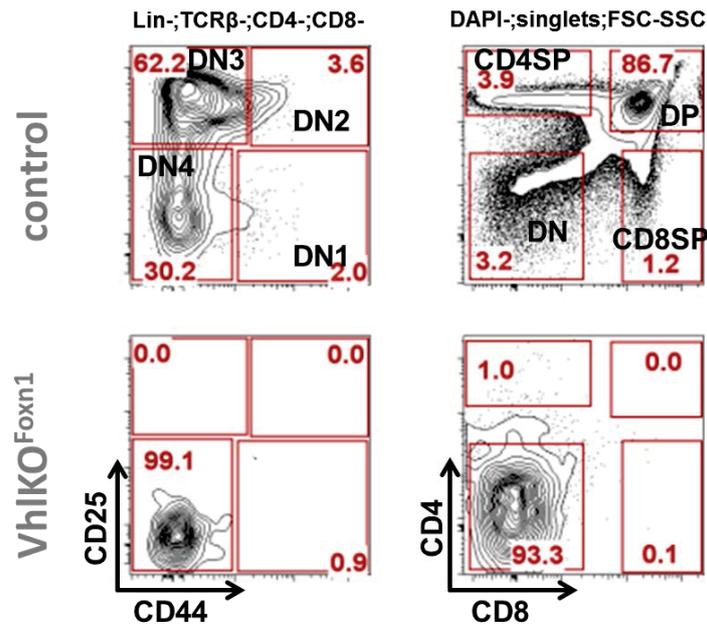
Rekombination und Inaktivierung von *Vhl* in sortierten  $VhIKO^{Foxn1}$ -TECs stand mit dem Verlust des Thymus kein Untersuchungsmaterial zur Verfügung.



**Abbildung 10  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäuse zeigen makroskopisch keinen Thymus.**

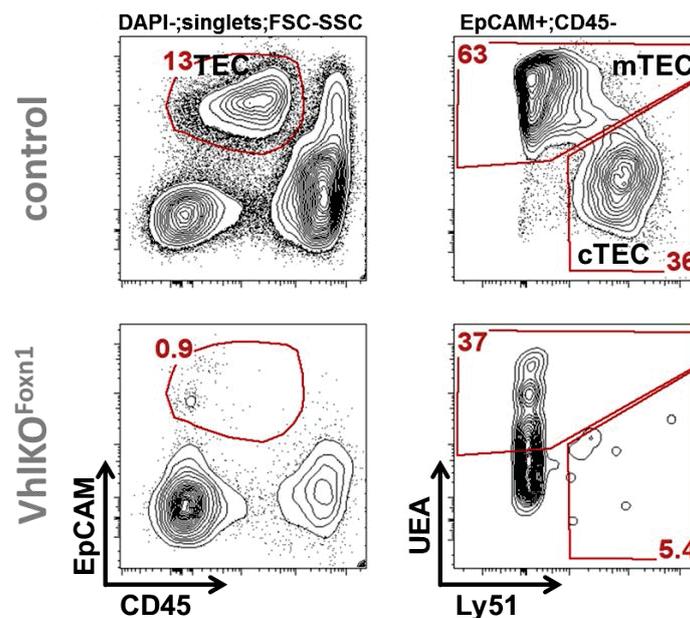
Abbildung der ventralen Sicht auf den oberen Mediastinalbereich einer  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ -Maus (control) und einer  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ -Maus ( $VhIKO^{Foxn1}$ ) (Alter 13 Tage). Die Abbildung steht exemplarisch für (n=50)  $VhIKO^{Foxn1}$ - und (n=50) Kontrollmäuse im Alter von 1 Tag bis 1 Jahr.

Thymusgewebe lässt sich normalerweise durch die unterschiedlichen Entwicklungsstufen von T-Zellen nachweisen. Dabei kommen T-Zellvorstufen, wie CD25-positive Linienmarker-negative (DN1-Zellen) und  $CD4^+CD8^+$  doppelt positive Zellen nur im Thymusgewebe vor. Um möglicherweise residuelles Thymusgewebe, das makroskopisch nicht sichtbar ist, nachzuweisen wurde zuerst das gesamte obere Mediastinalgewebe auf die Thymus-spezifischen T-Zell-Vorstufen untersucht. Für die durchflusszytometrische Analyse der Thymozytenpopulationen wurde das verbliebene Mediastinalgewebe der oberen Bauchhöhle bzw. der Thymus der Kontrolltiere entnommen, in Einzel-Zellsuspension gebracht und die Gesamtzellzahl ermittelt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gegen etablierte Oberflächenmarker (Tabelle 4). Zur Analyse der frühen Thymozyten-Entwicklungsstufen wurden innerhalb der  $CD4CD8$ -DN (doppelt negativen) - Lymphozytenpopulation alle reifen, ausdifferenzierten hämatopoetischen Linienzellen (lineage, lin) sowie  $TCR\beta^+$ -Zellen ausgeschlossen. Innerhalb der verbliebenen Zellen wurden die Subpopulationen DN1 bis DN4 mit Hilfe der Oberflächenmarker CD44 und CD25 identifiziert (DN1:  $CD44^+CD25^-$ ; DN2  $CD44^+CD25^+$ ; DN3  $CD44^-CD25^+$ ; DN4  $CD44^-CD25^-$ ). Über die Expression der T-Zell-spezifischen Oberflächenmarker CD4 und CD8 wurden die reiferen Thymozyten-Entwicklungsstufen DP ( $CD4^+CD8^+$ ), CD4SP ( $CD4$  single positive) und CD8SP ( $CD8$  single positive) analysiert. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren waren alle sich entwickelnden Thymozyten von DN1 bis DN4, DP und SP in den  $VhIKO^{Foxn1}$ Mäusen nicht nachweisbar (Abb. 11). Das komplette Fehlen der T-Zell-Vorläufer im Mediastinum sprach für die Abwesenheit von Thymusgewebe in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen.



**Abbildung 11** VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen aller Thymus-spezifischen T-Zell-Entwicklungsstufen aus.

Das apikale mediastinale Gewebe einer VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Maus sowie des Thymus einer Kontrollmaus wurde mit anti-CD4, -CD8, -CD25, -CD44, -TCRβ sowie mit Linien-spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die frühen Thymozyten-Subpopulationen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression von CD44 und CD25 innerhalb der CD4CD8-DN Thymozyten identifiziert (DN1: CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>; DN2: CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; DN3: CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>; DN4: CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>), die der späteren Entwicklungsstufen durch die Expression von CD4 und CD8 (DP: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4SP, CD8SP). Repräsentative Contour plots für (n=4) Kontrollen und (n=4) VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse; control, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+/+</sup>; VhIKO<sup>Foxn1</sup>, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup>; Alter der Mäuse 18 Wochen; DN, doppelt negativ; DP, doppelt positive; SP, single positive.



**Abbildung 12** VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse weisen nur vereinzelt EpCAM<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> TECs auf.

Das apikale mediastinale Gewebe einer VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Maus und einer Kontrollmaus wurden enzymatisch verdaut. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD45, EpCAM und Ly-51 sowie mit UEA gefärbt

und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. TECs exprimieren das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM. Innerhalb dieser Zellpopulation exprimieren cTECs Ly51 und mTECs binden UEA. Repräsentative Contour-plots für (n=3) Kontrollen und (n=3)  $Vh1KO^{Foxn1}$ -Mäuse; control,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $Vh1KO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ; Alter der Mäuse 13 Tage.

Das Fehlen von T-Zellvorläuferzellen könnte durch eine Fehlfunktion oder der kompletten Abwesenheit von TECs in den  $Vh1KO^{Foxn1}$ -Mäusen verursacht sein. Daher wurde als nächstes das Thymusepithelzell-Kompartiment analysiert. Dafür wurde das apikale mediastinale Gewebe mit Hilfe eines Enzym-Mixes bestehend aus Collagenase, Dispase und DNase verdaut, die erhaltene Einzelzellsuspension einer Percoll-Gradientenzentrifugation unterzogen und von der oberen Percoll-Fraktion (OPF) die Gesamtzahl mittels Neubauer-Kammer ermittelt (Klein et al., 2000). Anschließend wurden die Zellen mit UEA sowie mit Antikörpern gegen EpCAM, CD45, Ly51 und MHC-class II gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. TECs sind EpCAM-positiv, jedoch negativ für den pan-hämatopoetischen Marker CD45. Innerhalb der TEC-Population können kortikale TECs von medullären TECs durch ihre Expression von Ly51 bzw. ihrem Vermögen UEA zu binden unterschieden werden. Die Kontrolltiere zeigten TECs sowie die cTEC- und mTEC-Subpopulationen. Passend zu dem kompletten Fehlen aller Thymozyten-Vorstufen konnten in den  $Vh1KO^{Foxn1}$ -Mäusen nur sehr vereinzelt Thymusepithelzellen nachgewiesen werden. Nur wenige der  $Vh1KO^{Foxn1}$ -TECs wiesen kortikale oder medulläre Oberflächenmerkmale auf (Abb. 12).

Insgesamt war in  $Vh1KO^{Foxn1}$ -Mäusen die Abwesenheit des TEC- und Thymozytenkompartimentes zu beobachten.

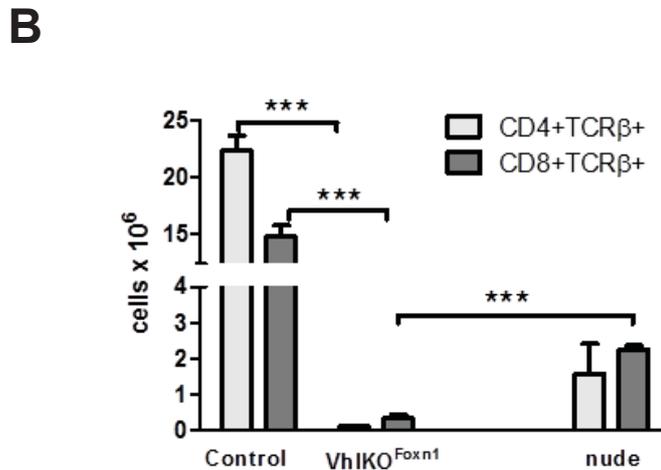
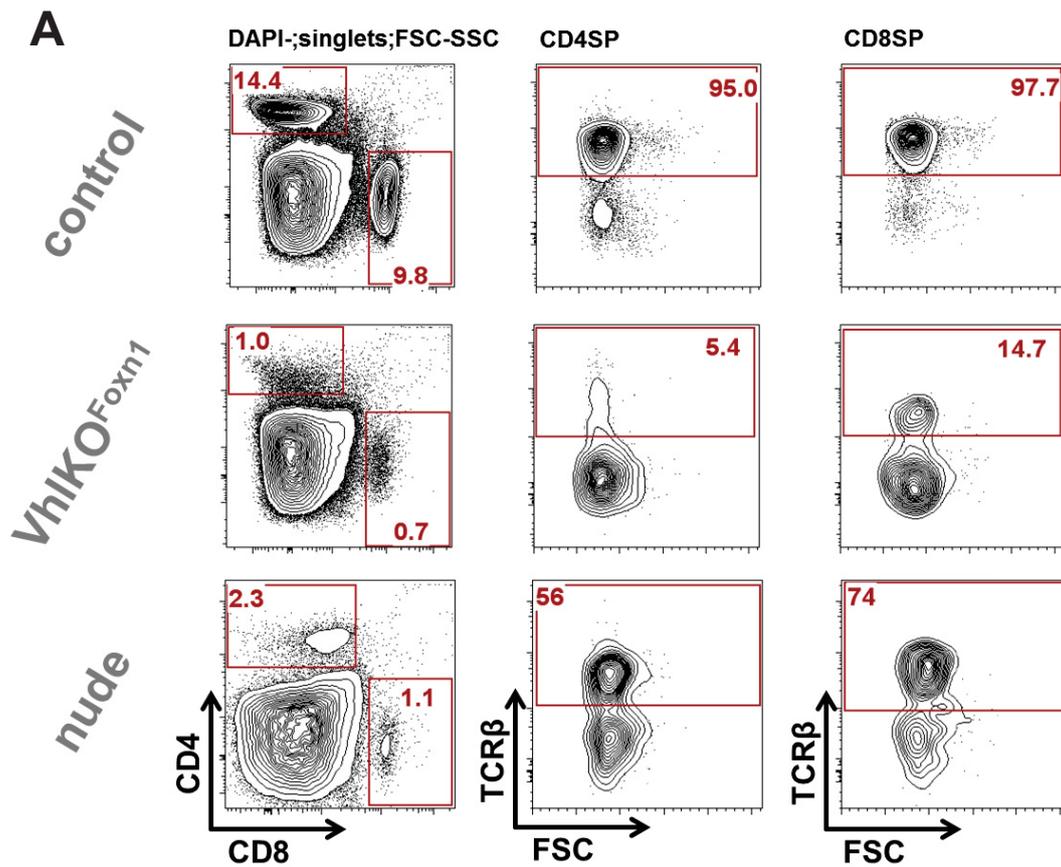
## 6.6 Einfluss des *Vhl*-Verlustes in Thymusepithelzellen auf die peripheren T- und B-Zellkompartimente

Nach ihrer Entwicklung und Selektion im Thymus werden die Thymozyten als naive, reife T-Zellen in die Peripherie entlassen, um die sekundären lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten zu besiedeln. Neben dem mediastinalen Thymus wurden in der Maus auch kleinere zervikale Thymi beschrieben (Terszowski et al., 2006). Die anatomische Lage ist variabel und deshalb schwer zu lokalisieren und zu präparieren. Jedoch würde das nahezu komplette Fehlen von peripheren T-Zellen als indirekter Hinweis für die Abwesenheit von zervikalen Thymi sprechen. Um die Abwesenheit eines funktionellen Thymusgewebes in  $Vh1KO^{Foxn1}$ -Mäusen zu bestätigen wurde die Milz auf das Vorhandensein von reifen  $TCR\beta^+CD4^+$ - und  $TCR\beta^+CD8^+$ -Zellen untersucht. Wie erwartet wiesen  $Vh1KO^{Foxn1}$ -Mäuse stark verminderte relative Anteile und absolute Zellzahlen an peripheren T-Zellen auf. *Nude*

Mäuse, die aufgrund einer Mutation im *Foxn1*-Gen keinen Thymus besitzen, zeichnen sich ebenfalls durch eine gestörte T-Zellentwicklung aus, die mit der nahezu kompletten Abwesenheit des reifen T-Zell-Kompartimentes einhergeht. Es stellte sich die Frage, ob die T-Zellentwicklung in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen ähnlich gestört ist als in *Nude* Mäusen. In der vergleichenden Analyse des peripheren T-Zellkompartimentes wiesen  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäuse geringere Milz-T-Zellen als *Nude* Mäuse gleichen Alters auf (Abb. 13 A,B).

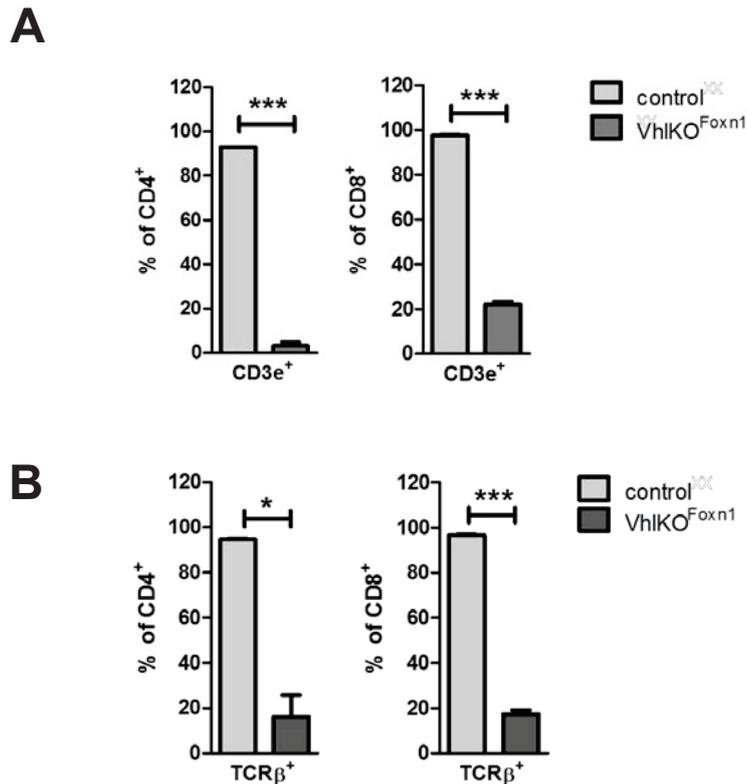
Die aus dem Thymus entlassenen reifen T-Zellen zeichnen sich durch einen funktionellen TCR $\beta$  aus, der innerhalb des DN3-Entwicklungsstadiums rearrangiert und erstmalig intrazellulär exprimiert (icTCR $\beta$ ) wird. Somit kann die Analyse des icTCR $\beta$  zur Detektion unreifer Thymozyten herangezogen werden. CD3e ist eine Untereinheit des TCR $\beta$ -Komplexes, der die reifen T-Zellen auszeichnet. Zusammen mit weiteren Untereinheiten ( $\gamma$ ,  $\delta$ ) ist CD3e für den Zusammenbau eines funktionierenden TCR erforderlich (Klausner et al., 1990). Da CD4 und CD8 in der Milz auch auf Zellen exprimiert werden, die nicht zum T-Zell-Kompartiment gehören, kann die Spezifität der T-Zell-Analyse durch die Analyse von CD3e erhöht werden.  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäuse zeigten in der durchflusszytometrischen Analyse stark verminderte relative Anteile an icTCR $\beta^+$ /TCR $\beta^+$  bzw. CD3e $^+$  Milzzellen (Abb. 14 A,B). Dieses bestätigte, dass das Fehlen des Thymus in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen die Verminderung des reifen peripheren T-Zell-Kompartimentes zur Folge hat.

T-Zellen stehen innerhalb von Lymphfollikeln in Milz und den Lymphknoten in enger Interaktion mit B-Zellen. Daraus ergab sich für uns die Frage, ob durch den nahezu kompletten T-Zellverlust in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen auch das B-Zell-Kompartiment der Milz betroffen ist. Um dem nachzugehen wurden Milzzellen mit etablierten Antikörpern gegen B-Zellmarker gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen zeigten sich unauffällige Gesamtzahlen der B220 $^+$ -B-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Auch die Anzahl von follikulären Milz-B-Zellen war bei  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen nicht verändert (Abb. 15).



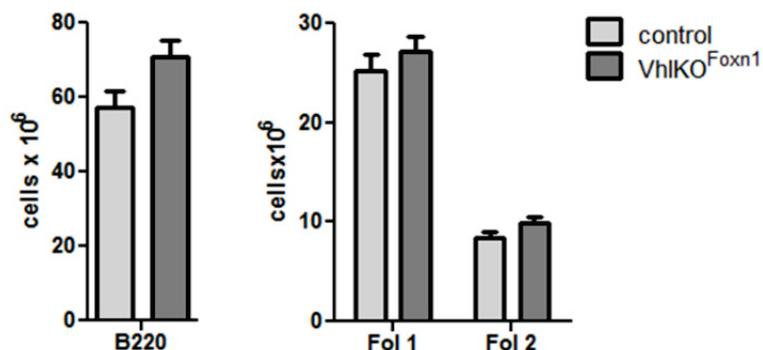
**Abbildung 13** In VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen ist das periphere reife T-Zellkompartiment fast komplett abwesend.

Milz-Einzelzell-Suspensionen von 18 Wochen alten VhIKO<sup>Foxn1</sup>- Kontroll- und *Nude* (NMRI outbred) Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und TCRβ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentative Contour plots (B) Graphische Darstellung der Gesamtzahlen der peripheren reifen TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und TCRβ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Milz-T-Zellen von Kontrollen (n=4), VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen (n=4) und *Nude* Mäusen (n=4); control, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; VhIKO<sup>Foxn1</sup>, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/cre</sup>; *Nude*, NMRI-*Foxn1*<sup>nu/nu</sup>; Alter der Mäuse 18 Wochen; \*\*\* p < 0,001.



**Abbildung 14 Expression von CD3e und intrazellulärem TCRβ von residuellen peripheren Milz-T-Zellen in VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen.**

Milzzellen von 6 Wochen alten VhIKO<sup>Foxn1</sup>- und Kontrollmäusen wurden mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 sowie gegen CD3e (Untereinheit des TCR) oder intra/extrazellulär gegen TCRβ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Graphische Darstellung des relativen Anteils an (A) CD3e<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3e<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen in VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Milzen (n=4) im Vergleich zu Kontrollen (n=3) und an (B) Milz-T-Zellen mit intra- und extrazellulär exprimierter TCRβ-Kette; Kontrollen (n=3); VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse (n=3); control, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; VhIKO<sup>Foxn1</sup>, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/-cre</sup>; \* p< 0.05; \*\*\* p< 0.001.



**Abbildung 15 VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse zeigten unauffällige Gesamtzahlen der B220<sup>+</sup>-B-Zellen und der folliculären B-Zellen.**

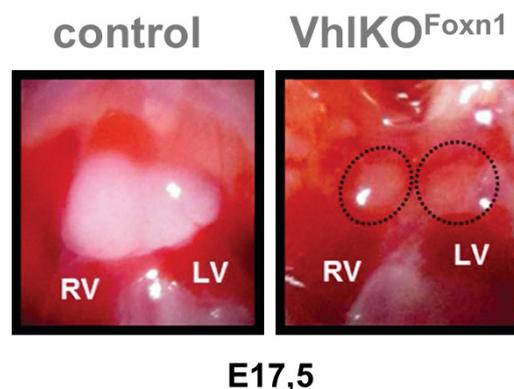
Zur durchflusszytometrischen Analyse der peripheren B-Zellen wurden Milz-Einzelzellsuspensionen von VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen (n=4) und Kontrollen (n=4) mit Antikörpern gegen B220, CD21/35, IgM, und IgD gefärbt; graphische Darstellung der B220<sup>+</sup>-B-Zellen, der CD21/35<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> folliculären B-Zellen 1

(Fol1) und der CD21/35<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> folliculären B-Zellen 2 (Fol2); control,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $VhIKO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ,

Zusammenfassend fehlte in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen das periphere T-Zell-Kompartiment nahezu komplett. Die peripheren T-Zellzahlen von  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen waren geringer als von NMRI *Nude* Mäusen, denen ebenfalls der Thymus fehlt.

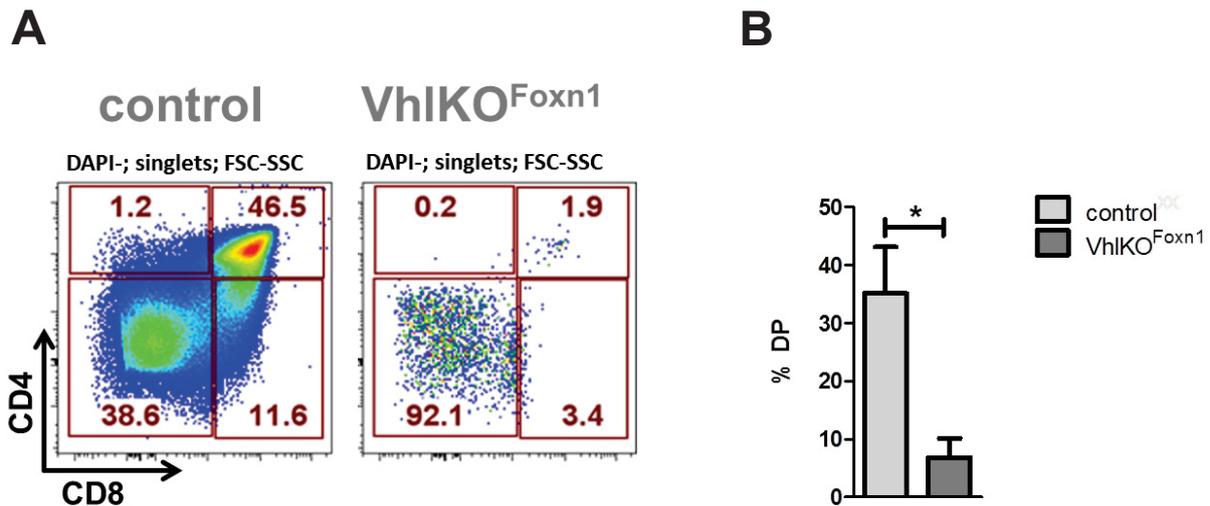
## 6.7 Einfluss des *Vhl*-Verlustes in Thymusepithelzellen auf die Entstehung der embryonalen Thymusanlage

Um zu untersuchen, ob in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen eine Thymusagenese oder eine Thymusaplasie vorliegt, wurden Zeitschwangerschaften angesetzt und  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen am Tag E17,5 analysiert. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen zeigten  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen orthotop angelegte, jedoch deutlich verkleinerte Thymusanlagen (Abb. 16). Die Entstehung von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>DP-T-Zellen aus CD4CD8 doppelt negativen Zellen stellt einen zentralen Schritt in der T-Zell-Entwicklung dar. Diese Entwicklungsprogression ist abhängig von funktionstüchtigen TECs. Deshalb wurde zu diesem frühen Zeitpunkt die Entwicklung von DP-Thymozyten untersucht. In der durchflußzytometrischen Analyse der  $VhIKO^{Foxn1}$ -Thymusanlagen konnten im Vergleich zu den Kontrollen nur vereinzelt DP-Thymozyten nachgewiesen werden (Abb. 17 A,B). Dies spricht dafür, dass in den kleinen rudimentären  $VhIKO^{Foxn1}$ -Thymi die T-Zellentwicklung nicht adäquat durch TECs unterstützt wird.



**Abbildung 16**  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen weisen verkleinerte und orthotop angelegte Thymusanlagen auf.

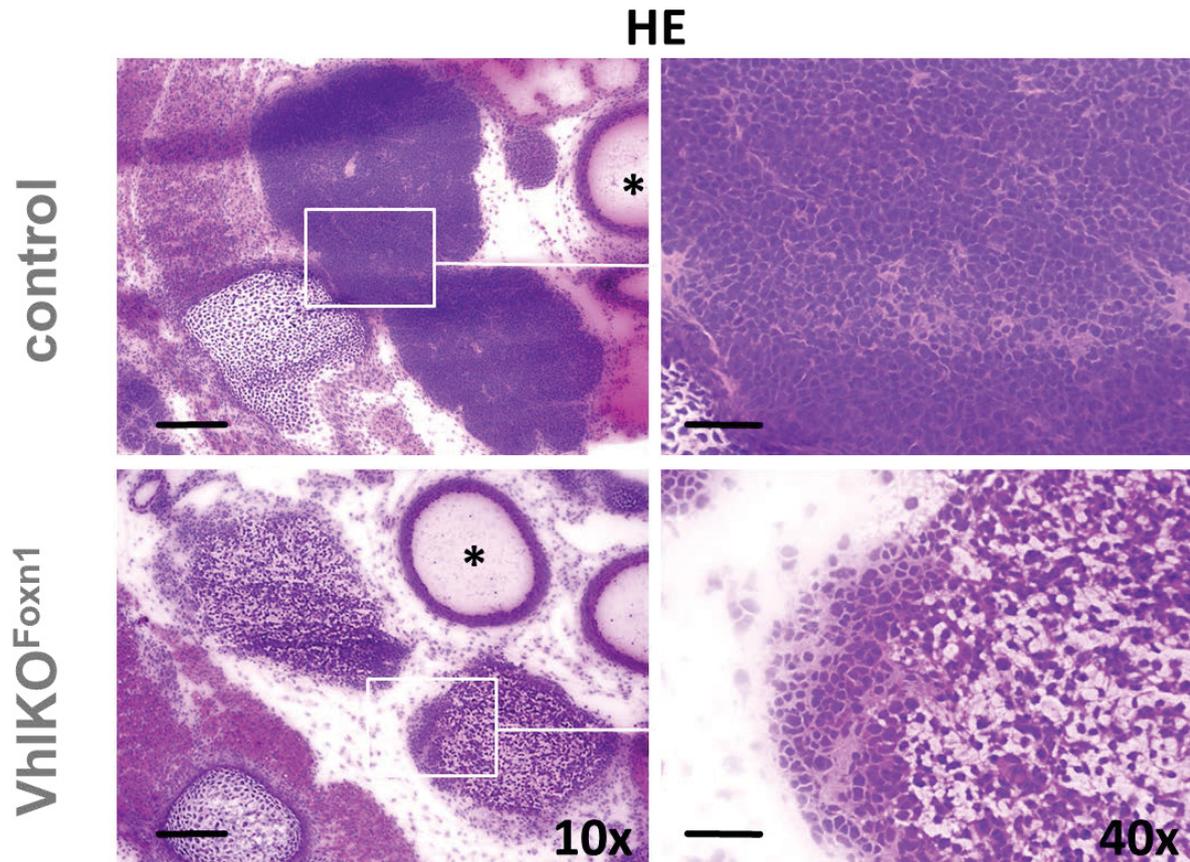
Ventrale Sicht auf den oberen Mediastinalbereich eines  $VhIKO^{Foxn1}$ - (E17,5) sowie eines Kontrollembryos. Die hellen Punkte innerhalb der umkreisten Bereiche, die die Thymusanlage anzeigen, sind fototechnisch bedingte Lichtreflexe. Repräsentative Abbildungen für (n=5) Kontroll- und (n=3)  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen; control,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $VhIKO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ , RV, rechter Herzventrikel; LV, linker Herzventrikel.



**Abbildung 17 Die Thymusanlagen der  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen wiesen eine unzureichende Thymozytenentwicklung auf.**

Die Thymusanlagen von  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen (E17,5) sowie Kontrollembryonen wurden in Einzelzellsuspension gebracht und durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von  $CD4^+CD8^+$ -doppelt positiven T-Zellen analysiert. (A) Repräsentative Pseudo Colour plots für (n=5) Kontroll- und (n=3)  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen (B) Graphische Darstellung des relativen Anteils an  $CD4^+CD8^+$ -doppelt positiven (DP) T-Zellen; Kontrollembryonen (n=5) und  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen (n=3); control,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $VhIKO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ; \* p< 0.05.

Um die Thymusaplasie detaillierter histologisch zu untersuchen wurden  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen am Tag E15,5 entnommen, eingebettet und kryokonserviert. Es wurden Kryoschnitte angefertigt und HE gefärbt. Hier zeigten sich die Thymusanlagen der  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen deutlich geringer besiedelt durch kleine rundkernige Zellen, vermutlich den Thymozyten, als die Anlagen in den Kontrollen. Stattdessen waren vermehrt große Zellen mit großflächigen, klaren zytoplasmatischen Anteilen vorhanden (Abb. 18), die in der HE-Färbung ungefärbt blieben.

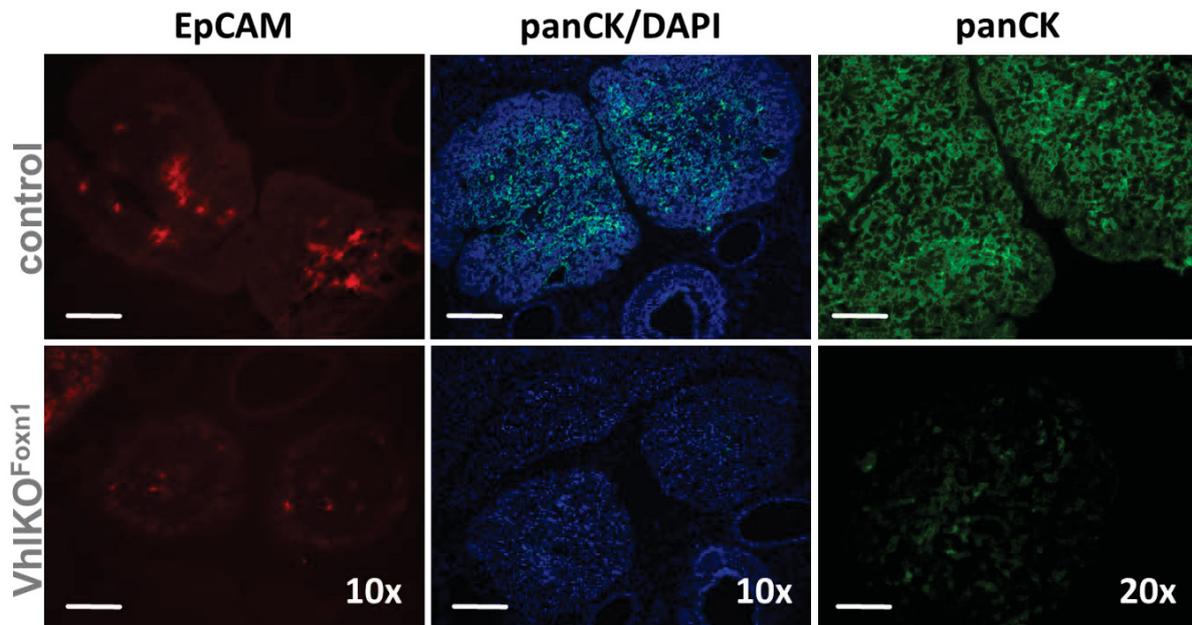


**Abbildung 18 Die Thymusanlagen von VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Embryonen zeigen eine weniger ausgeprägte Besiedlung mit Thymozyten.**

Kryo-Transversalschnitte der oberen Thoraxregion von VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Embryonen (E15,5) und Kontrollen wurden HE gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Abbildungen rechts zeigen Ausschnittsvergrößerungen. \*, große thorakale Gefäße; Maßstabsbalken 0,2mm (10x), 0,05mm (40x). Die Abbildungen zeigen repräsentative Schnitte für insgesamt n=3 Kontrollen und n=4 VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Embryonen; control, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; VhIKO<sup>Foxn1</sup>, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/-cre</sup>.

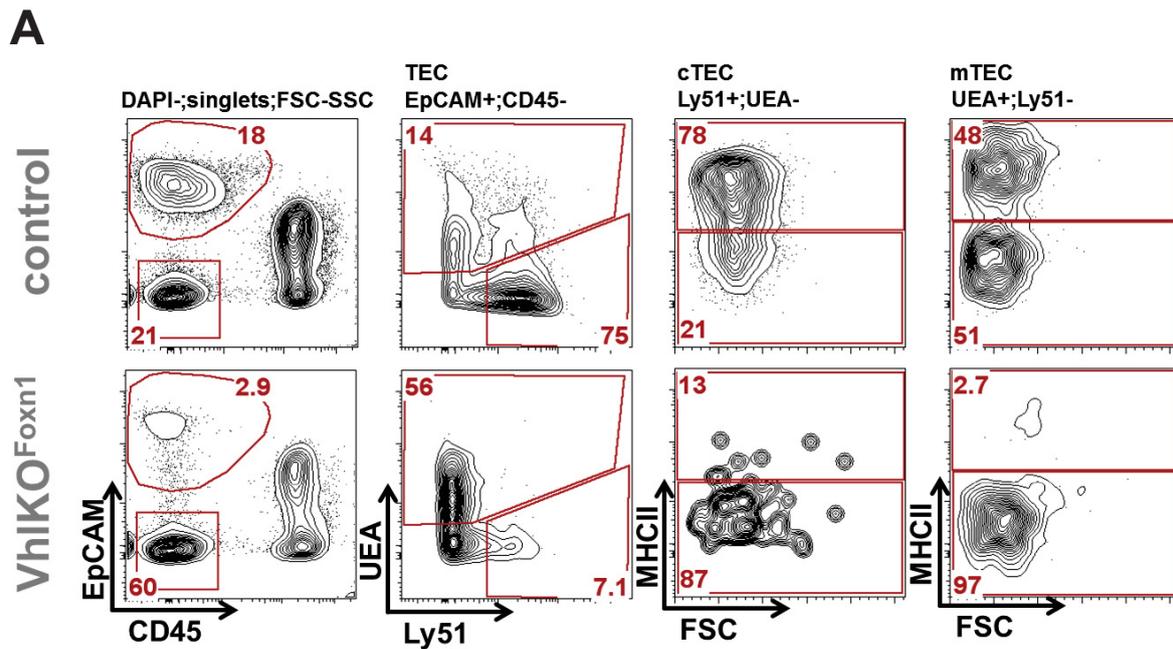
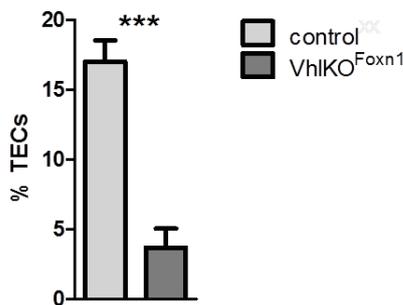
Im Weiteren wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Hilfe von Antikörpern gegen die epithelialen Marker EpCAM und *pan-Cytokeratin* (*panCK*) an Kryoschnitten durchgeführt. Die Thymusanlagen der VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Embryonen zeigten im Vergleich zu denen der Kontrollembryonen nur vereinzelt EpCAM- und Cytokeratin-Expression (Abb. 19). Dies sprach für eine signifikante Verminderung von TECs innerhalb der VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Thymi. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden die Thymusanlagen von weiteren E15,5-Embryonen verdaut (Shakib et al., 2009; Zuklys et al., 2009) und durchflusszytometrisch analysiert. In Übereinstimmung mit den histologischen Daten war der relative Anteil von EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> TECs in VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Thymi um das 4,6-fache vermindert (Abb. 20 A,B). Parallel wurde die Differenzierung in kortikale (UEA<sup>-</sup>Ly51<sup>+</sup>) und medulläre (UEA<sup>+</sup>Ly51<sup>+</sup>) Thymusepithelzellen und deren terminale Differenzierung mittels MHCII Expressionsanalyse untersucht. Die

Kontrollen wiesen einen großen Anteil an TECs auf, der mit MHCII-Expressionen auf cTECs und mTECs verbunden war. Dagegen zeigten  $VhIKO^{Foxn1}$ - Mäuse einen geringen Anteil an TECs auf. Es waren kaum cTECs vorhanden, die zudem kein MHCII exprimierten.



**Abbildung 19** Die Thymusanlagen von E15,5  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen zeigten nur vereinzelt Expression der epithelialen Marker EpCAM und pan-CK.

Kryo-Transversalschnitte der oberen Thoraxregion von  $VhIKO^{Foxn1}$ - (E15,5) und Kontrollembryonen wurden mit Hilfe Fluorophor-konjugierter Antikörper gegen EpCAM und pan-CK gefärbt und fluoreszenz-mikroskopisch betrachtet; Abbildung links, EpCAM; Mitte, overlay panCK mit DAPI-Kernfärbung; rechts panCK ohne DAPI; repräsentative Abbildungen für n=3 Kontrollen und n=4  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen; control,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $VhIKO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ; Maßstabsbalken 0,2mm (10x), 0,1mm (20x)

**B**

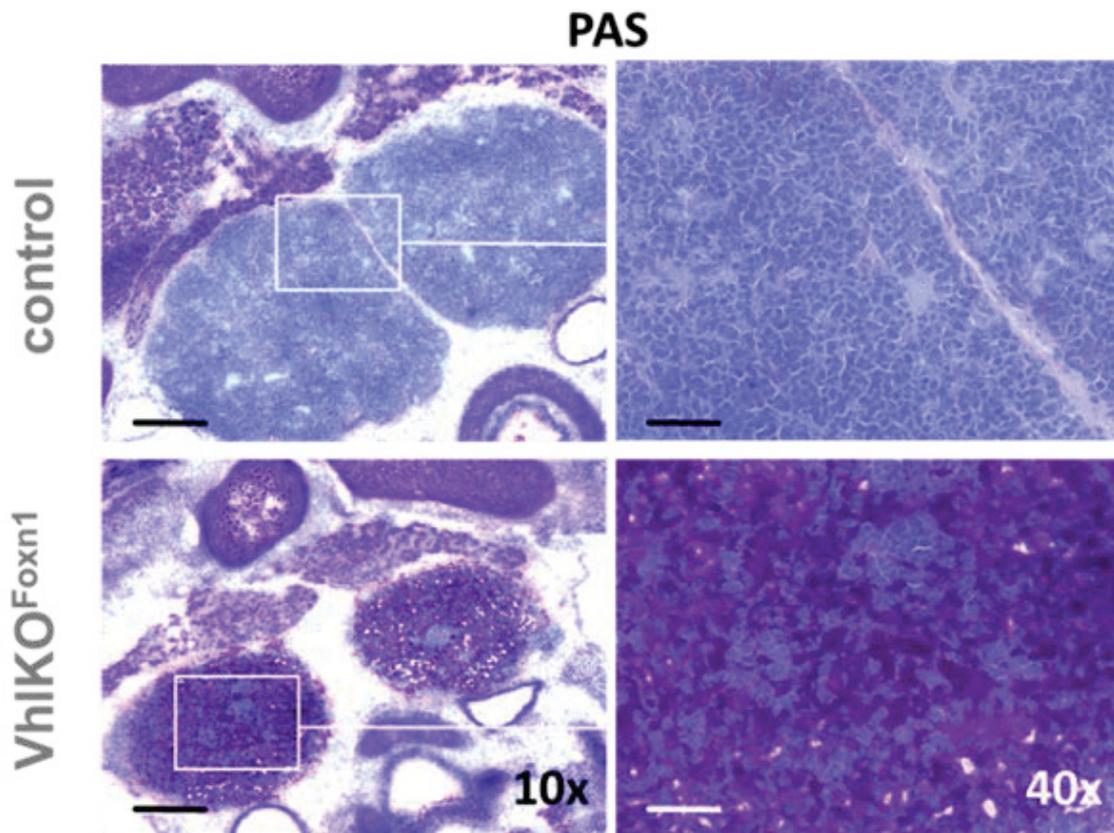
**Abbildung 20** Den Thymusanlagen von E15,5-VhIKO<sup>Foxn1</sup> Embryonen fehlen cTEC-primed *default*-Progenitoren, sowie die Expression von MHC Klasse II-Molekülen.

Für die detaillierte Analyse der TEC-Subpopulationen wurden die enzymatisch verdauten Thymusanlagen von E15,5 VhIKO<sup>Foxn1</sup>- und Kontroll-Embryonen mit anti-EpCAM, -CD45, -Ly51, -MHCII und UEA gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentative Contour plots der durchflusszytometrischen Analyse für insgesamt (n=3) Kontrollen und (n=6) VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Embryonen; im Anhang (Abb. 45) befindet sich eine Zusammenstellung der Contour plots aus der Analyse; (B) graphische Darstellung der relativen Anteile an TECs von (n=3) Kontroll- und (n=6) VhIKO<sup>Foxn1</sup>-(E15,5) Embryonen; control, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; VhIKO<sup>Foxn1</sup>, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/cre</sup>; \*\*\* p < 0.001.

Insgesamt gesehen kommt es in VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen zur Ausbildung einer rudimentären Thymusanlage, in der die Anzahl reifer TECs deutlich reduziert ist und im verringerten Maße durch hämatopoetische Progenitoren besiedelt ist.

## 6.8 Einfluss des *Vhl*-Verlustes auf den Einbau von Glykogen in die embryonale Thymusanlage

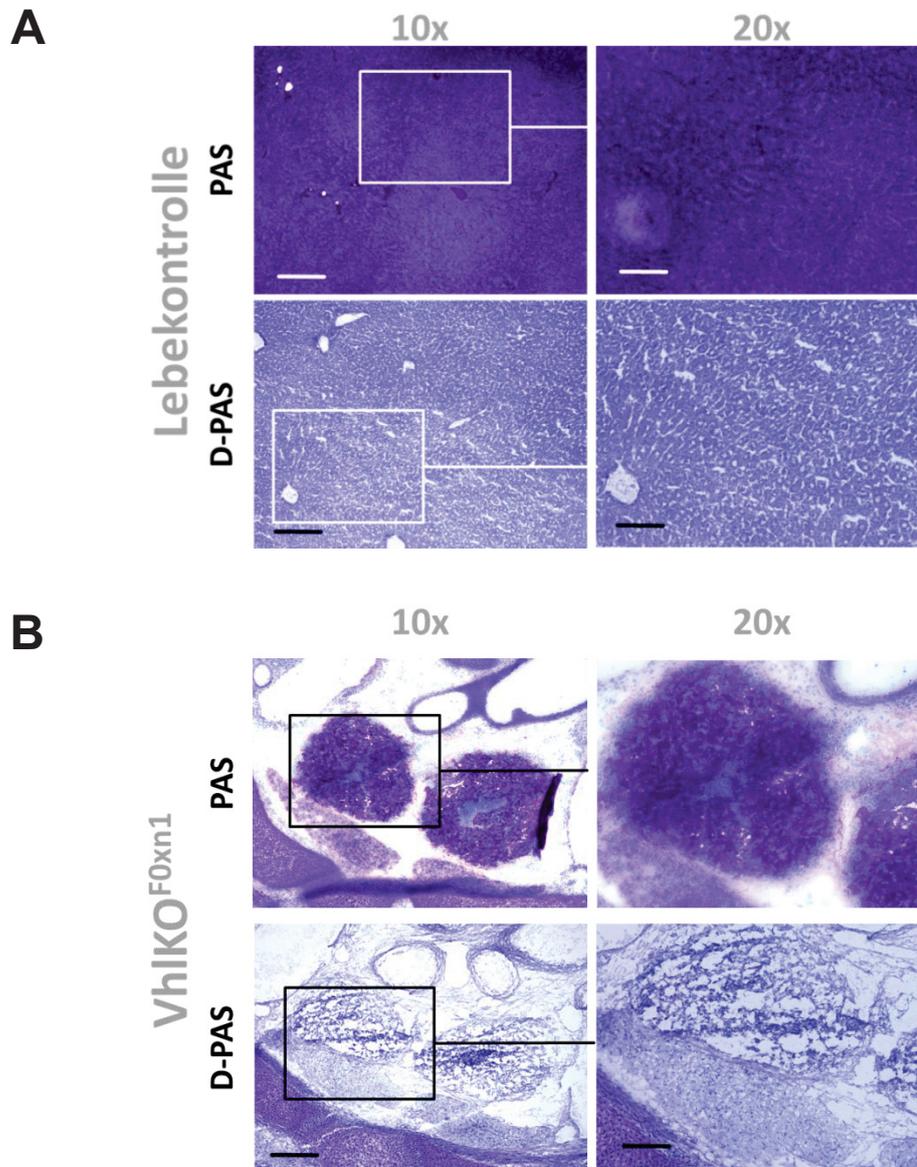
Das Fehlen einer zellulären HE-Färbung in histologischen Schnitten kann mit der Akkumulation von Glykogen einhergehen. Ein Verlust der pVHL-Expression in anderen zellulären Systemen wie dem Nierenzellkarzinom oder der Leber-spezifische Verlust von *Vhl* können zur zellulären Akkumulation von Glykogen führen. Dies könnte dementsprechend auch in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Thymusanlagen, die in HE-gefärbten Schnitten ungefärbte Bereiche enthalten (Abb. 18), der Fall sein. Kohlenhydrate wie Glykogen und Mukopolysaccharide können mit Hilfe der PAS-Färbung dargestellt werden (Emile et al., 2001). Der Nachweis, dass es sich bei den Einlagerungen um Glykogen handelt erfolgt über die Vorbehandlung der Schnitte mit  $\alpha$ -Amylase (Diastase). Zunächst wurden Kryo-Transversalschnitte der oberen Thoraxregion der Embryonen in der PAS-Reaktion gefärbt und mit Kontrollschnitten verglichen.  $VhIKO^{Foxn1}$  Thymusanlagen waren stark PAS-positiv, die Kontrollen dagegen PAS-negativ (Abb. 21). Nach Vorbehandlung der  $VhIKO^{Foxn1}$ - Schnitte mit  $\alpha$ -Amylase konnte in der anschließenden PAS-Reaktion keine positive Anfärbung erreicht werden (Abb. 22 B). Dieses wies auf die starke Einlagerung von Glykogen in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Thymusanlagen hin.



**Abbildung 21** In den Thymusanlagen von E15,5  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen liegt eine starke Akkumulation von Kohlenhydraten vor.

In der Perjodsäure-Schiff'sche Reaktion (PAS-Färbung) an Transversalschnitten der E15,5-Versuchsembryonen zeigten sich die  $VhIKO^{Foxn1}$ -Thymusanlagen stark PAS-positiv, die Kontrollen

waren PAS-negativ. Die Abbildungen rechts zeigen Ausschnittsvergrößerungen. Maßstabsbalken 0,2 mm (10x), 0,05 mm (40x); control,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $VhIKO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ .



**Abbildung 22 Die Thymusanlagen von E15,5  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen zeigen starke Glykogeneinlagerungen.**

Glykogen wird durch Diastase in die wasserlöslichen Abbauprodukte Maltose und Dextrose abgebaut. Der Nachweis von Glykogeneinlagerungen erfolgte über die Vorbehandlung der Kryoschnitte mit Diastase und anschließender PAS-Färbung. Leberkontrollschnitte (A) und Kryoschnitte von  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen (B) wurden PAS oder D-PAS gefärbt; Repräsentative Abbildungen für insgesamt n=3 Kontroll- und n=4  $VhIKO^{Foxn1}$ -Embryonen; control,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $VhIKO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ .

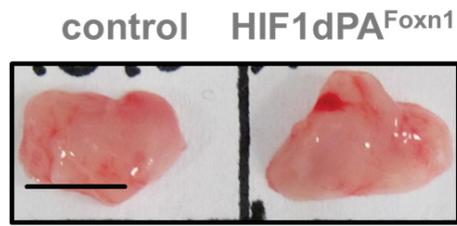
## 6.9 Einfluss der Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF1 $\alpha$ -Variante auf die T-Zell- und TEC-Entwicklung

Die bisher erhobenen Daten erlaubten die Annahme, dass pVHL innerhalb von TECs eine essentielle Rolle für die Entwicklung der Thymusanlage hat. Der in  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäusen entstandene veränderte Phänotyp des Thymus könnte durch verschiedene Mechanismen entstanden sein. pVHL ist neben der Regulation von HIFs als Adaptorprotein an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt und reguliert verschiedene transkriptionsabhängige als auch -unabhängige zelluläre Vorgänge. Die zentrale Funktion von pVHL ist seine Rolle als negativer Regulator der *Hypoxia-inducible factors* (HIF; HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ ). Demnach könnte die fehlende negative Regulation von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  die wahrscheinlichste Ursache für die Ausprägung des athymischen Phänotyps in  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäusen sein.

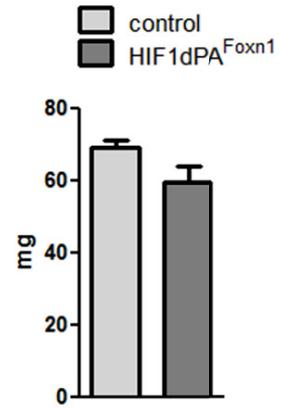
Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine TEC-spezifische Überexpression von HIF1 $\alpha$  zu einem dem  $VhlKO^{Foxn1}$ -Thymus entsprechenden Phänotyp führt. Um die Situation einer thymusepithel-spezifischen HIF1 $\alpha$ -Überexpression zu untersuchen wurden Mäuse generiert, in denen durch die *Foxn1-Cre* vermittelte Deletion eines in den ROSA-Lokus integrierten STOP-Elementes eine nicht hydroxylierbare und damit nicht abbaubare HIF1 $\alpha$ -Variante exprimiert wird ( $Rosa26^{+/loxP;Hif1dPA};Foxn1^{+/cre}$  hier HIF1dPA $^{Foxn1}$ ). HIF1dPA $^{Foxn1}$ -Thymi unterschieden sich nicht von den Thymi der Kontrolltiere ( $Rosa26^{+/loxP;Hif1dPA};Foxn1^{+/+}$ ) (Abb. 23 A,B). Auch die HIF1dPA $^{Foxn1}$ -TECs unterschieden sich nicht von den Kontroll-TECs (Abb. 23 C,D). Dementsprechend zeigte sich auch die HIF1dPA $^{Foxn1}$ -T-Zellentwicklung nicht verändert (Abb. 23 E,F).

Zusammenfassend zeigten HIF1dPA $^{Foxn1}$ -Mäuse unauffällige Thymi, in denen die TEC- und T-Zellentwicklung normal war.

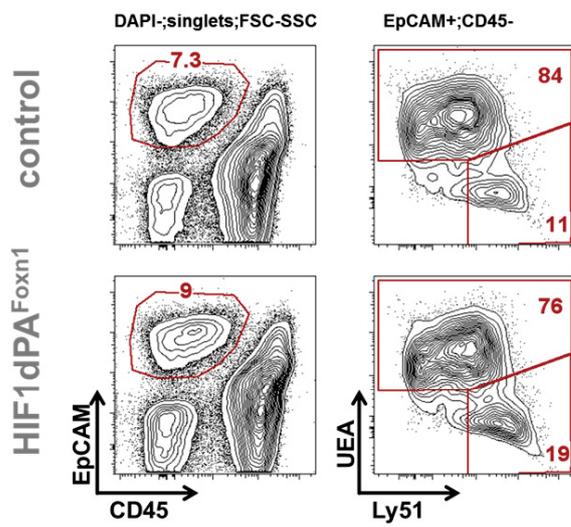
**A**



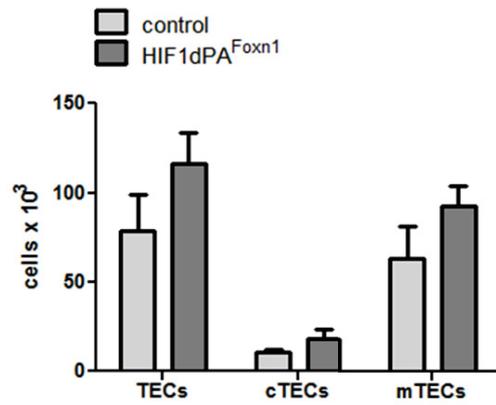
**B**



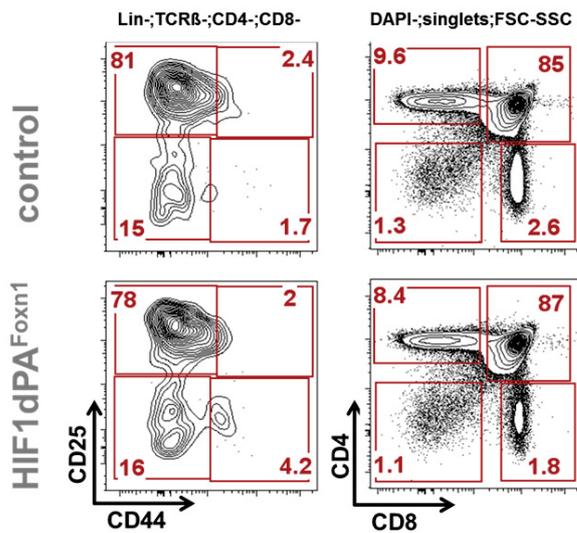
**C**



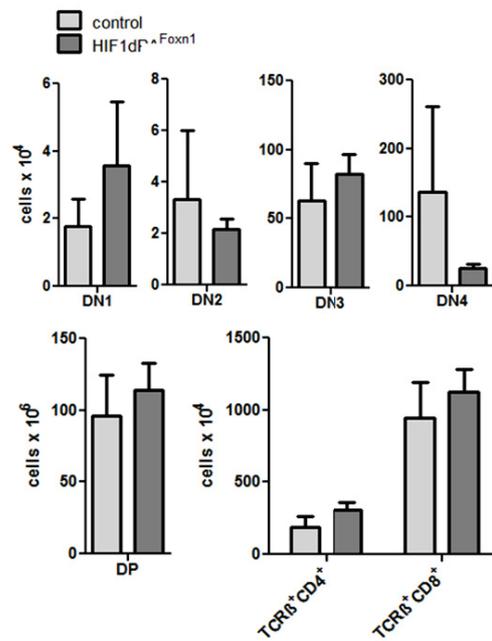
**D**



**E**



**F**

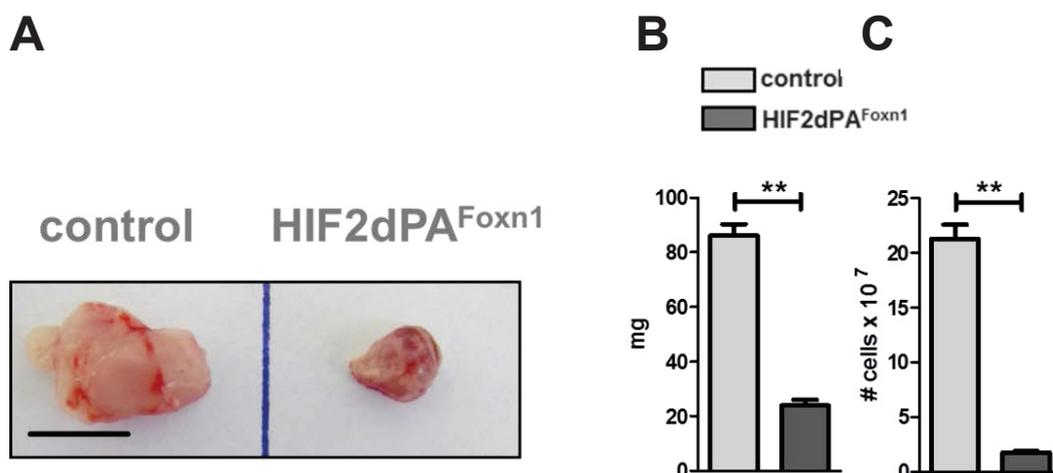


**Abbildung 23 HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäuse zeigten eine normale Thymusentwicklung.**

(A) Abbildung des Thymus einer Kontroll- und einer HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>-Maus (B) Graphische Darstellung der Thymusgewichte von (n=3) Kontrollen und (n=3) HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen. (C) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des Thymusstroma einer Kontroll- und einer HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>-Maus. EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> TECs, Ly51<sup>+</sup>UEA<sup>-</sup> cTECs, UEA<sup>+</sup>Ly51<sup>-</sup> mTECs. (D) Quantifizierung der TEC-Subpopulationen von Kontroll- (n=3) und HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen (n=3). (E) Repräsentative Contour-plots der durchflusszytometrischen Analyse der CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>DN1, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>DN2, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>DN3, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>DN4, CD4CD8DP, CD4SP und CD8SP Thymozyten. (F) Graphische Darstellung der frühen (DN1-DN4) und reifen (DP-SP) Thymozytensubpopulationen von (n=3) Kontrollen und (n=3) HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen; control, *Rosa26*<sup>+/-loxP;Hif1dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>, *Rosa26*<sup>+/-loxP;Hif1dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/-cre</sup>; Alter der Mäuse 6 Wochen; Maßstabsbalken 0,5 cm.

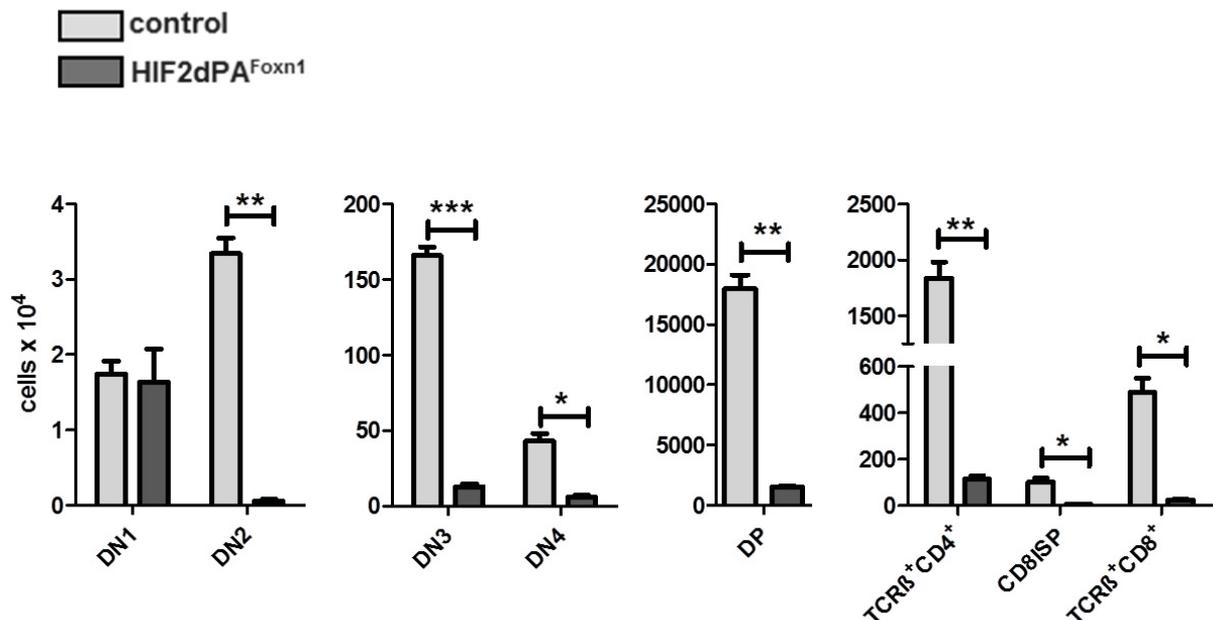
**6.10 Einfluss der *Foxn1-Cre* vermittelten Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF2 $\alpha$ -Variante auf den Thymus**

Die Vordaten ließen vermuten, dass die *Foxn1-Cre* vermittelte Überexpression von HIF1dPA keinen Einfluss auf die Thymusentwicklung hat. Neben der Expression von Hif1 $\alpha$  konnten wir auch Hif2 $\alpha$ -Expression in TECs nachweisen. Entsprechend könnte auch die fehlende negative Regulation von HIF2 $\alpha$  innerhalb von *VhIKO*<sup>Foxn1</sup>-Mäusen für die Thymusentwicklungsstörung verantwortlich sein. Um dieses zu untersuchen wurde ein ähnlicher Ansatz wie bei der HIF1 $\alpha$ -Überexpression gewählt. Es wurden Mäuse generiert, die eine HIF2 $\alpha$ -Variante exprimierten, die nicht von pVHL erkannt und somit nicht proteasomal abgebaut werden konnte (*Rosa26*<sup>+/-loxP</sup> Hif2dPA<sup>Foxn1</sup>; *Foxn1*<sup>+/-cre</sup> hier HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>). Es ist davon auszugehen, dass diese der HIF2 $\alpha$ -Stabilisierung in den *VhIKO*<sup>Foxn1</sup>-Mäusen ähnelt.

**Abbildung 24 HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäuse zeigen einen anatomisch veränderten Thymus.**

(A) Abbildung der Thymi einer Kontroll- und einer HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Maus. (B) Graphische Darstellung der Thymusgewichte und der (C) -Zellularität von (n=3) Kontrollen und (n=3) HIF2dPA-Mäusen; control, *Rosa26*<sup>+/-loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>, *Rosa26*<sup>+/-loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/-cre</sup>; Alter der Mäuse 6 Wochen; Maßstabsbalken 0,5 cm; \*\* p < 0.005.

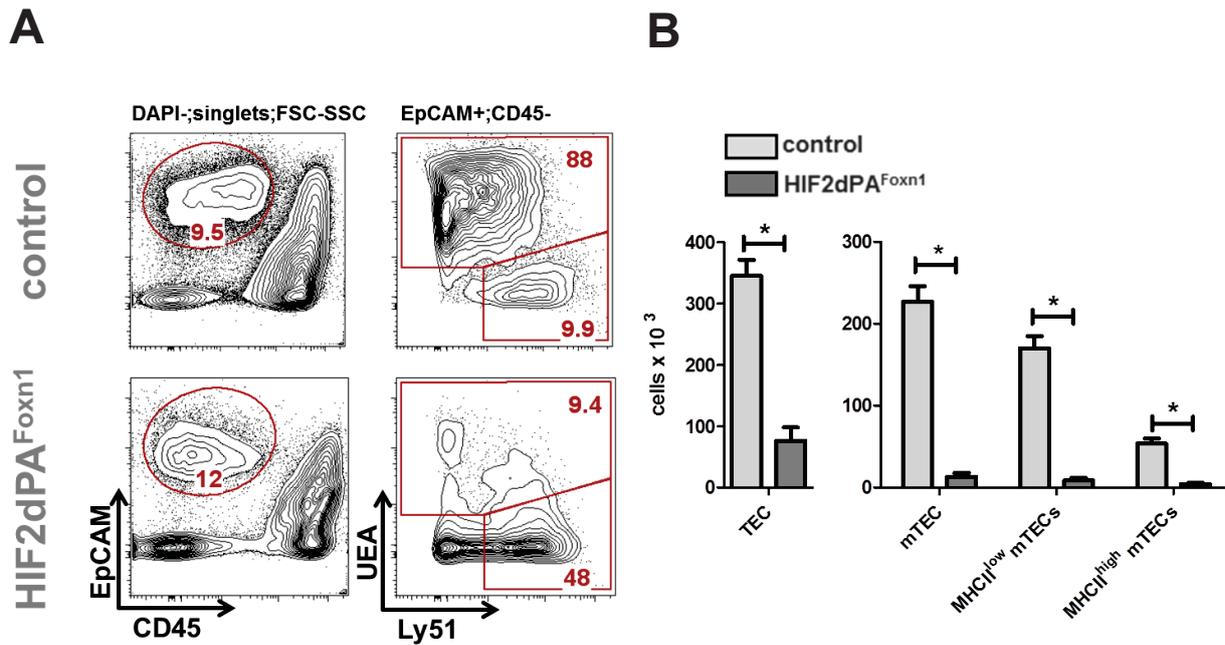
Im Gegensatz zu den HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen zeigten bei der Eröffnung des Thorax HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren (*Rosa26<sup>+/-loxP</sup>Hif2dPA<sup>Foxn1</sup>;Foxn1<sup>+/-+</sup>*) deutlich kleinere Thymi. Ausserdem waren diese signifikant leichter und hypozellulärer als die Kontrollthymi (Abb. 24 A,B). In der durchflußzytometrischen Analyse der Thymozytensubpopulationen war in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen lediglich die Gesamtzahl der den Thymus besiedelnden DN1-Vorläuferzellen unverändert. Alle weiteren zellulären Entwicklungsstadien waren im Vergleich zu den Kontrollen in ihrer absoluten Anzahl massiv reduziert (Abb. 25). Dies spricht zum einen für ein intaktes *Homing* der aus dem Knochenmark stammenden hämatopoetischen Progenitorzellen in den Thymus, zum anderen jedoch für eine ausgeprägte Störung in der Thymozytendifferenzierung und -ausreifung.



#### Abbildung 25 In HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen ist die T-Zellentwicklung gestört.

Quantifizierung der mit Hilfe der Durchflußzytometrie ermittelten Thymozyten-Entwicklungsstufen (DN1-DN4, DP, CD4SP, CD8ISP und CD8SP) von Kontroll- (n=3) und HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymi (n=3); control, *Rosa26<sup>+/-loxP</sup>Hif2dPA<sup>Foxn1</sup>;Foxn1<sup>+/-+</sup>*; HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>, *Rosa26<sup>+/-loxP</sup>Hif2dPA<sup>Foxn1</sup>;Foxn1<sup>+/-cre</sup>*; Alter der Mäuse 6 Wochen; \* p < 0.05; \*\* p < 0.005; \*\*\* p < 0.001.

In der durchflußzytometrischen Analyse der Thymusstromazellen war der relative Anteil der mTECs in den HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen verhältnismäßig gering (Abb. 26 A). Folglich waren die absoluten Zahlen der mTECs als auch der TECs insgesamt im Vergleich zu den Kontrollen stark vermindert. Innerhalb der mTECs waren weder unreife (MHCII<sup>low</sup>) noch reife (MHCII<sup>high</sup>) mTECs in relevanter Anzahl nachweisbar (Abb. 26 B).

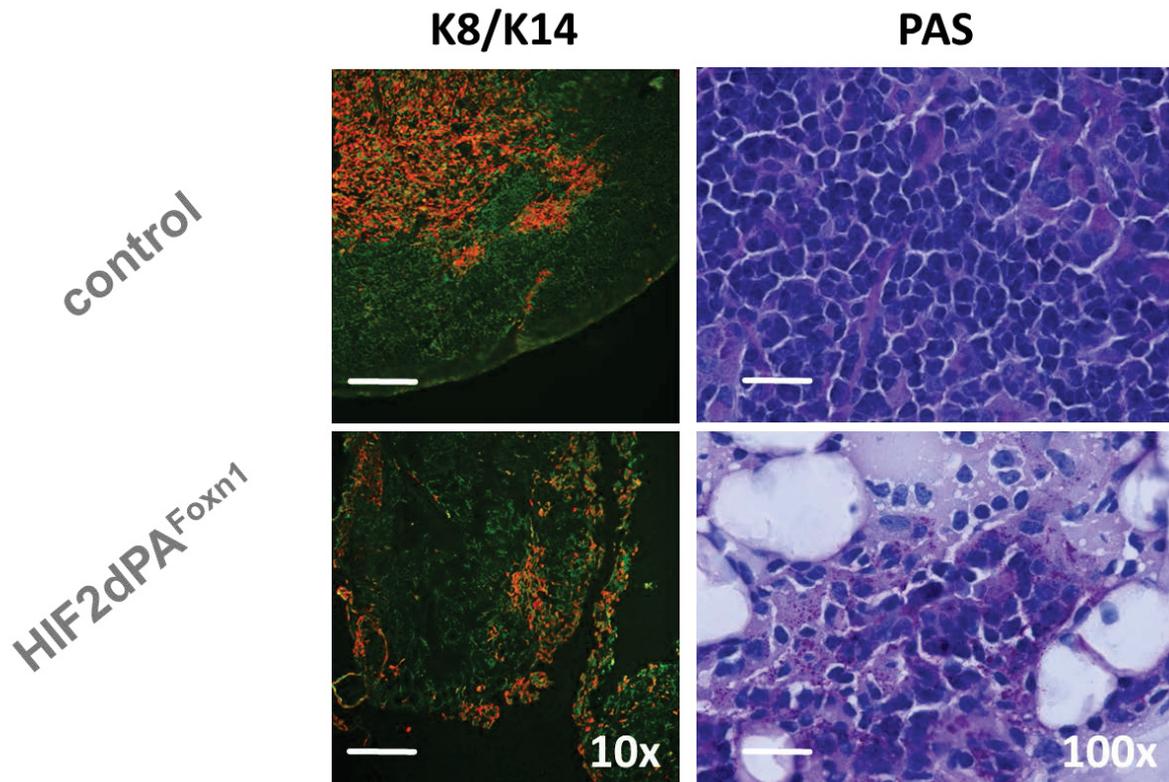


**Abbildung 26** In HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen ist das medulläre TEC-Kompartiment nur rudimentär vorhanden.

(A) Contour-plots der durchflusszytometrischen Analyse der Thymusstromazellen einer Kontrolle und einer HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Maus; EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> TECs, Ly51<sup>+</sup>UEA<sup>-</sup> cTECs, UEA<sup>+</sup>Ly51<sup>-</sup> mTECs. (B) Graphische Darstellung der Gesamt-TECs, mTECs, der reifen MHCII<sup>high</sup> und unreifen MHCII<sup>low</sup> mTECs; Kontrollen (n=3), HIF2dPA<sup>Foxn1</sup> (n=3); control, *Rosa26*<sup>+/-loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>, *Rosa26*<sup>+/-loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/-cre</sup>; Alter der Mäuse 6 Wochen; \* p< 0.05.

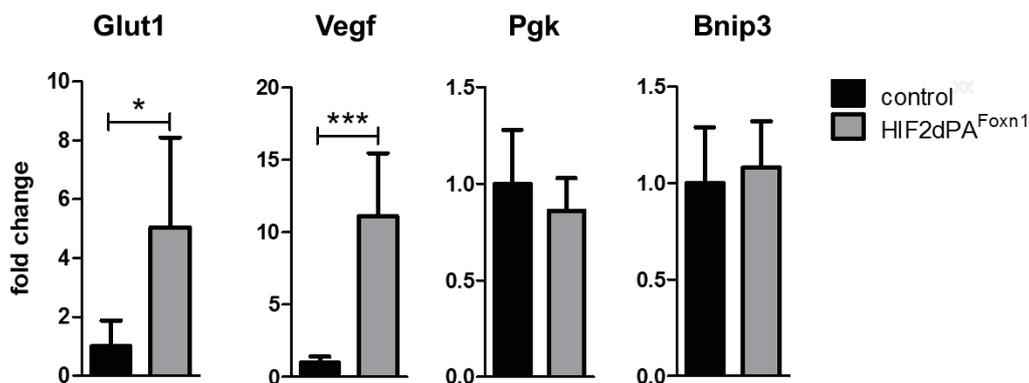
Neben den starken Veränderungen in der Zusammensetzung der Thymusepithel- und Thymozytensubpopulationen konnten in der histologischen Analyse der HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymi große Zysten beobachtet werden. Dies ließ Veränderungen in der Thymusorganstruktur vermuten. Daher wurden Gewebeschnitte mit Hilfe von K8- und K14-Antikörpern gegen kortikale und medulläre Thymusepithelstrukturen gefärbt und immunfluoreszenztechnisch analysiert. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Schnitten eine ungeordnete Verteilung der K8<sup>+</sup> kortikalen TECs und der K14<sup>+</sup> medullären TECs beobachtet werden (Abb. 27).

Nachfolgend wurden PAS-Färbungen an HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>- und Kontroll-Thymi durchgeführt, um zu untersuchen, ob es ähnlich wie in *VhIKO*<sup>Foxn1</sup>-Thymusanlagen zu einer vermehrten Einlagerung von Kohlenhydraten kam. In den Gewebeschnitten der HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymi konnte innerhalb der veränderten Organstrukturen vereinzelt Magenta-rote (PAS-positive) Areale beobachtet werden (Abb. 27). Die Kontrollen waren PAS-negativ.



**Abbildung 27** HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymi zeigen eine abnormale Organstruktur mit vermehrt Kohlenhydrateinlagerungen.

Immunfluoreszenz-Analyse von Kontroll- und HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymusschnitten 6 oder 18 Wochen alter Mäuse mit K8 (cTEC)- und K14 (mTEC)-Antikörpern gegen kortikale und medulläre Strukturen. In der PAS-Färbung zeigten sich in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymi vereinzelt PAS-positive, magenta-rote Areale, die Kontrollen waren negativ. Maßstabsbalken 0,2 mm (10x), 0,02 mm (100x) Repräsentative Abbildungen für (n=4) Kontrollen und (n=4) HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymi; control, *Rosa26*<sup>+loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>, *Rosa26*<sup>+loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/cre</sup>.



**Abbildung 28** Die *Foxn1*-Cre vermittelte Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF2α-Variante führte zur Induktion von den HIF-Zielgenen *Glut1* und *Vegf* in TECs.

Von 7 Wochen alten Mäusen (n=4 pro Genotyp) wurden die Thymi enzymatisch verdaut, zusammen geführt und die TECs sortiert; die Real-time-qPCR von HIF-Zielgenen erfolgte an der cDNA in

zweifach-Bestimmungen; control, *Rosa26*<sup>+loxP;Hif2dPA</sup>, *Foxn1*<sup>+/+</sup>; HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>, *Rosa26*<sup>+loxP;Hif2dPA</sup>, *Foxn1*<sup>+cre</sup>; \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001.

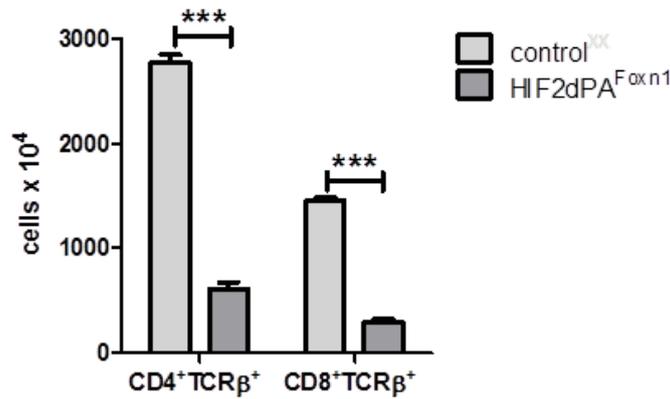
Um zu überprüfen, ob es in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-TECs zur Aktivierung von HIF2α-Zielgenen kam, wurde mit der cDNA sortierter TECs Genexpressionsanalysen durchgeführt. In HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-TECs war die Expression von *Glut1* 5-fach und *Vegf* 11-fach gegenüber den Kontrollen hochreguliert. Die Expression der HIF1α-Zielgene *Pgk* und *Bnip3* blieb unverändert (Abb. 28).

Zusammenfassend kam es in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen zu ausgeprägten Veränderungen innerhalb des Thymus. Die anatomische Grundordnung in kortikale und medulläre Strukturen war nicht mehr vorhanden und innerhalb der TECs kam es zu einem fast kompletten Fehlen der medullären Subpopulation. Zudem waren HIF2α-Zielgene innerhalb von TECs überexprimiert und es war, wie in VhKO<sup>Foxn1</sup>-Thymi, eine gesteigerte Kohlenhydrateinlagerung zu beobachten. Diese massiven Veränderungen der Thymusanatomie und der TECs gingen mit einer deutlich verminderten T-Zellentwicklung einher.

### **6.11 Die *Foxn1-Cre* vermittelte Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF2-Variante führt zu drastischen Veränderungen im peripheren T-Zellkompartiment**

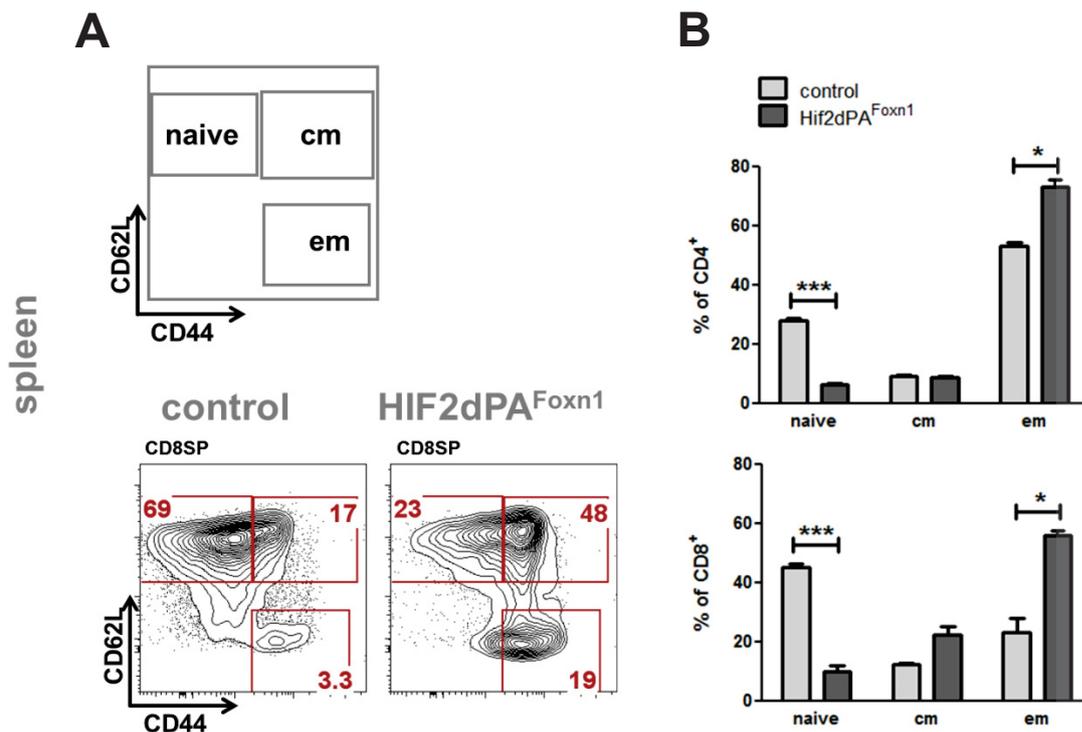
Es war anzunehmen, dass die fast komplette Abwesenheit von mTECs und die damit verbundene anatomische Fehlstrukturierung des Thymus in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen auch mit Veränderungen des peripheren T-Zell-Kompartimentes einhergehen. In Übereinstimmung mit der verminderten T-Zellentwicklung war innerhalb der HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Milzen die Anzahl von CD4<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> T-Zellen vermindert (Abb. 29).

Medulläre TECs spielen bei der Negativselektion potentiell autoreaktiver T-Zellen eine zentrale Rolle. Demnach könnte das Fehlen von mTECs innerhalb von HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymi zu einer Beeinträchtigung der thymischen Negativselektion führen. Das Vorhandensein von autoreaktiven T-Zellen geht mit der Aktivierung, Expression und Ausdifferenzierung dieser Zellen einher. Damit sinkt der Anteil *naiver* T-Zellen (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) und der Anteil differenzierter *effector memory* T-Zellen (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) steigt verhältnismäßig an. Bemerkenswerterweise war innerhalb von HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Milzen der relative Anteil *naiver* T-Zellen vermindert, während der relative Anteil von *effector memory* T-Zellen erhöht war (Abb. 30).



**Abbildung 29** In HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen liegt das periphere reife Milz-T-Zellkompartiment vermindert vor.

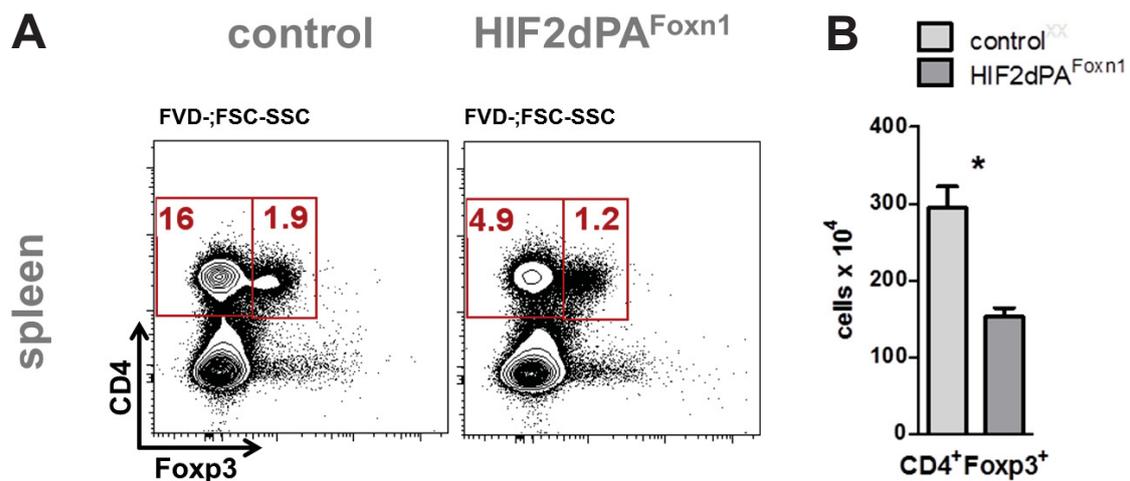
Graphische Darstellung der Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> Milz-T-Zellen von (n=5) Kontrollen und (n=5) HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen; control, *Rosa26*<sup>+loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>, *Rosa26*<sup>+loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>; Alter der Mäuse 8 Wochen; \*\*\* p < 0.001.



**Abbildung 30** HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäuse zeigen den Verlust von naiven T-Zellen und ein aktiviertes Effektor-Gedächtnis-T-Zell-Kompartiment.

(A) Contour-plots der durchflusszytometrischen Analyse einer Kontroll- und einer HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Milz zur Ermittlung der naiven (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>), zentralen Gedächtnis- (*central memory*, *cm*, CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory*, *em*, CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) innerhalb der CD8SP-Zellen sowie (B) graphische Darstellung der relativen Anteile innerhalb der CD4SP und CD8SP-Zellen; Kontrollen (n=5) und HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Milzen (n=5); control, *Rosa26*<sup>+loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>, *Rosa26*<sup>+loxP;Hif2dPA</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>; Alter der Mäuse 8 Wochen; \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001.

Zusätzlich zu der Rolle bei der Negativselektion fördern und regulieren mTECs die Produktion von sogenannten natürlichen regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ). Dementsprechend wurde in Kooperation mit Prof. Ulf Dittmer (Institut Virologie, Universitätsklinikum Essen) eine Analyse der peripheren  $T_{\text{regs}}$  durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der peripheren  $T_{\text{regs}}$  ( $CD4^+Foxp3^+$ ) innerhalb der Milz von  $HIF2dPA^{Foxn1}$ -Mäusen um 50% vermindert war (Abb. 31).



**Abbildung 31** Die nahezu komplette Abwesenheit des mTEC-Kompartimentes in  $HIF2dPA^{Foxn1}$ -Mäusen ging konform mit dem Verlust an regulatorischen  $CD4^+Foxp3^+$  T-Zellen in der Milz.

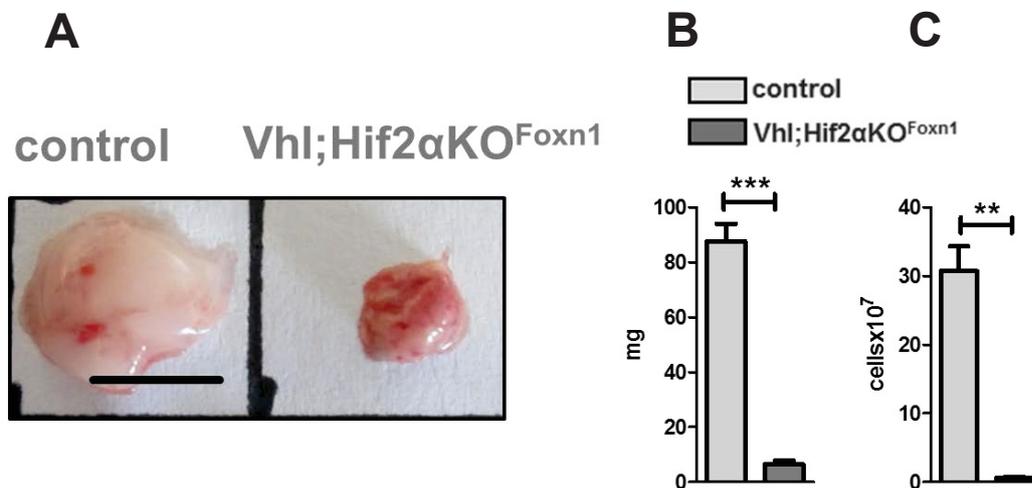
(A) Contour-plots der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der  $CD4^+Foxp3^+$   $T_{\text{regs}}$  einer Kontrolle und eines  $HIF2dPA^{Foxn1}$ -Milz. (B) Graphische Darstellung der  $CD4^+Foxp3^+$   $T_{\text{reg}}$  - Gesamtzahlen in der Milz; Kontrollen (n=5),  $HIF2dPA^{Foxn1}$  (n=5); control,  $Rosa26^{+/loxP;Hif2dPA}$ ,  $Foxn1^{+/+}$ ;  $HIF2dPA^{Foxn1}$ ,  $Rosa26^{+/loxP;Hif2dPA}$ ,  $Foxn1^{+/cre}$ ; Alter der Mäuse 8 Wochen; \* p < 0.05.

In Zusammenschau zeigte sich, dass es in  $HIF2dPA^{Foxn1}$ -Mäusen zu schwerwiegenden Veränderungen des peripheren T-Zell-Kompartimentes kam. Neben dem Verlust an peripheren reifen T-Zellen der Milz, zeigte sich eine relative Steigerung an *effector memory* T-Zellen und eine Verminderung von peripheren  $T_{\text{regs}}$ .

## 6.12 Einfluss der *Foxn1-Cre* vermittelten Deletion von *Hif2α* und *Vhl* auf die Entwicklung des Thymus und die T-Zellentwicklung

Durch pVHL werden HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  negativ reguliert. Die vorangehenden Daten liessen den Schluss zu, dass die *Foxn1-Cre* vermittelte HIF2 $\alpha$ -Überexpression, aber nicht die Überexpression von HIF1 $\alpha$  zu einer gestörten Thymusentwicklung führt. Dies könnte dafür sprechen, dass pVHL vornehmlich für die negative Regulation von HIF2 $\alpha$  und nicht von HIF1 $\alpha$  innerhalb des Thymus benötigt wird.

Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob die *Foxn1-Cre* vermittelte *Hif2α*-Inaktivierung zusätzlich zur *Vhl*-Inaktivierung in der Lage ist, die Thymusaplasie der *Vhl*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse zu retten. Hierfür wurden *Hif2α*-gefloxt Allele in das *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup>-Modell eingekreuzt, um *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup>-Mäuse (hier *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>) zu generieren.

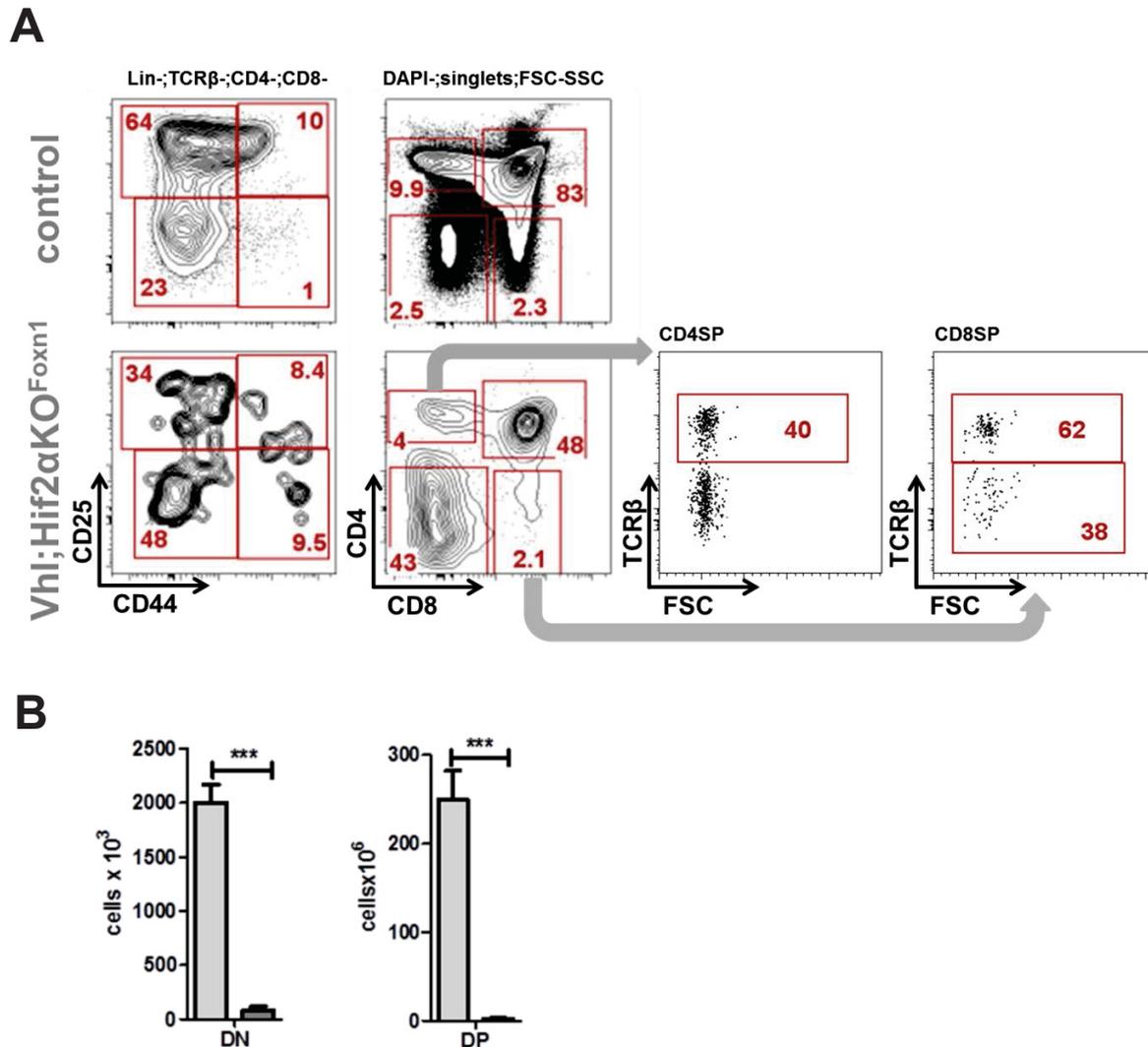


**Abbildung 32 *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse zeigen kleine Thymi.**

(A) Abbildung exemplarischer Thymi einer Kontroll- und einer *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Maus. Graphische Darstellung der (B) Thymusgewichte und (C) -Zellularitäten; Kontrollen (n=4) und *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse (n=4); Alter der Mäuse 6 Wochen; control, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+/+</sup>; *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup>; Maßstabsbalken 0,5 cm; \*\* p < 0.005; \*\*\* p < 0.001.

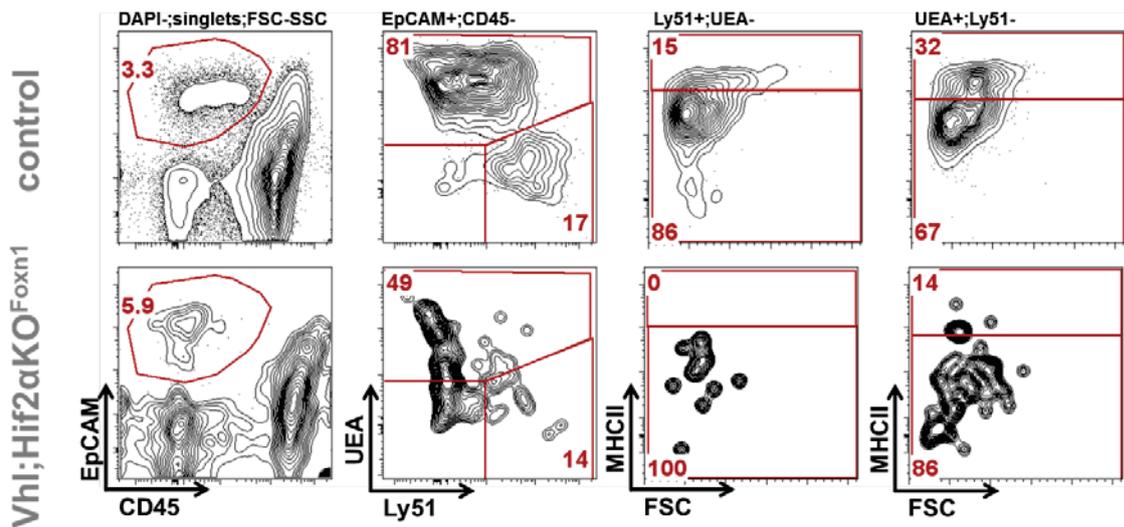
*Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse zeigten einen Thymus. Dieser war im Vergleich zu den Kontrollmäusen (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+/+</sup>) deutlich kleiner (Abb. 32 A). Gewicht und Zellularität waren stark vermindert (Abb. 32 B,C). In der Analyse der T-Zellentwicklungsstudien zeigte sich, dass im Gegensatz zu *Vhl*KO<sup>Foxn1</sup>-Thymi CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>DP sich in erwachsenen *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Thymi entwickeln konnten (Abb. 33 A und siehe Anhang). Insgesamt ließen sich alle T-Zell-Entwicklungsvorstufen innerhalb des Thymus nachweisen, jedoch war deren Vorkommen um mehr als das 20-fache vermindert (Abb. 33 B). Entsprechend ließen sich auch EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>TECs nachweisen, deren Ausdifferenzierung in reife MHCII<sup>+</sup>Ly51<sup>+</sup>cTECs und MHCII<sup>+</sup>UEA<sup>+</sup>mTECs deutlich vermindert war (Abb. 34).

Die histologische Analyse ergab, dass die  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Thymi von Arealen mit Fettzellen durchzogen waren. Entsprechend war, ähnlich wie in  $HIF2dPA^{Foxn1}$ -Thymi, die normale Thymusstruktur mit  $K8^+cTEC$ - und  $K14^+mTEC$ -Arealen aufgehoben (Abb. 35). Vergleichbar mit den  $VhlKO^{Foxn1}$  rudimentären embryonalen Thymusanlagen konnte in  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Thymi eine positive PAS-Anfärbung nachgewiesen werden (Abb. 35).



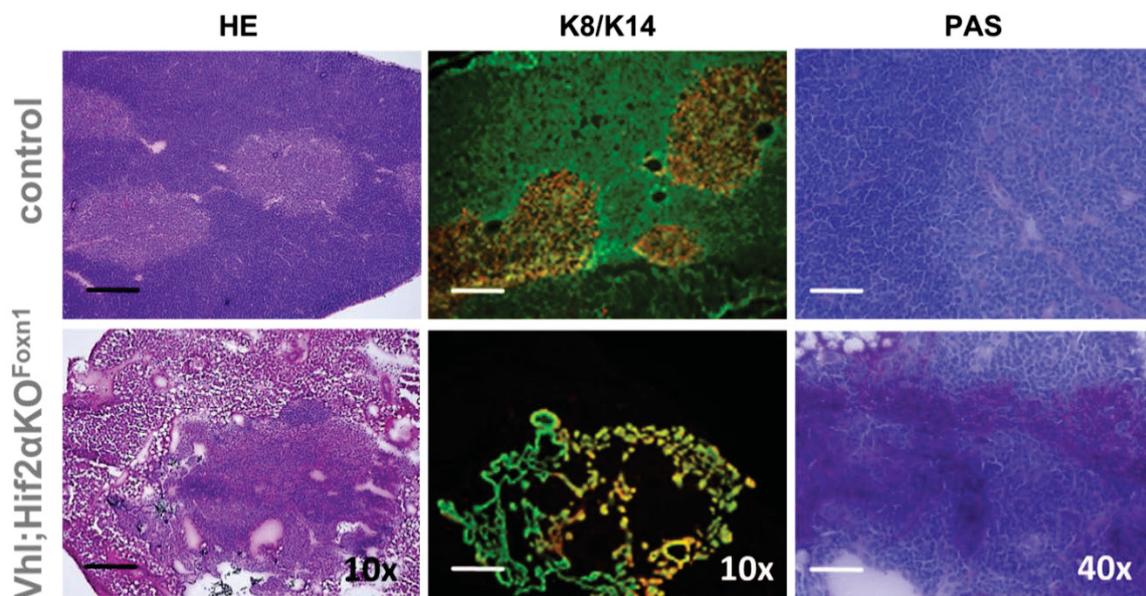
**Abbildung 33 In  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäusen ist die Thymozytenentwicklung partiell gerettet.**

(A) Contour-Plots der durchflusszytometrischen Analyse der  $CD44^+CD25^+DN1$ ,  $CD44^+CD25^+DN2$ ,  $CD44^+CD25^+DN3$ ,  $CD44^+CD25^+DN4$ ,  $CD4CD8DP$ ,  $CD4SP$  und  $CD8SP$  Thymozyten zeigen in allen  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Thymi das Vorhandensein dieser Entwicklungsstufen. Eine Aufstellung weiterer Contour plots befindet sich im Anhang (Abb. 46). (B) Quantifizierung der  $CD4CD8DN$ - und  $CD4CD8DP$ -Thymozyten; Alter der Mäuse 6 Wochen; (n=4) Kontrollen und (n=4)  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäuse; control,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Abbildung 34** In *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*-Mäusen ist das TEC-Kompartiment geringfügig wieder hergestellt.

Contour plots der durchflusszytometrischen Analyse der Thymusstromazellen einer Kontrollmaus und einer *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*-Maus. Innerhalb der wenigen EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>TECs waren in *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*-Mäusen nur wenige Ly51<sup>+</sup>UEA<sup>-</sup>mTECs und UEA<sup>+</sup>Ly51<sup>-</sup>mTECs nachweisbar; repräsentativ für (n=4) Kontrollen und (n=4) *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*-Mäuse; control, *Vhl<sup>loxP/loxP</sup>;Hif2α<sup>loxP/loxP</sup>;Foxn1<sup>+/+</sup>*; *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*, *Vhl<sup>loxP/loxP</sup>;Hif2α<sup>loxP/loxP</sup>;Foxn1<sup>+/cre</sup>*; Alter der Mäuse 6 Wochen.

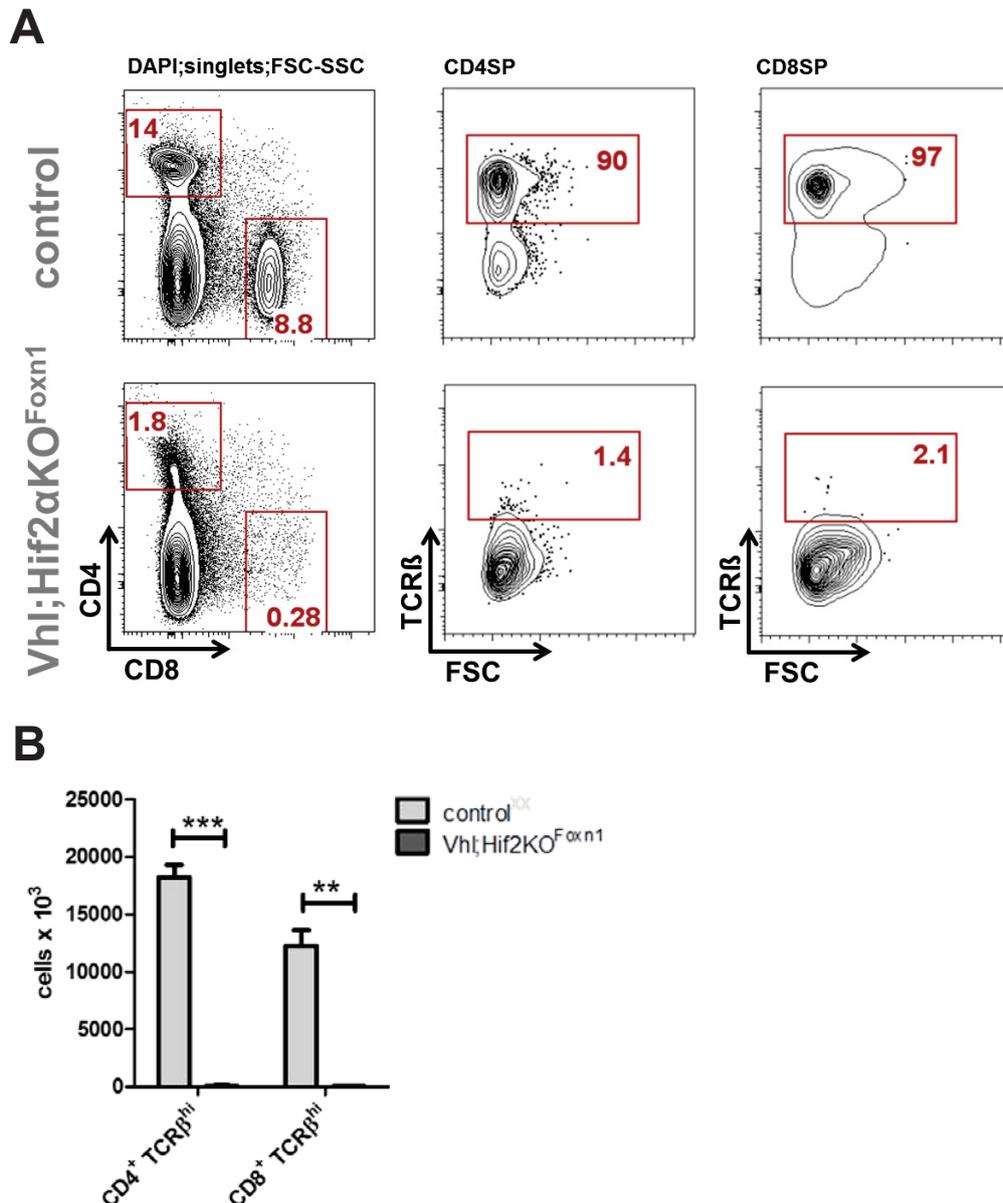


**Abbildung 35** Die Thymi von *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*-Mäusen zeigten in histologischen Untersuchungen eine abnormale Thymusstruktur.

Kryo-konservierte Thymusschnitte von Kontrollen und *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*-Mäusen wurden HE-Übersichtsgefärbt und immunfluoreszenz-technisch mit K8- und K14-Antikörpern gegen kortikale und medulläre Strukturen und PAS-gefärbt. *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*-Thymi zeigten eine abnormale Thymusstruktur mit zentral gelegenen Thymus-ähnlichen Strukturen und starken Kohlenhydrateinlagerungen. Repräsentativ für (n=3) Kontrollen und (n=3) *Vhl;Hif2α<sup>Foxn1</sup>*-Thymi;

control,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif2a^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $Vhl;Hif1\alpha KO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif2a^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ;  
 Maßstabsbalken 0,2 mm (10x), 0,05 mm (40x).

Um die Effizienz der thymischen T-Zell-Produktion abzuschätzen, wurden die Milzen der  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäuse auf  $CD4^+TCR\beta^+$  und  $CD8^+TCR\beta^+$  T-Zellen analysiert. Hierbei wurden sehr wenige dieser reifen T-Zellen nachgewiesen (Abb. 36 A,B). Diese Daten sind vergleichbar mit denen der  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäuse (Abb.13).



**Abbildung 36** In  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäusen ist der reife periphere T-Zellpool in der Milz nicht gerettet.

(A) Contour plots der durchflusszytometrischen Analyse der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Milz-T-Zellen sowie, innerhalb dieser, der reifen  $TCR\beta^+$ -Zellen einer Kontrolle und einer  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Maus. (B) Graphische Darstellung der Gesamtzahlen der reifen  $TCR\beta^+$  peripheren T-Zellen in der Milz von (n=4)  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäusen und (n=4) Kontrollmäusen; control,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif2a^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $Vhl;Hif1\alpha KO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif2a^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ; \* p < 0.05.

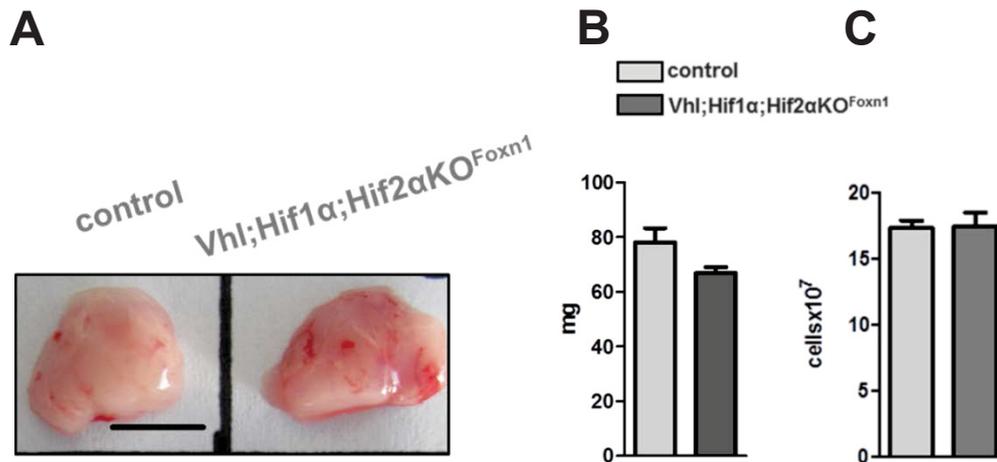
Zusammengefasst fand in  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Thymi auf quantitativ niedrigem Niveau T-Zell-Vorläuferdifferenzierung statt. Dazu fanden sich wenige cTECs und mTECs. Die normale Thymusorganstruktur war aufgehoben und ging mit Kohlenhydrateinlagerungen einher. Das reife T-Zellkompartiment der Milz war nahezu komplett abwesend.

### **6.13 Einfluss der *Foxn1*-Cre vermittelten Deletion von *Hif1α* und *Hif2α* im *Vhl*-defizienten Hintergrund in TECs auf die Entwicklung des Thymus**

Sowohl die Untersuchungen der  $VhlKO^{Foxn1}$ - als auch die der  $HIF2dPA^{Foxn1}$ -Mäuse ließen vermuten, dass pVHL für die negative Regulation von HIF2α essentiell sein könnte. Die Vermutung wurde durch die inkomplette Rettung des adulten Thymus innerhalb von  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäusen bestärkt. Der Thymus dieser Mäuse war jedoch verkleinert und wies Einlagerungen von Kohlenhydraten auf (Abb. 35), was einen Hinweis auf eine HIF1α-vermittelte Steigerung der Glukoneogenese darstellen könnte.

Um zu überprüfen, ob die fehlende negative Regulation von HIF1α durch pVHL die Thymusentwicklung in  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäusen ebenfalls inhibiert wurde zusätzlich zu *Hif2α* auch *Hif1α* im  $Vhl^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ -Hintergrund inaktiviert. Es wurden über mehrere Zwischenverkreuzungen schließlich  $Vhl^{loxP/loxP};Hif1\alpha^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ -Mäuse (hier  $Vhl;Hif1\alpha;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ ) und  $Vhl^{loxP/loxP};Hif1\alpha^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ -Mäuse (Kontrollen) generiert und analysiert.

Im Gegensatz zu den  $Vhl;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ - Mäusen (Abb. 32) wiesen  $Vhl;Hif1\alpha;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäuse einen von den Kontrollen makroskopisch nicht zu unterscheidenden Thymus auf (Abb. 37). Korrespondierend mit der normalen Thymusgröße war auch die T-Zellentwicklung innerhalb des Thymus von  $Vhl;Hif1\alpha;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$  unverändert (Abb. 38 A,B) im Vergleich zu den Kontrollen.

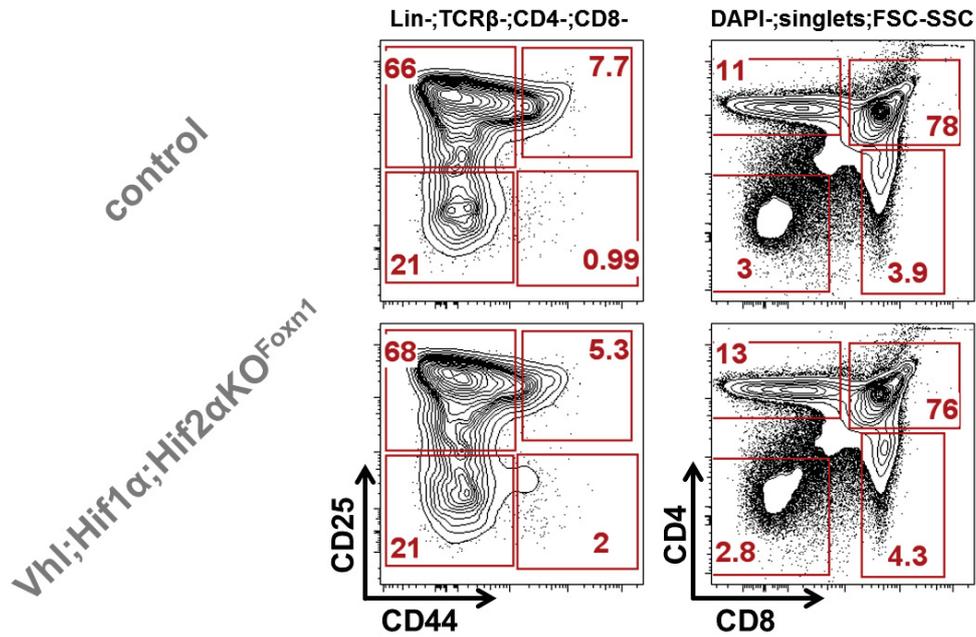


**Abbildung 37 Die simultane Deletion von *Hif1α* und *Hif2α* rettet den athymischen  $VhlKO^{Foxn1}$ -Phänotyp komplett.**

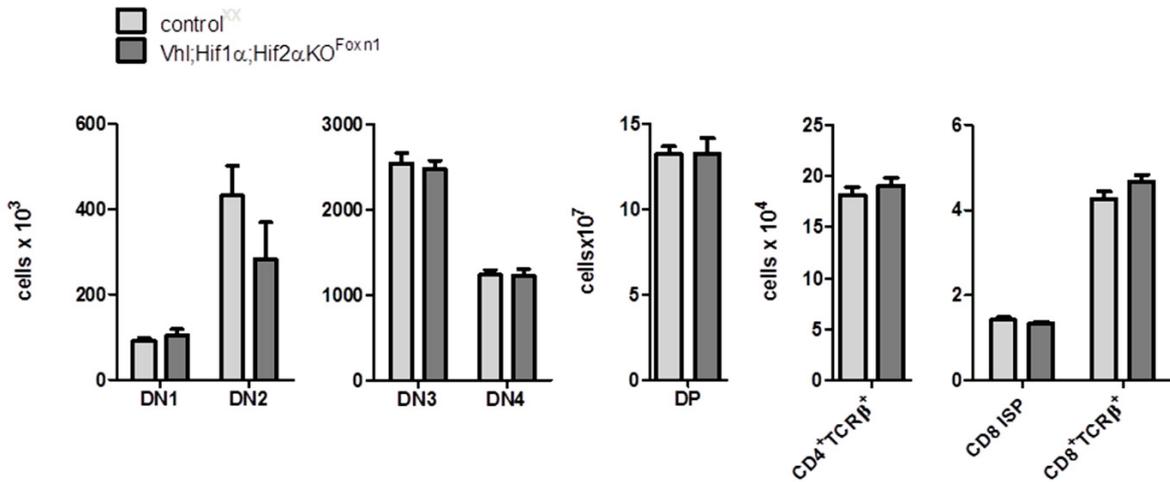
(A) Abbildung des Thymus einer Kontroll- und einer  $Vhl;Hif1α;Hif2αKO^{Foxn1}$ -Maus und graphische Darstellung der (B) Thymusgewichte und der Zellularität von (n=3) Kontrollen und (n=3)  $Vhl;Hif1α;Hif2αKO^{Foxn1}$ -Mäusen; control,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif1α^{loxP/loxP};Hif2α^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $Vhl;Hif1α;Hif2αKO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif1α^{loxP/loxP};Hif2α^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ ; Alter der Mäuse 6 Wochen; Maßstabsbalken 0,5 cm

Entsprechend zeigten sich keine Unterschiede in der TEC-Anzahl und deren Ausreifung (Abb. 39 A,B). Ebenso war im Gegensatz zu den  $Vhl;Hif2αKO^{Foxn1}$ -Thymi die normale kortikale und medulläre Thymusstruktur wieder hergestellt (Abb. 40). Auch war keine gesteigerte PAS-Färbung durch gesteigerte Kohlenhydrateinlagerungen zu verzeichnen (Abb. 40). Um sicherzustellen, dass innerhalb der TECs alle 3 Gene erfolgreich deletiert wurden, wurden TECs ( $EpCAM^+CD45^-$ ) aus  $Vhl;Hif1α;Hif2αKO^{Foxn1}$ -Thymi mittels Zellsortierung isoliert. Die an der genomischen DNA durchgeführten Multiplex-PCRs ergaben im Gegensatz zu den  $Vhl^{loxP/loxP};Hif1α^{loxP/loxP};Hif2α^{loxP/loxP}$ -Kontrollen für alle drei Allele eine nahezu komplette Deletion (Abb. 41). Demnach ist von einer erfolgreichen Inaktivierung von *Hif1α*, *Hif2α* und *Vhl* in TECs auszugehen. Passend zu dem normalen Thymus unterschieden sich auch die Zahlen der peripheren  $CD4^+TCRβ^+$  und  $CD8^+TCRβ^+$ -Zellen in den Milzen von  $Vhl;Hif1α;Hif2αKO^{Foxn1}$ -Mäusen nicht von denen der Kontrollen (Abb. 42).

**A**

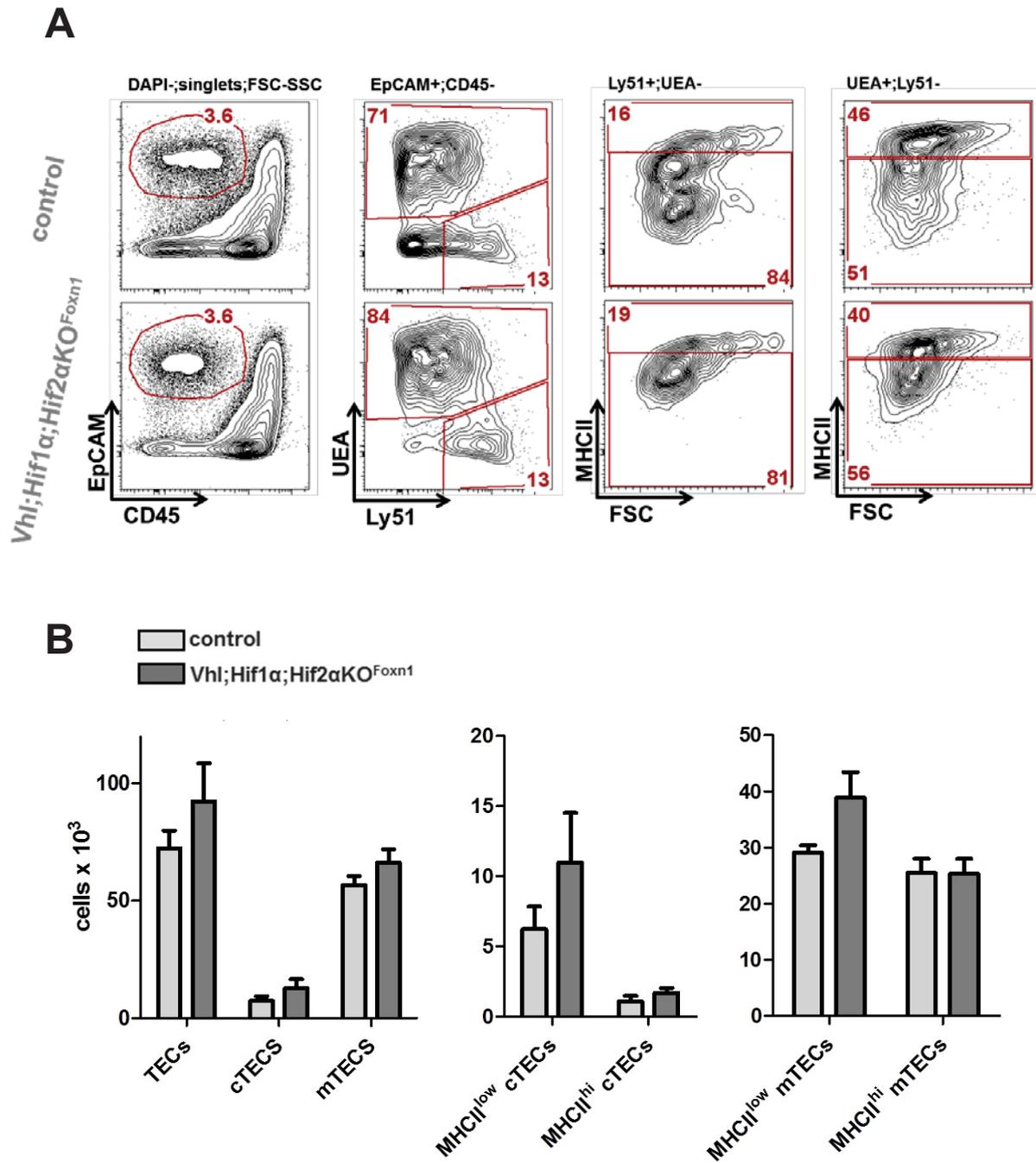


**B**



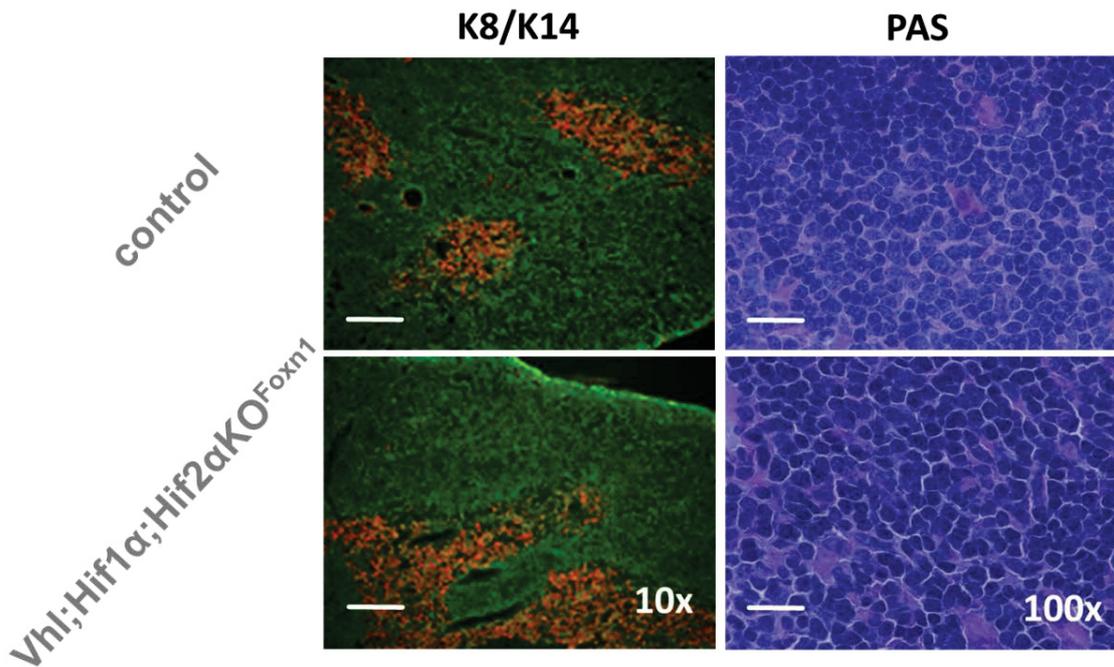
**Abbildung 38 Die zusätzliche Deletion von Hif1 $\alpha$  und Hif2 $\alpha$  rettet das fehlende Thymozyten-Kompartiment der VhlKO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse komplett.**

(A) Contour plots der durchflusszytometrischen Analyse der T-Zellentwicklungsstufen von Vhl;Hif1 $\alpha$ ;Hif2 $\alpha$ KO<sup>Foxn1</sup>-und Kontrollmäusen; CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> DN1, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> DN2, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> DN3, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> DN4, CD4CD8DP, CD4SP und CD8SP Thymozyten. (B) Graphische Darstellung der Thymozyten-Subpopulationen von (n=4) Kontrollen und (n=4) Vhl;Hif1 $\alpha$ ;Hif2 $\alpha$ KO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen. Die gleichzeitige Deletion von Hif1 $\alpha$  und Hif2 $\alpha$  im Vhl-defizienten Hintergrund in TECs führte zu einer unauffälligen T-Zellentwicklung; control, Vhl<sup>loxP/loxP</sup>;Hif1 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>;Hif2 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>;Foxn1<sup>+/+</sup>; Vhl;Hif1 $\alpha$ ;Hif2 $\alpha$ KO<sup>Foxn1</sup>, Vhl<sup>loxP/loxP</sup>;Hif1 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>;Hif2 $\alpha$ <sup>loxP/loxP</sup>;Foxn1<sup>+/cre</sup>; Alter der Mäuse 6 Wochen.



**Abbildung 39** Die zusätzliche Deletion von *Hif1α* und *Hif2α* rettet das fehlende TEC-Kompartiment der *Vhl*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse komplett.

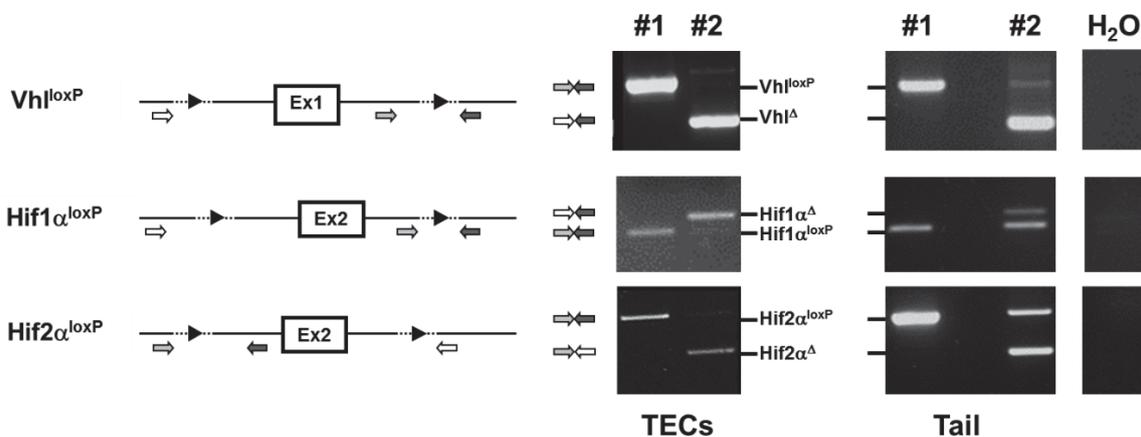
(A) Contour plots der durchflusszytometrischen Analyse der thymischen Stromazellen von *Vhl*;Hif1α;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>- und Kontrollmäusen; EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> TECs, Ly51<sup>+</sup>UEA<sup>-</sup> cTECs, UEA<sup>+</sup>Ly51<sup>-</sup> mTECs. (B) Graphische Darstellung der TEC-Subpopulationen von (n=3) Kontrollen und (n=3) *Vhl*;Hif1α;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen. Die gleichzeitige Deletion von *Hif1α* und *Hif2α* im *Vhl*-defizienten Hintergrund in TECs führte zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen; Alter der Mäuse 6 Wochen; control, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;Hif1α<sup>loxP/loxP</sup>;Hif2α<sup>loxP/loxP</sup>;Foxn1<sup>+/+</sup>; *Vhl*;Hif1α;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;Hif1α<sup>loxP/loxP</sup>;Hif2α<sup>loxP/loxP</sup>;Foxn1<sup>+/cre</sup>.



**Abbildung 40** *Vhl;Hif1α;Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup> - Thymi zeigen eine normale Thymusstruktur.

Kryo-Thymusschnitte von Kontrollen und *Vhl;Hif1α;Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen wurden mit Fluorophor-konjugierten K8- und K14-Antikörpern gegen kortikale und medulläre Strukturen gefärbt sowie der PAS-Färbung unterzogen. Die Thymusstruktur der dreifach-knockout-Thymi zeigte keine Auffälligkeiten im Vergleich zu den Kontrollen; control, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif1α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>; *Vhl;Hif1α;Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif1α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/cre</sup>; Alter der Mäuse 6 Wochen; Maßstabsbalken 0,2 mm (10x), 0,02 mm (100x).

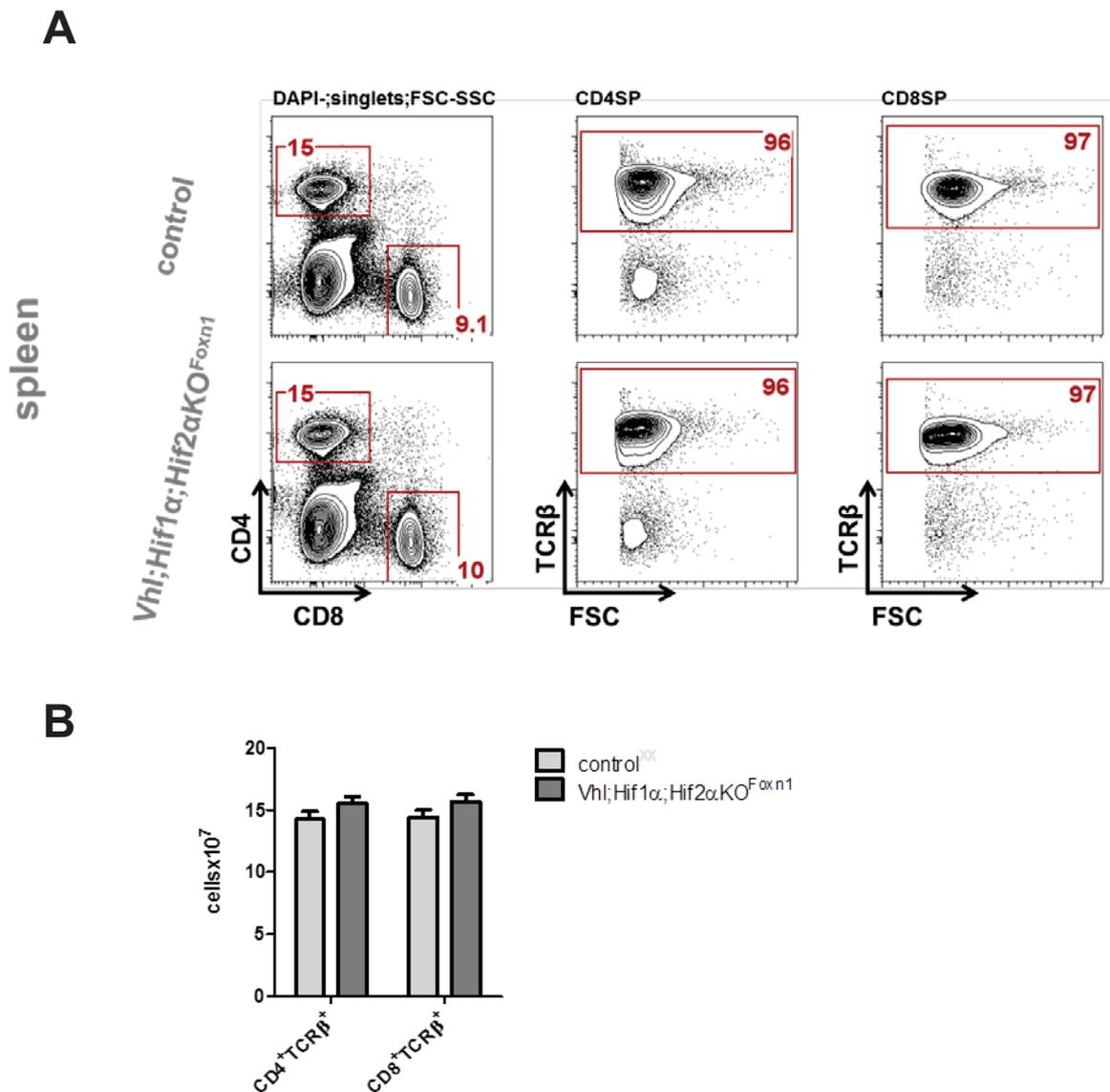
**#1** - *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif1α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>  
**#2** - *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif1α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/cre</sup>



**Abbildung 41** Deletionsanalyse der Allele *Vhl*<sup>loxP</sup>, *Hif1α*<sup>loxP</sup> und *Hif2α*<sup>loxP</sup> in sortierten TECs.

Die Deletionsanalyse erfolgte mittels PCR an der genomischen DNA sortierter TECs von jeweils 3 zusammengeführten Thymi pro Genotyp. TECs der *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif1α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/cre</sup>-

Mäuse (#2) wiesen eine nahezu komplette Rekombination des  $Vhl^{loxP-}$ , des  $Hif1\alpha^{loxP}$  und des  $Hif2\alpha^{loxP}$  Allels auf. In  $Vhl^{loxP/loxP};Hif1\alpha^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP}$ -Kontroll-TECs (#1) dagegen wurden nur die geflochtenen Allele nachgewiesen. Mit Hilfe der Multiplex-PCR an der Schwanzspitzen-DNA wurden innerhalb der Versuchstiere (#2) geflochte Allele als auch deren Inaktivierung detektiert. Die Kontrollen (#1) zeigten die geflochtenen Allele. Vhl-PCR: obere Bande  $Vhl^{loxP}$  600 bp, untere Bande  $Vhl^{\Delta}$  300 bp; Hif1 $\alpha$ -PCR: untere Bande  $Hif1\alpha^{loxP}$  220 bp, obere Bande  $Hif1\alpha^{\Delta}$  250 bp; Hif2 $\alpha$ -PCR: obere Bande  $Hif2\alpha^{loxP}$  444 bp, untere Bande  $Hif2\alpha^{\Delta}$  340 bp; H<sub>2</sub>O Wasserkontrolle.



**Abbildung 42 Die gleichzeitige Deletion von *Hif1 $\alpha$*  und *Hif2 $\alpha$*  rettet das fehlende periphere reife Milz- T-Zellkompartiment der  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäuse komplett.**

(A) Contour plots der durchflusszytometrischen Analyse der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Milz-T-Zellen sowie, innerhalb dieser, der reifen TCR $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen einer Kontrolle und einer  $Vhl;Hif1\alpha;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Maus. (B) Graphische Darstellung der Gesamtzahlen der reifen TCR $\beta$ <sup>+</sup> peripheren T-Zellen in der Milz von (n=4)  $Vhl;Hif1\alpha;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäusen und (n=4) Kontrollmäusen; Alter der Mäuse 6 Wochen; control,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif1\alpha^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/+}$ ;  $Vhl;Hif1\alpha;Hif2\alpha KO^{Foxn1}$ ,  $Vhl^{loxP/loxP};Hif1\alpha^{loxP/loxP};Hif2\alpha^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ .

Zusammenfassend konnte der Thymus von  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäusen durch den zusätzlichen Verlust von *Hif1α* und *Hif2α* komplett gerettet werden. Die Inaktivierung von *Vhl*, *Hif1α* und *Hif2α* ließ einen komplett ausgereiften, funktionellen Thymus mit unveränderten TEC- und Thymozyten-Subpopulationen und normaler Organstruktur entstehen.

## 7 Diskussion

Bisher gibt es keine Publikationen zur Rolle des Hypoxie-Signalweges in Thymusepithelzellen (TECs). Innerhalb dieser Arbeit kam es durch die Deletion des negativen Regulorgens *Vhl* in TECs in Mäusen zur Nichtausbildung eines Thymus. Damit konnte erstmalig eine essentielle Bedeutung des von Hippel-Lindau Proteins (pVHL) in der Thymusorganogenese aufgezeigt werden.

In der Arbeit von Braun et al. wurde bereits gezeigt, dass der Thymus im Vergleich zu anderen Organen verhältnismäßig hypoxisch ist ( $pO_2 < 10$  mm Hg) (Braun et al., 2001). Dieses wurde von der gleichen Arbeitsgruppe bestätigt, die unter physiologischen Bedingungen histologisch sowohl Hypoxiemarker-positive Thymozyten als auch Thymusepithelzellen nachweisen konnten (Hale et al., 2002). Beide Arbeiten ließen vermuten, dass die Entwicklung der Thymozyten von einem hypoxischen Mikromilieu beeinflusst wird. Auf molekularer Ebene wird die zelluläre Anpassung an die verschiedenen Sauerstoffbedingungen durch den Hypoxie-Signalweg reguliert. pVHL gilt als negativer Regulator dieses Signalweges und vermittelt die kontinuierliche Degradation der Hypoxie-induzierbaren Faktoren unter normoxischen Bedingungen (Pugh and Ratcliffe, 2003; Li and Kim, 2011). In dieser Arbeit wurden die Folgen des genetischen Verlustes von *Vhl* als negativer Regulator des Hypoxie-Signalweges untersucht. Jedoch ist hervorzuheben, dass pVHL auch Hypoxie-Signalweg unabhängige Funktionen wie die Extrazellulärmatrixorganisation (Kurban et al., 2008) und die Organisation der Mikrotubuli (Lolkema et al., 2004) reguliert. Der Verlust von pVHL führt neben der Stabilisierung von HIF ebenso zu einer konstitutiven Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren (Frew and Krek, 2008).

### Die Rolle von pVHL innerhalb von T-Zellen

Die Arbeit von Biju et al. wies bereits darauf hin, dass der Hypoxie-Signalweg in sich entwickelnden T-Zellen innerhalb des Thymus eine wichtige Rolle spielt. Mit Hilfe einer *Lck-Cre* vermittelten Thymozyten-spezifischen *Vhl*-Inaktivierung hatte die Arbeitsgruppe gezeigt, dass die fehlende negative Regulation von HIF durch pVHL mit einem Caspase 8-vermittelten Zelltod von CD4CD8DP, sowie CD4SP und CD8SP einhergeht (Biju et al., 2004). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Rekombination durch *Lck-Cre*-Rekombinase erst in positiv selektierten DN3-Thymozyten stattfindet und alle früheren Thymozytenstufen nicht rekombiniert werden. Dies spricht für eine Rolle von pVHL für die Entwicklung der Thymozyten. Auch reife, vom Thymus entlassene T-Zellen, werden durch pVHL reguliert. Doedens et al. berichteten kürzlich, dass die fehlende Inhibition von HIF1 $\alpha$  in

*Vhl*-defizienten T-Zellen die CD8<sup>+</sup>-Effektorfunktion während chronischer Infektionen und Tumorerkrankungen unterstützt und verlängert (Doedens et al., 2013).

### **Auswirkung von niedrigem Sauerstoffpartialdruck auf Thymusepithelzellen**

Die in den Experimenten verwendeten kortikalen und medullären Thymusepithel-Zelllinien ANV41.2 (hier ANV) und TE-71 stammen von Andrew G. Farr (University of Washington, Seattle, USA). Die ANV-Zelllinie war vom Thymusepithel k14 E6/E7 transgener hyperplastischer Thymi gewonnen worden und wies Eigenschaften von cTECs auf. In Re-Aggregaten (*reaggregate co-culture*, ROC) mit CD4CD8DP-Thymozyten transgener Mäuse waren ANV-Zellen in der Lage die Entwicklung von CD4SP Zellen (positive Selektion) zu unterstützen (Nelson et al., 1998). Die TE-71-Zelllinie stammt von enzymatisch dissoziiertem murinen Thymusstroma und wies medulläre TEC-Charakteristika auf. Diese beinhalteten die Expression von mTEC-spezifischen Keratinen und ER-TR5, dazu die Fähigkeit UEA (*Ulex europeus agglutinin*) zu agglutinieren (Farr et al., 1989).

Zunächst wurden die Zelllinien hinsichtlich ihrer TEC-Merkmale überprüft. Die mRNA-Expression des TEC-spezifischen Transkriptionsfaktors *Foxn1* (*forkhead box1*) bestätigte den thymus-epithelialen Ursprung beider Zelllinien. Die Expression von EpCAM und Ly-51 war an ANV-Zellen bisher nicht gezeigt worden und konnte auch innerhalb dieser Arbeit nicht detektiert werden. Das, wenn auch nur geringe Potential UEA zu binden, wies bei TE-71 auf einen medullären Ursprung hin. Die TE-71 ausgeprägte Expression von EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) war mit einem vergleichsweise starken adhäsiven Verhalten in der Zellkultur vereinbar. Die fehlende Expression von MHC class II-Molekülen passte zu Daten von Farr et al., die eine Hochregulierung von MHC class II-Molekülen bei TEC- Zelllinien in Abhängigkeit von der Stimulierung durch IFN- $\gamma$  *in vitro* beschrieben (Farr et al., 1989; Nelson et al., 1998).

Bisher waren noch keine Studien an kortikalen oder medullären Zelllinien unter hypoxischen Bedingungen veröffentlicht worden. In Untersuchungen zur Wachstumskinetik unter hypoxischen Bedingungen (3% O<sub>2</sub>) konnte gezeigt werden, dass ein veränderter, im Vergleich zum atmosphärischen, erniedrigter Sauerstoffdruck einen negativen Einfluss auf die zelluläre Vermehrung von *in vitro* ANV und TE-71 Thymusepithelzellkulturen hat. Dabei war das Wachstum von TE-71-Zellen stärker beeinträchtigt als das von ANV. Es ist anzunehmen, dass der Effekt über den Hypoxie-Signalweg ausgelöst wurde. Hierfür spricht die in Genexpressionsanalysen nachgewiesene Aktivierung des hypoxischen Signalweges. TE-71-Zellen reagierten dabei deutlich stärker mit der Induktion von HIF-Zielgenen als ANV-Zellen. Die vermehrte Apoptoserate in hypoxisch inkubierten TE-71-Zellen könnte durch die Hochregulierung der pro-apoptotischen HIF-*responsive* Gene *Bnip3* (Qi et al., 2012) und

*Ddit4* (Shoshani et al., 2002; Horak et al., 2010) verursacht worden sein. Der durch den verminderten Sauerstoffpartialdruck erfolgte Verlust an TE-71 G2M-Phase-Zellen könnte damit ursächlich durch Apoptose hervorgerufen worden sein.

Die veränderte Wachstumskinetik und die Induktion von HIF-Zielgenen unter verringerten Sauerstoffpartialdruck spricht dafür, dass der Hypoxie-Signalweg in der Lage ist Thymusepithelzellen zu regulieren. Die stärkere Induktion von HIF-Zielgenen, die erhöhte Apoptoserate und der Verlust an G2M-Phase-Zellen in hypoxisch-inkubierten TE-71-Zellen könnte für eine vornehmliche Bedeutung des Hypoxie-Signalweges in medullären TECs sprechen. Ob das schnellere Wachstum und der damit höhere Stoffwechsel von TE-71-Zellen im Vergleich zu ANV-Zellen dabei einen Einfluss haben ist unklar.

Jedoch ist die Übertragung dieser Schlußfolgerung aus dem *in vitro* System nur unter Vorbehalt auf das biologische Verhalten von primären TECs im *in vivo* System möglich.

### ***In vivo* Deletion von *Vhl* in Thymusepithelzellen**

In den *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Hypoxie-Signalweg vermutlich eine Bedeutung in kortikalen und medullären Thymusepithelzelllinien hat. Das Ziel der weiteren Untersuchungen war die Rolle des Hypoxie-Signalweges in Thymusepithelzellen *in vivo* in der Maus zu untersuchen. In Genexpressionsanalysen an sortierten murinen Thymusepithelzellen konnte gezeigt werden, dass die mRNA der drei Hauptkomponenten des Hypoxie-Signalweges (*Vhl*, *Hif1 $\alpha$* , *Hif2 $\alpha$* ) in TECs exprimiert wird. Zunächst war das Ziel, den Hypoxie-Signalweg in TECs zu aktivieren. Dies kann durch die Deletion von *Vhl* und der damit einher gehenden Stabilisierung von HIF-Proteinen erreicht werden. Aus Untersuchungen an Mäusen mit homozygotem konventionellen *Vhl*-knockout ist bekannt, dass *Vhl* für die extraembryonale Gefäßbildung in der Plazenta kritisch ist und der ubiquitäre Verlust von *Vhl* zu frühzeitiger, embryonaler Letalität führt (Gnarra et al., 1997). Daher wurde in dieser Arbeit ein TEC-spezifischer Ansatz zur Deletion von *Vhl* in Mäusen gewählt. *Foxn1* ist für die Differenzierung der fetalen und postnatalen TECs essentiell. *Foxn1* wird jedoch auch in Keratinozyten und Haarfollikeln exprimiert (Blackburn et al., 1996; Chen et al., 2009; Nowell et al., 2011; Nehls et al., 1994). Der Verlust des Thymus in *Vhl*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/cre</sup>-Mäuse) weist darauf hin, dass pVHL eine bedeutende Rolle für die Thymusentwicklung hat. Der veränderte Phänotyp läßt vermuten, dass die *Vhl*-Inaktivierung in TECs statt gefunden hat. Dies wird von den Daten der *Vhl*; *Hif1 $\alpha$* ; *Hif2 $\alpha$* <sup>Foxn1</sup>-Mäuse unterstützt, in denen die Beteiligung des Hypoxie-Signalweges an der Thymusorganogenese nachgewiesen wurde.

Die Arbeitsgruppe von R. Johnson konnte zeigen, daß eine *Keratin-14-Cre* vermittelte epidermale *Vhl* Inaktivierung zu einer gesteigerten Erythropoetin Produktion führt, die mit einer Hämatokrit-Erhöhung bei diesen Mäusen assoziiert ist (Boutin et al., 2008). Im Gegensatz hierzu konnten innerhalb dieser Arbeit bei *VhIKO<sup>Foxn1</sup>* Mäusen keine Veränderungen des Blutbildes festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). *Foxn1* ist in Keratinozyten der supradermalen Schicht der Epidermis exprimiert, die das terminale Differenzierungsprogramm angeschaltet haben (Lee et al., 1999). Dagegen ist *Keratin-14* bereits in unreiferen Keratinozyten der basalen epidermalen Schicht exprimiert (Vassar et al., 1989). Entsprechend liegen basale *Keratin-14* positive Keratinozyten näher an den Kapillaren der Dermis als suprabasale *Foxn1*-positive Keratinozyten. Die Blutgefäß-nahe anatomische Lokalisation könnte die Ursache dafür sein, dass eine *Vhl* Inaktivierung nur innerhalb von *Keratin-14* positiven Keratinozyten und nicht innerhalb von *Foxn1*-positiven Keratinozyten einen systemischen Effekt auf die Erythropoese ausübt.

Die *Foxn1-Cre* vermittelte Inaktivierung verschiedener Gene führt zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen des Thymus und seiner Funktionen. Die *Foxn1-Cre* gesteuerte Inaktivierung von *Dll4* verursacht einen kompletten Block in der T-Zell-Entwicklung und geht mit einer ektopischen B-Zell-Entwicklung innerhalb des Thymus einher (Koch et al., 2008). Die *Foxn1-Cre* vermittelte Deletion innerhalb des microRNA-Netzwerkes führt, ähnlich wie in *HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>*- und *Vhl;Hif2αKO<sup>Foxn1</sup>*-Mäusen, zu erheblichen strukturellen Veränderungen der Thymusarchitektur (Papadopoulou et al., 2011; Khan et al., 2014). Während die Inaktivierung von *Dicer* zur Degenerierung der kortikalen und medullären Strukturen, einer geringeren positiven Selektion von DP und zu gesteigerten B-Zellzahlen führt (Papadopoulou et al., 2011) beeinflusst die Inaktivierung von *Dgcr8* das medulläre Kompartiment und zeigt durch das vermehrte Auftreten pathogener autoreaktiver T-Zellen die gestörte negative Regulation (Khan et al., 2014). Ähnliche Beobachtungen konnten in *HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>*-Mäusen erhoben werden, in denen das  $T_{reg}$ -Kompartiment vermindert und das Effektor-Gedächtnis-T-Zellkompartiment in der Milz expandiert ist. Dies lässt ebenso den Schluss zu, dass die negative Selektion autoreaktiver T-Zellen gestört ist. Die *Foxn1-Cre* vermittelte *Smad4*-Defizienz bringt ebenfalls disorganisierte Thymi hervor, die hypozellulär sind und im verminderten Maße frühe Progenitorzellen zeigen (Jeker et al., 2008).

Ein athymischer Phänotyp wurde bisher nur in wenigen Mutanten-Mäusen beschrieben. In die embryonale Entwicklung des Thymus sind verschiedene Prozesse involviert. Zunächst findet die Positionierung der Thymusanlage innerhalb der pharyngealen Region in der 3. Kiementasche des endodermalen Epithels und deren Ausknospung statt. Anschließend erfolgen die Ablösung der Anlage von der endodermalen Basis, die Differenzierung und die Abwanderung zur endgültigen anatomischen Position. Insgesamt wird die Thymusanlage in

der Maus anfänglich durch die endodermale Expression der Transkriptionsfaktoren TBX1, HOXA3, PAX1, PAX9, EYA1 und SIX1 und von Fgf8 kontrolliert. Später ist die Interaktion mit von der Neuralleiste abstammenden Zellen (*neural crest derived mesenchymal cells*) erforderlich. Die Expression des Transkriptionsfaktors FOXN1 markiert erstmalig die Thymusanlage und initiiert die Besiedlung mit hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die lympho-epitheliale Interaktion ist für das weitere Fortschreiten der Entwicklung essentiell (Nowell et al., 2007; Alves et al., 2009; Rodewald, 2008).

In *Tbx1*-defizienten Mäusen entsteht die Thymus-Aplasie aufgrund einer defekten Segmentierung und Entwicklung der gesamten pharyngealen Region (Reeh et al., 2014; Jerome and Papaioannou, 2001). In Mäusen, die einen Verlust von *Hoxa3* oder *Pax1* oder *Pax9* aufweisen, führt die gestörte Abwanderung der Thymusanlage in den mediastinalen Bereich zu einem athymischen Phänotyp (Nowell et al., 2007). In *Nude* Mäusen liegt eine *loss-of-function* Mutation von *Foxn1* vor, die mit einer Funktionsstörung der TECs einhergeht, die wiederum die Besiedlung der Thymusanlage mit hämatopoetischen Progenitoren verhindert und zum athymen Phänotyp führt (Nehls et al., 1994). Die Deletion von *Rac1* in K5/K14 exprimierenden embryonalen und adulten TECs geht mit einer Hochregulierung von *c-Myc* bei gleichzeitig gesteigerter Apoptose und dem Verlust von TECs einher (Hunziker et al., 2011) und führt somit zur Thymusaplasie. In SCID (*severe combined immuno-deficiency*)-Mäusen ist die Immunglobulin-Bildung und das TCR-Rearrangement gestört (Carroll and Bosma, 1991). Der Block in der frühen T- und B-Zellentwicklung führt zum Verlust von immunkompetenten Zellen und zur Ausbildung eines rudimentären Thymus, der nur kortikale TECs enthält (Bosma and Carroll, 1991).

Im Menschen führt die nonsense Mutation R255X im Exon 4 von *FOXN1* zum Verlust des funktionellen FOXN1-Proteins (Romano et al., 2013), der mit dem *Nude* Maus ähnelnden Phänotyp assoziiert wird (Pignata et al., 2001). Als Folge bleibt der Thymus in einem rudimentären Stadium und zeigt eine gestörte T-Zellentwicklung, die mit Immundefizienz einhergeht und im frühen Kindesalter zum vorzeitigen Tod führt. Der mit der *FOXN1*-Defizienz beobachtete Haarausfall wird auf die unzureichende Entwicklung von Haarfollikeln zurückgeführt (Frank et al., 1999); (Cai and Ma, 2011).

Das komplette Fehlen der T-Zell-Vorläufer im rudimentär vorliegenden Mediastinalgewebe von herangewachsenen VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen spricht für die Abwesenheit von Thymusgewebe. Die in der Analyse des Stromas detektierten wenigen Zellen mit TEC-spezifischen Eigenschaften deuten darauf hin, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt als Reaktion auf eine defekte epitheliale Umgebung handelt. Der deutlich verminderte periphere reife CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Pool in der Milz ist als indirekter Beweis für das Fehlen eines

funktionellen Thymus zu werten. Die wenigen residualen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen könnten aus extrathymischer Lymphopoese stammen (Kennedy et al., 1992; Rocha, 2007). Die Tatsache, dass VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäuse weniger residuale reife Milz-T-Zellen als *Nude* Mäuse gleichen Alters aufwiesen, kann mit dem unterschiedlichen biologischen Hintergrund erklärt werden. Im Gegensatz zu den Versuchsmäusen, die im B6 Hintergrund gezüchtet wurden, befanden sich die analysierten *Nude* Mäuse im Auszucht-NMRI-Hintergrund.

Um zu klären, ob neben der T-Zelllinie auch die B-Zell-lymphatische Linie in VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen beeinträchtigt war, wurden die B-Zellzahlen in der Milz analysiert. Die unauffälligen Gesamtzellzahlen der B-Zellen und der folliculären B-Zellzahlen in VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen deuten darauf hin, dass der Verlust des T-Zell-Kompartimentes nicht mit der Generierung von reifen B-Zellen interferiert. Das Fehlen von T-Zellen verhinderte nicht, dass freie Nischen innerhalb der Milz von B-Zellen eingenommen werden konnten.

Im Folgenden war zu klären, ob die Thymusanlage in VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Embryonen durch den *Vhl*-Verlust nicht angelegt wurde oder ob die embryonale Entwicklung der Thymusanlage gestört war, so dass es postnatal zur Nichtausbildung des Thymus kam. Normalerweise werden im Stadium E11 *Foxn1*-vermittelt hämatopoetische Progenitorzellen von TECs in die embryonale Thymusanlage gelockt und ihre T-Zell-Differenzierung initiiert. Dafür sind im Wesentlichen die Chemokine Cxcl12 und Ccl25 sowie der TEC-Membranständige Notch-Ligand DLL4 zuständig (Calderon and Boehm, 2012). Die weitere Entwicklung von TECs und Thymozyten und somit der Thymusanlage erfordert die reziproke Interaktion beider Zelltypen (Alves et al., 2009). In *Nude* Mäusen war gezeigt worden, dass es durch die Mutation von *Foxn1* zum Verlust dieser essentiellen Chemokine und Liganden kommt, was zur Atrophie der Thymusanlage und zum athymen Phänotyp führt (Calderon and Boehm, 2012).

Der Nachweis von DP-Thymozyten in der durchflusszytometrischen Analyse der deutlich verkleinerten Thymusanlagen von VhIKO<sup>Foxn1</sup>-E17,5-Embryonen weist auf das Vorliegen einer Thymusaplasie hin. Die Entstehung von DP-Thymozyten deutet auf das Vorhandensein von funktionstüchtigen cTECs hin (Starr et al., 2003). Die verminderte Anzahl lässt jedoch vermuten, dass in den kleinen rudimentären VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Thymi die T-Zellentwicklung nicht adäquat durch TECs unterstützt wird.

In histologischen Untersuchungen der VhIKO<sup>Foxn1</sup>-Thymusanlagen zeigte sich eine geringe Besiedlung durch hämatopoetische Progenitoren und ein vermehrtes Auftreten von Zellen mit großflächigen Zytoplasma-Anteilen. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Analyse sprechen dafür, dass es sich bei diesen untypischen Zellen nicht um TECs handelt, da sie keine TEC-typischen Marker tragen. Der reduzierte Anteil an TECs konnte in der detaillierten durchflusszytometrischen Analyse von enzymatisch verdauten E15,5-Thymusanlagen

(Shakib et al., 2009; Zuklys et al., 2009) bestätigt werden. Vor allem der Verlust an *cTEC-primed default* TEC-Progenitorzellen (Alves et al., 2014) und die fehlende Ausprägung des Reifungsmerkmals MHCII innerhalb der TECs deutet darauf hin, dass der TEC-spezifische *Vhl*-Verlust mit der Generierung und Entwicklung von TEC-Progenitorzellen interferiert.

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der TEC-spezifische *Vhl*-Verlust die Generierung und Entwicklung von TEC-Progenitorzellen beeinträchtigt. Die Frage bleibt offen, ob die Attraktion von hämatopoetischen Progenitorzellen in die Thymusanlage durch die *Vhl*-Defizienz insgesamt beeinträchtigt wird und es, aufgrund der fehlenden Interaktion, zu einer Verkümmern der Anlage kommt. Dagegen spricht, dass die Thymusanlage ein, wenn auch nur sehr geringes, Potential besitzt, DP-Thymozyten zu generieren. In weiterführenden Untersuchungen könnten Gen-Expressionsanalysen von *Dll4*, *Cxcl25* und *Ccl12* an der cDNA sortierter embryonaler  $VhIKO^{Foxn1}$ -TECs diese Frage klären. Dies ist technisch jedoch nur schwer zu realisieren, da die Anzahl der TECs in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Thymi massiv verringert ist.

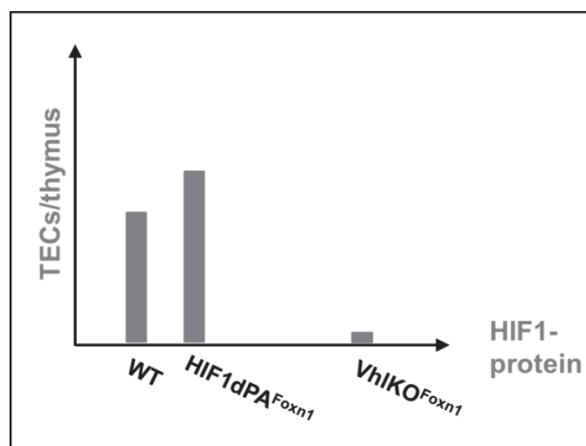
Das beim Menschen auftretende *clear-cell Renal Cell Carcinoma* (ccRCC) entsteht unter anderem wenn in der Nierenzelle eines Patienten von *Hippel-Lindau*-Gen mutiert. Histologische Untersuchungen an Nierenbiopsien und chirurgisch entferntem Tumorgewebe zeigen charakteristische Zellen, die HE-ungefärbt bleiben und in denen starke Glykogen-Einlagerungen mittels PAS-Färbung nachgewiesen werden können (Tun et al., 2010). Da die Zellen mit großflächigen, klaren zytoplasmatischen Arealen in den embryonalen  $VhIKO^{Foxn1}$ -Thymi den *VHL*-defizienten ccRCC-Zellen ähnelten, wurden PAS-Färbungen der embryonalen Schnitte durchgeführt. Die Daten der PAS/D-PAS-Färbung beweisen die Akkumulation von Glykogen in den embryonalen Thymusanlagen der  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäuse und deuten auf eine Störung im Glykogen-Stoffwechsel wie in ccRCC hin. In Hepatozyten wurde bereits der Einfluss eines *Vhl*-Verlustes im Glukosestoffwechsel beschrieben. Park et al. berichten, dass der Verlust von hepatischen *Vhl* neben der Aktivierung von klassischen HIF-Zielgenen auch zur Herunterregulierung der beiden Leber-spezifischen Glukosemetabolismus-Gene *Glut 2* und *Glucose-6-phosphatase* führt und es damit zur Glykogen-Akkumulation in den Zellen kommt (Park et al., 2007). Weiterhin beschrieben Kurabayashi et al. kürzlich, dass die in *Vhl*-defizienten Hepatozyten beobachtete verstärkte Glukose-Einlagerung ursächlich durch die Hochregulierung des IGF-IR (*Insulin-like growth factor receptor*) und des Glukosetransporters *Glut1* erfolgt (Kurabayashi et al., 2013). Ob die Akkumulation von Glykogen und damit dessen Bereitstellung als metabolisches Substrat für die Energiegewinnung in den *Vhl*-defizienten embryonalen Thymusanlagen durch verstärkte Aufnahme oder durch verminderte Verstoffwechslung oder Freisetzung verursacht wird, bleibt hier ungeklärt.

Wahrscheinlich führt die ausgeprägte Glykogeneinlagerung in frühen TEC-Vorläuferzellen zu deren funktionellen Beeinträchtigung und führt zur Unterdrückung der normalen Differenzierung.

### Die Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF1 $\alpha$ -Variante in TECs

Die  $VhIKO^{Foxn1}$ -Daten ließen zunächst keinen Rückschluss darüber zu, über welche der beschriebenen *Vhl*-Funktionen (HIF-abhängig oder –unabhängig) (Frew and Krek, 2008) es zur Verkümmern der Thymusanlage in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen kommt. Mechanistisch war das Ziel zu klären, ob der Thymusverlust von  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen HIF-abhängig oder –unabhängig ist.

Kaelin et al. haben beschrieben, dass die Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF-Variante (HIF1dPA, HIF2dPA) in der Haut und in der Leber den *Vhl*-defizienten Phänotyp kopierten (Kim et al., 2006). Die innerhalb dieser Arbeit analysierten Mäuse mit einer TEC-spezifischen Überexpression einer modifizierten HIF $\alpha$ -Variante ( $Rosa26^{+/loxP;Hif1dPA};Foxn1^{+/cre}$ -Mäuse, hier HIF1dPA $^{Foxn1}$ -Mäuse) wiesen einen unauffälligen Phänotyp auf (Abb. 23 C). In Zusammenschau mit den Daten der  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäuse könnte der unauffällige  $Hif1dPA^{Foxn1}$ -Phänotyp dadurch erklärt werden, dass die Expression von HIF1dPA über den relativ schwachen *ROSA26*-Promoter möglicherweise sehr viel niedriger ist als die Überexpression von HIF1 $\alpha$ -Protein durch den gehemmten Abbau bei pVHL-Verlust (Abb. 43). Vermutlich wird die Thymusaplasie in  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen durch eine hohe Konzentration von HIF1 $\alpha$  mitverursacht, während die HIF1 $\alpha$ -Konzentration in HIF1dPA-Mäusen gering ist und daher keinen Einfluss auf die Thymusentwicklung hatte.



**Abbildung 43** Mögliche unterschiedliche HIF1 $\alpha$ -Expressionsniveaus in Kontroll-, HIF1dPA $^{Foxn1}$ - und  $VhIKO^{Foxn1}$ -Mäusen könnten die Größe des TEC-Kompartimentes bestimmen.

Mäuse mit der TEC-spezifischen Überexpression einer nicht hydroxylierbaren HIF1 $\alpha$ -Variante zeigten vom Trend her leicht erhöhte TEC-Gesamtzahlen im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 22). Die

durch den ROSA-Promoter induzierten HIF1dPA-Expressionsstärken sind möglicherweise nur gering höher als in Kontroll-TECs und führen daher zum insgesamt unauffälligen Phänotyp. Das vermutlich durch die fehlende negative Regulation bestehende hohe HIF1 $\alpha$ -Expressionsniveau im  $VhlKO^{Foxn1}$ -Modell dagegen interferiert bereits im Embryonalstadium mit der Entwicklung von TEC-Progenitoren und führt zur Thymusatrophie.

### Die Bedeutung von *Hif2 $\alpha$* in TECs

Gegenstand weiterer Untersuchungen war es, die Rolle von *Hif2 $\alpha$*  in TECs zu untersuchen. HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäuse (*Rosa26*<sup>+loxP</sup> Hif2dPA<sup>+</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>-Mäuse) phänotypisierten den *Vhl*-Verlust teilweise. Die Thymi waren klein und dysfunktional. Die unauffälligen DN1-Thymozytengesamtzahlen sprechen für eine intakte Besiedlung der in den Thymus einwandernden Progenitorzellen. Der deutliche Verlust aller weiteren Thymozytensubpopulationen weist auf eine gestörte T-Zellentwicklung hin. Das Vorliegen eines deutlich verminderten medullären TEC-Kompartimentes gibt einen Hinweis dafür, dass die negative Regulation von HIF2 $\alpha$  durch pVHL in TECs für die Generierung der mTECs und die Entwicklung aller Thymozytensubpopulationen eine wichtige Rolle spielt. Die Reifung von cTECs erfordert zelluläre und molekulare Interaktionen mit den frühen Thymozyten (DN und DP), die von mTECs die Interaktion mit den späten Entwicklungsstufen (SP) (Alves et al., 2009). Demnach könnte die Überexpression von HIF2dPA in cTECs ein verändertes stromales Umfeld für die frühen thymischen Progenitorzellen zur Folge haben. Der Verlust der Interaktionen mit den reifen Thymozyten hat neben der möglicherweise mTEC-intrinsischen ungünstigen HIF2 $\alpha$ -Stabilisierung wiederum einen hemmenden Effekt auf die Entwicklung der mTECs. Die Veränderungen im stromalen Kompartiment gingen mit einer ungeordneten Verteilung der epithelialen Strukturen einher, was mit Hilfe der Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte. Die Tatsache, dass in den Kryoschnitten vereinzelt Kohlenhydrat-Akkumulationen nachweisbar waren, lässt vermuten, dass HIF2 $\alpha$  auch an der Glykogenanreicherung in  $VhlKO^{Foxn1}$ -Thymusanlagen beteiligt ist. Die Annahme wird durch die gesteigerte Induktion der mRNA-Expression von *Glut1* in sortierten TECs von HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen bestärkt. Die gesteigerte Expression von *Glut1* und *Vegf* deutet auf die Aktivierung des Hypoxie-Signalweges hin und kann indirekt als Beweis für die HIF2dPA-Überexpression gesehen werden..

Die thymische Medulla besitzt eine wichtige Rolle für die Induktion der T-Zell-Toleranz indem sie die Generierung von natürlichen regulatorischen T-Zellen ( $nT_{regs}$ ) kontrolliert (Aschenbrenner et al., 2007; Apostolou et al., 2002). Dementsprechend konnte innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der Verlust von mTECs in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen mit einem ausgeprägten Verlust der regulatorischen ( $T_{regs}$ ) in der Milz einhergeht. Dieses lässt sich mit den von Cowan et al. gewonnenen Erkenntnissen erklären, dass eine intakte

Thymusmedulla für die Entwicklung von Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> erforderlich ist (Cowan et al., 2013). Der expandierte periphere Effektor-Gedächtnis-T-Zell-Pool in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen kann ebenso mit dem Verlust der mTECs und dem daraus resultierendem fehlenden Potential autoreaktive T-Zellen zu eliminieren, erklärt werden (Bonito et al., 2013). Ob der Verlust des medullären Thymusepithels mit Autoimmunphänomenen einhergeht, bleibt an dieser Stelle offen.

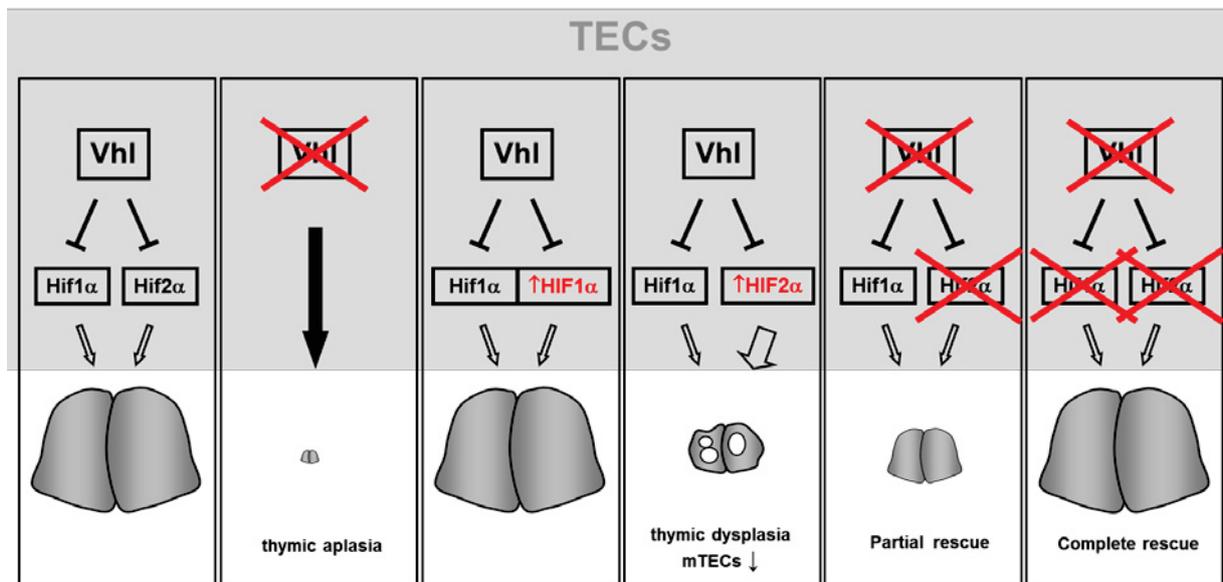
Insgesamt deuten die Daten daraufhin, dass die Überexpression von HIF2α in TECs zu Veränderungen bei der Generierung eines funktionellen Thymus und vor allem von mTECs führt. Ob der Verlust des medullären Kompartimentes ausschließlich auf einen intrinsischen Effekt oder aber zusätzlich auf einen durch die Abwesenheit von Thymozyten sekundären Effekt zurück zu führen ist, bleibt hier offen. Der Verlust des regulatorischen T-Zellkompartimentes und die Expansion des Effektor-Gedächtnis-T-Zellpools werden als Konsequenz des verminderten mTEC-Kompartimentes gedeutet.

Es stellte sich die Frage, ob durch die Eliminierung der durch HIF2α-Überexpression vermittelten schädigenden Effekte im *Vhl*-defizienten Kontext der Thymus gerettet werden könnte. Das Ziel nachfolgender Untersuchungen war es daher, die Auswirkungen der simultanen Deletion von *Hif2α* im *Vhl*-defizienten Hintergrund in *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2α*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup>-Mäuse) zu untersuchen. Die Tatsache, dass im Gegensatz zu *VhIKO*<sup>Foxn1</sup>-Thymi CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>DP sich in den sehr kleinen Thymus-ähnlichen *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Gewebe entwickeln konnten spricht für eine Teilrettung des Thymus durch den zusätzlichen *Hif2α*-Verlust. Der Nachweis von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>DP Thymozyten in *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Thymi beweist indirekt das Vorhandensein von cTECs, deren Notch-Signal für die Generierung von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>DPs benötigt wird (Ferrero et al., 2013). Dass die Teilrettung auch das TEC-Kompartiment betrifft wird durch den Nachweis von, wenn auch nur wenigen, TECs deutlich, innerhalb derer sogar UEA<sup>high</sup> mTECs detektierbar waren. Die Teilrettung des Thymus durch die simultane *Hif2α*-Inaktivierung ging in HE- und Immunfluoreszenzfärbungen mit einer ungeordneten Thymusorganstruktur einher. Die PAS-positiven Kryo-Schnitte der *Vhl*;*Hif2α*KO<sup>Foxn1</sup>-Thymi weisen auf Kohlenhydrat-Einlagerungen hin, die insgesamt stärker sind als in HIF2dPA<sup>Foxn1</sup>-Thymi. Die Tatsache, dass in *VhIKO*<sup>Foxn1</sup>-Thymusanlagen Glykogenakkumulationen vorliegen, erlaubt die Annahme, dass es sich in *Vhl*;*Hif2α*<sup>Foxn1</sup>-Thymi ebenfalls um Glykogeneinlagerungen handelt. Vermutlich wurde diese ausgeprägte Glykogeneinlagerung durch die über den *Vhl*-Verlust induzierte HIF1α Stabilisierung verursacht. HIF1α-Stabilisierung kann über die Hochregulierung der Glykoneogenese zu einer gesteigerten Glykogeneinlagerung führen (Tajima et al., 2009).

Die partielle Rettung des  $VhlKO^{Foxn1}$ -Thymus durch die zusätzliche Deletion von *Hif2a* gibt Grund zur Annahme, dass die fehlende negative Regulation von HIF1 $\alpha$  an der Thymusatrophie von  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäusen beteiligt ist.

### **Der Thymusverlust von $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäusen ist durch die fehlende negative Regulation von HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$ bedingt**

Die Daten der  $VhlKO^{Foxn1}$ -,  $HIF2dPA^{Foxn1}$ - und der  $Vhl;Hif2aKO^{Foxn1}$ -Mäuse weisen auf eine wichtige *Vhl*-Rolle bei der Interaktion von HIF2 $\alpha$  im Thymusepithel hin. Obwohl mit den Daten der  $HIF1dPA^{Foxn1}$ -Mäuse eine weniger bedeutende Rolle von HIF1 $\alpha$  in TECs anzunehmen war, wurde in  $Vhl;Hif1\alpha;Hif2aKO^{Foxn1}$ -Mäusen untersucht, ob die fehlende negative Regulation von HIF1 $\alpha$  in  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäusen ebenso mitverantwortlich für die Thymusatrophie ist. Die erfolgreiche Deletion von *Vhl*, *Hif1 $\alpha$*  und *Hif2a* wurde in sortierten TECs von  $Vhl;Hif1\alpha;Hif2a^{Foxn1}$ -Mäusen ( $Vhl^{loxP/loxP};Hif1\alpha^{loxP/loxP};Hif2a^{loxP/loxP};Foxn1^{+/cre}$ -Mäuse) nachgewiesen. Die innerhalb der PCR an der Schwanzspitzen-DNA ermittelten Daten weisen auf die, in den Keratinozyten der supradermalen Schicht der Schwanzspitzenhaut vorhandene, *Foxn1-Cre*-Aktivität hin. Die innerhalb der *Vhl*-PCR auftretende starke  $Vhl^{\Delta}$ -Bande ist darauf zurück zu führen, dass die PCR bevorzugt das kleinere Produkt amplifiziert ( $Vhl^{loxP}$  600bp,  $Vhl^{\Delta}$  300bp). Die Tatsache, dass mit der gleichzeitigen *Hif1 $\alpha$* - und *Hif2a*-Deletion im TEC-spezifischen *Vhl*-defizienten Hintergrund der Thymus komplett gerettet wurde, zeigen, dass der athymische Phänotyp in  $VhlKO^{Foxn1}$ -Mäusen durch einen HIF-abhängigen VHL-Mechanismus entstanden ist. Die Daten insgesamt sprechen dafür, dass die fehlende negative Regulation von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  für die Thymusatrophie verantwortlich ist.



**Abbildung 44 Die bedeutende Rolle des von Hippel-Lindau-Gens innerhalb von TECs für die Entwicklung eines funktionsfähigen Thymus.**

*Vhl* ist innerhalb von TECs essentiell für die Entwicklung eines normalen funktionsfähigen Thymus. Der *Foxn1-Cre*-vermittelte *Vhl*-Verlust führt zwar zur Entstehung einer Thymusanlage. Diese atrophiert jedoch während der Embryonalentwicklung und ist nicht in der Lage die T-Zellentwicklung zu unterstützen. Nicht die Überexpression von HIF1α, jedoch die Überexpression von HIF2α führt zu einem dysfunktionellen Thymus, in dem das mTEC-Kompartiment stark beeinträchtigt ist. Wird der schädigende Einfluss von HIF2α durch zusätzliche Deletion des *Hif2α*-Gens im *Vhl*-defizienten Kontext ausgeschaltet so wird der Thymus partiell wieder hergestellt. Es finden sich T-Zellentwicklungsstufen als auch vereinzelt TECs. Dieses weist auf die essentielle Rolle von pVHL für die negative Regulation von HIF2α hin. Die simultane Deletion von *Hif1α* und *Hif2α* in *Vhl*KO<sup>Foxn1</sup>-Mäusen rettet den Thymus komplett und beweist, dass pVHL in TECs auch für die negative Regulation HIF1α extrem bedeutend ist.

Aus den Daten dieser Arbeit lässt sich schliessen, dass pVHL innerhalb von TECs eine essentielle Rolle für die negative Regulation von HIF1α und HIF2α zukommt. Ist die Inhibition von HIF1α und HIF2α nicht mehr vorhanden, ist bereits die Entwicklung des frühen Thymus in der Embryonalentwicklung gestört und die Entstehung von T-Zellen kommt nicht zustande. Diese Daten beweisen die essentielle Bedeutung von pVHL in der Thymusorganogenese.

In Patienten mit von Hippel-Lindau-Syndrom ist die heterozygote Keimbahn-Mutation von *VHL* in allen Zellen vorhanden. In Geweben, in denen auch das verbliebene *VHL*-Allel durch Mutation verloren geht (*loss of heterocycosity*, LOH) entwickeln sich hoch vaskularisierte Tumoren, insbesondere im ZNS, in den Nieren, den Nebennieren, dem Pankreas und den Fortpflanzungsorganen (Lonser et al., 2003; Latif et al., 1993). Durch die LOH haben die Tumorzellen einen kompletten Vorteil gegenüber Zellen ohne LOH. Würde eine LOH bei VHL-Patienten innerhalb einer Thymusepithelzelle passieren, so würde dies nach den Erkenntnissen dieser Arbeit einen erheblichen Selektionsnachteil gegenüber Zellen ohne LOH geben. Damit würde ein LOH-TEC von TECs ohne LOH kompetitiv verdrängt werden.

## 8 Ausblick

Der Thymus ist verantwortlich für die Entwicklung von immunkompetenten T-Zellen, die in der Lage sind Fremd- von Selbstantigenen zu unterscheiden. Die Involution des Thymus geht mit einem starken Verlust an TECs und Thymozyten einher und kann durch verschiedene physiologische (Alter, Schwangerschaft) oder externe pathologische (Infektionen, Stress, Strahlen- oder Chemotherapie) Stimuli ausgelöst werden (Papadopoulou et al., 2011; Dooley and Liston, 2012). Eine pharmakologische Beeinflussung der Thymusinvolution könnte dementsprechend bei Infektionen oder nach antineoplastischer Behandlung von positiven Nutzen sein.

Chemo- und Strahlentherapie haben insbesondere eine toxische Wirkung auf TECs. In Abhängigkeit von der Therapiedosis sind TECs in der Lage zu regenerieren und die Thymozytenentwicklung wieder zu unterstützen. In unterschiedlichen Zelltypen ist die Empfindlichkeit gegenüber anti-neoplastischen Therapien von der zellulären HIF1 $\alpha$ -Verfügbarkeit, dem Oxygenisierungszustand der Zellen und der zellulären ROS (*reactive oxygen species*)-Konzentration abhängig (Meijer et al., 2012; Brokers et al., 2010). Dies spricht für eine mögliche Beteiligung des Hypoxie-Signalweges an der Empfindlichkeit gegenüber strahlentherapeutischen und chemotherapeutischen Maßnahmen. HIF1 $\alpha$  könnte einen protektiven Effekt auf die schädigenden Wirkungen von Strahlen- und Chemotherapie haben. Demnach würde der Verlust von HIF1 $\alpha$  zur Erhöhung der Sensibilität führen und die Thymusregeneration erschweren. Eine Überexpression des möglicherweise protektiven HIF1 $\alpha$  könnte die Thymusregeneration begünstigen. Die während dieser Arbeit analysierten Mäuse mit einer Deletion ( $Hif1\alpha KO^{Foxn1}$ ) oder einer Überexpression ( $HIF1dPA^{Foxn1}$ ) von *Hif1 $\alpha$*  in „*steady-state*“ TECs wiesen unauffällige Thymozyten- und TEC-Kompartimente auf. Es wäre interessant  $Hif1\alpha KO^{Foxn1}$ - und Kontroll-Mäuse subletal zu bestrahlen, um anschließend die T-Zellentwicklung und die Regeneration des TEC-Kompartiments in Hinblick auf eine Thymusregeneration zu analysieren. Ebenso interessant wäre, die Bestrahlung und Analyse von  $HIF1dPA^{Foxn1}$ -Mäusen und Kontrollen. Die Ergebnisse würden Hinweise erbringen, ob die pharmakologische Modifikation des Hypoxie-Signalweges die Regeneration des Thymus nach antineoplastischer Therapie fördern könnte.

Die Produktion von DNA- und Protein-schädigenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist eine der zellulären Reaktionen auf Bestrahlung. Normalerweise erfolgt durch die Stabilisierung von Hif1 $\alpha$  die Induktion von glykolytischen Prozessen, deren metabolische Produkte wie Laktat, Glutathion und NADPH ROS inaktivieren. Es wäre von Interesse, die möglicherweise verminderte ROS-Inaktivierung in  $Hif1\alpha KO^{Foxn1}$ -Mäusen nach Abschluss einer Strahlentherapie zu untersuchen.

Die Regeneration der TECs nach antineoplastischen Therapien wird über den IL-22-Signalweg kontrolliert (Dudakov et al., 2012). Eine offene Frage ist, ob die Expression des IL-22-Rezeptors an TECs durch den Hypoxie-Signalweg beeinflusst wird. Um dieses zu klären, könnte die IL-22-R-Expression an TECs von bestrahlten Hif1 $\alpha$ KO<sup>Foxn1</sup>- und HIF1dPA<sup>Foxn1</sup>-Mäusen analysiert werden.

Als Zytostatikum wird Cyclophosphamid eine TEC-toxische Wirkung zugeschrieben, die erst nach über 14 Tagen eine Regeneration ermöglicht (Fletcher et al., 2009). Es wäre ebenfalls von Interesse die Thymusregeneration von Cyclophosphamid-behandelten Mäusen mit genetisch moduliertem Hif1 $\alpha$  (Hif1 $\alpha$ KO<sup>Foxn1</sup>; HIF1dPA) detailliert zu untersuchen.

Im Darmepithel konnte bereits ein HIF2-abhängiger radioprotektiver Effekt des allgemeinen Prolylhydroxylase-Inhibitors DMOG nachgewiesen werden (Taniguchi et al., 2014). Falls in TECs HIF1 $\alpha$  einen protektiven Effekt gegen die schädigenden Auswirkungen durch Chemo- oder Strahlentherapie besitzt, wäre eine pharmakologische Verstärkung möglicherweise ein hilfreicher Ansatz zur Präkonditionierung antineoplastischer Therapien. Es wäre von Interesse, die Auswirkungen der systemischen DMOG-Behandlung vor und nach Bestrahlung durch Analyse der TECs und Thymozytensubpopulationen aufzuklären.

Weitere interessante Fragestellungen ergeben sich bei Neoplasien, die von TECs ausgehen. Thymus-Neoplasien (Thymome) sind zwar selten, gehen aber häufig mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie Myasthenia gravis, einher. Hier wäre es interessant zu untersuchen, wie der Hypoxie-Signalweg innerhalb von Thymomen verändert ist und ob mit Hilfe des Einsatzes von HIF-Mimetika die Thymusfunktion und das neoplastische Wachstum verändert werden könnte.

## 9 Zusammenfassung

Thymusepithelzellen (TEC) kontrollieren innerhalb einer hypoxischen Mikroumgebung die Generierung und Selektion von funktionellen T-Zellen. Dies könnte dafür sprechen, dass der molekulare Hypoxie-Signalweg TEC-Funktionen innerhalb des Thymus reguliert.

Um den Einfluss des Hypoxie-Signalweges auf TECs zu untersuchen, wurden TEC Zelllinien *in vitro* hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die Verminderung des Sauerstoffangebotes hatte einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von TEC-Zelllinien und führte zur Induktion von Zielgenen des Hypoxie-Signalweges. Innerhalb des Hypoxie-Signalweges ist das von Hippel-Lindau-Protein (pVHL) der negative Regulator der Hypoxie-induzierbaren Faktoren-1 $\alpha$  und 2 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ ). Um innerhalb von murinen TECs *in vivo* genetisch eine Aktivierung des Hypoxie-Signalweges zu induzieren, wurde in TECs das *von Hippel-Lindau* Gen (*Vhl*) mittels des *Foxn1-Cre*-Transgens inaktiviert (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup> Mäuse). Diese Mäuse zeigten den kompletten Verlust des Thymus als Organ. Im residualen mediastinalen Gewebe konnten weder T-Zellentwicklungsvorstufen noch TECs nachgewiesen werden. Entsprechend waren die peripheren lymphatischen Organe durch das fast komplette Fehlen reifer T-Zellen gekennzeichnet. In *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>-Embryonen konnten rudimentäre Thymi nachgewiesen werden, die kaum reife TECs enthielten. Demensprechend ist von einer embryonalen Aplasie des physiologisch angelegten Thymus bei diesen Mäusen auszugehen. Um zu ermitteln, ob der zelluläre Überschuss von HIF2 $\alpha$  im *Vhl*-defizienten Kontext für den athymischen Phänotyp verantwortlich ist, wurde eine pVHL-unempfindliche HIF2 $\alpha$ -Variante in TECs (*Rosa26*<sup>+loxP</sup>; *Hif2dPA*; *Foxn1*<sup>+cre</sup>) überexprimiert. Dabei phänokopierte die HIF2 $\alpha$ -Überexpression teilweise die *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>-Thymusaplasie. Demnach war anzunehmen, dass die fehlende negative Regulation von HIF2 $\alpha$  für den athymischen Phänotyp von *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup> Mäuse mitverantwortlich ist. Um diese Annahme genetisch *in vivo* zu beweisen, deletierten wir *Hif2 $\alpha$*  zusätzlich zu *Vhl* in TECs (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif2 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>-Mäuse). Hier konnten wir in adulten Mäusen im Gegensatz zu *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>-Mäusen einen Thymus nachweisen. Jedoch konnte der aplastische *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>-Thymus durch die zusätzliche *Hif2 $\alpha$* -Deletion nur teilweise gerettet werden. Schließlich wurden Mäuse mit einer Inaktivierung von *Hif1 $\alpha$* , *Hif2 $\alpha$*  und *Vhl* in TECs (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif1 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>; *Hif2 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+cre</sup>-Mäuse) generiert. In diesen Mäusen kam es zu einer kompletten Rettung des Thymus. Diese waren im Vergleich zu Kontrollthymi (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>; *Hif1 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>; *Hif2 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>; *Foxn1*<sup>+/+</sup>) normal groß, anatomisch normal konfiguriert und in der Lage periphere T-Zellen zu generieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass für die Entwicklung und die Funktion des Thymus eine effiziente negative Kontrolle des Hypoxie-Signalweges durch pVHL innerhalb von TECs von essentieller Bedeutung ist.

## 10 Summary

Thymic epithelial cells (TECs) control the generation and selection of T-cells within a highly specialized hypoxic microenvironment. Therefore, the ubiquitous hypoxic-response-pathway might regulate TEC functions within the thymus.

In order to examine the impact of the hypoxia-response-pathway on TEC function we exposed TEC cell lines to hypoxia *in vitro*. Reduced oxygen tension had a negative impact on cell line growth and resulted in the induction of hypoxic-response-pathway target genes. Within the hypoxic-response-pathway the von Hippel-Lindau protein (pVHL) negatively regulates the hypoxia inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ ). For the *in vivo* activation of the hypoxia-response-pathway in TECs we deleted the *von Hippel-Lindau gene* (*Vhl*) using the *Foxn1-Cre* transgene (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> mice). *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> mice revealed the complete absence of the thymus. The residual mediastinal tissue of *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> mice did neither contain developing thymocytes nor TECs. Accordingly, peripheral lymphoid organs were devoid of mature T-cells. *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> embryos showed rudimentary thymus *anlagen* with rarely detectable TECs. Thus, *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> mice show aplasia of the early developing thymus. To investigate whether the cellular HIF2 $\alpha$  excess mediated by pVHL loss is responsible for the athymic phenotype we analyzed mice overexpressing a pVHL-insensitive HIF2 $\alpha$ -variant in TECs (*Rosa26*<sup>+loxP/Hif2dPA</sup>, *Foxn1*<sup>+cre</sup> mice). The thymi of these mice partially phenocopied the *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> thymic aplasia. These data implied that the lack of HIF2 $\alpha$  inhibition by pVHL is responsible for the athymic phenotype in *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> mice. In order to confirm this we simultaneously deleted *Hif2 $\alpha$*  and *Vhl* in TECs (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup>-mice). In contrast to *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> mice thymic tissue was detectable in adult *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup>-mice. However, the aplastic *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> thymus was only partially rescued by the additional deletion of *Hif2 $\alpha$* . Finally, we generated mice with TEC-specific deletion of *Hif1 $\alpha$* , *Hif2 $\alpha$*  and *Vhl* (*Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif1 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> mice). Indeed, in these mice the thymus was completely rescued. *Vhl*<sup>loxP/loxP</sup>;*Hif1 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>;*Hif2 $\alpha$* <sup>loxP/loxP</sup>;*Foxn1*<sup>+cre</sup> thymi were normal in size and structure and were able to generate mature T cells.

In summary, the negative control of the hypoxia-response-pathway by pVHL in TECs is essential for the development of a functional thymus.

## 11 Anhang

### PCR Protokolle

#### Detektion des ROSA-Reporter-Lokus

Konz.	Komponente	$\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	14,3
20 $\mu$ M	Primer #12	0,6
20 $\mu$ M	Primer #13	0,24
20 $\mu$ M	Primer #14	0,36
25 mM	dNTPs	0,2
5x	Puffer	4,8
25mM	MgCl <sub>2</sub>	2,4
5 U/ $\mu$ l	Taq Polymerase	0,1
	Probe	1
	Gesamtvolumen	24
$^{\circ}$ C	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	30 sec	35x
56	50 sec	
72	1 min	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

#### Detektion des wt und des Foxn1-Cre-Allels

Konz.	Komponente	$\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	12,34
20 $\mu$ M	Primer #329	0,2
20 $\mu$ M	Primer #330	0,2
20 $\mu$ M	Primer #331	0,4
25 mM	dNTPs	0,16
5x	Puffer	4
25mM	MgCl <sub>2</sub>	1,6
5 U/ $\mu$ l	Taq Polymerase	0,1
	Probe	1
	Gesamtvolumen	20
$^{\circ}$ C	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	15 sec	35x
58	30 sec	
72	1 min	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

#### Detektion des Vhl-wt, Vhl <sup>$\Delta$</sup> und Vhl<sup>loxP</sup>-Allels

Konz.	Komponente	$\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	12,54
20 $\mu$ M	Primer #75	0,2
20 $\mu$ M	Primer #76	0,2
20 $\mu$ M	Primer #74	0,2
25 mM	dNTPs	0,16
5x	Puffer	4
25mM	MgCl <sub>2</sub>	1,6
5 U/ $\mu$ l	Taq Polymerase	0,1
	Probe	1
	Gesamtvolumen	20
$^{\circ}$ C	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	15 sec	35x
55	15 sec	
72	50 sec	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

#### Detektion (nested PCR) des Vhl-wt, Vhl <sup>$\Delta$</sup> und Vhl<sup>loxP</sup>-Allels zur Deletionsanalyse aus sortierten TECs

Konz.	Komponente	$\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	12,54
20 $\mu$ M	Primer #430	0,2
20 $\mu$ M	Primer #432	0,2
20 $\mu$ M	Primer #435	0,2
25 mM	dNTPs	0,16
5x	Puffer	4
25mM	MgCl <sub>2</sub>	1,6
5 U/ $\mu$ l	Taq Polymerase	0,1
	Probe	1
	Gesamtvolumen	20
$^{\circ}$ C	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	15 sec	35x
55	15 sec	
72	50 sec	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

**Detektion  
des Hif1 $\alpha$  wt, Hif1 $\alpha^{\Delta}$  und Hif1 $\alpha^{\text{loxP}}$ -Allels**

Konz.	Komponente	$\mu\text{l}$
	H <sub>2</sub> O	8,94
20 $\mu\text{M}$	Primer #385	0,8
20 $\mu\text{M}$	Primer #386	0,2
20 $\mu\text{M}$	Primer #200	0,8
25 mM	dNTPs	0,16
5x	Puffer	4
25mM	MgCl <sub>2</sub>	4
5 U/ $\mu\text{l}$	Taq Polymerase	0,1
	Probe	1
	Gesamtvolumen	20
$^{\circ}\text{C}$	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	15 sec	35x
52	15 sec	
72	40 sec	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

**Detektion (nested PCR) des  
des Hif1 $\alpha$  wt, Hif1 $\alpha^{\Delta}$  und Hif1 $\alpha^{\text{loxP}}$ -Allels  
zur Deletionsanalyse aus sortierten TECs**

Konz.	Komponente	$\mu\text{l}$
	H <sub>2</sub> O	10,14
20 $\mu\text{M}$	Primer #436	0,2
20 $\mu\text{M}$	Primer #437	0,2
20 $\mu\text{M}$	Primer #438	0,2
25 mM	dNTPs	0,16
5x	Puffer	4
25mM	MgCl <sub>2</sub>	4
5 U/ $\mu\text{l}$	Taq Polymerase	0,1
	Probe	1
	Gesamtvolumen	20
$^{\circ}\text{C}$	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	15 sec	35x
52	15 sec	
72	40 sec	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

**Detektion  
des Hif2 $\alpha$  wt, Hif2 $\alpha^{\Delta}$  und Hif2 $\alpha^{\text{loxP}}$ -Allels**

Konz.	Komponente	$\mu\text{l}$
	H <sub>2</sub> O	11,94
20 $\mu\text{M}$	Primer #426	0,4
20 $\mu\text{M}$	Primer #427	0,4
20 $\mu\text{M}$	Primer #428	0,4
25 mM	dNTPs	0,16
5x	Puffer	4
25mM	MgCl <sub>2</sub>	1,6
5 U/ $\mu\text{l}$	Taq Polymerase	0,1
	Probe	1
	Gesamtvolumen	20
$^{\circ}\text{C}$	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	15 sec	35x
54	15 sec	
72	40 sec	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

### Nachweis der Hprt-, Vhl-, Hif2 $\alpha$ oder Foxn1-mRNA-Expression

Konz.	Komponente	$\mu$ l
	H2O	14,75
20 $\mu$ M	Expr.primers forw	0,2
20 $\mu$ M	Expr.primers rev	0,2
25 mM	dNTPs	0,2
5x	Puffer	5
25mM	MgCl <sub>2</sub>	2
5 U/ $\mu$ l	Taq Polymerase	0,15
	Probe	1
	Gesamtvolumen	2,5
$^{\circ}$ C	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	30 sec	33x
57	30 sec	
72	45 sec	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

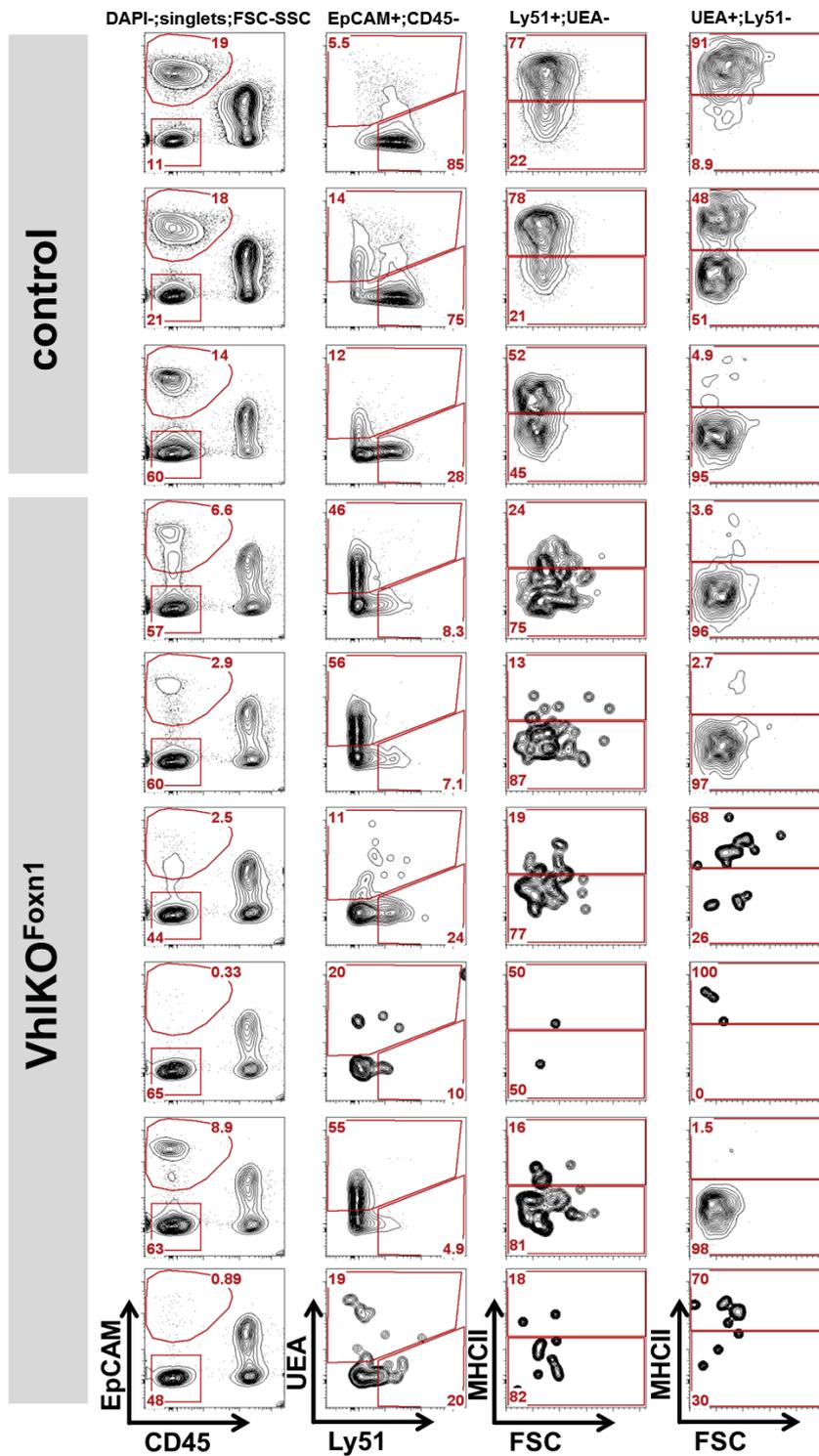
### Nachweis der Hif1 $\alpha$ -mRNA-Expression

Konz.	Komponente	$\mu$ l
	H2O	14,75
20 $\mu$ M	Expr.primers forw	0,2
20 $\mu$ M	Expr.primers rev	0,2
25 mM	dNTPs	0,2
5x	Puffer	5
25mM	MgCl <sub>2</sub>	2
5 U/ $\mu$ l	Taq Polymerase	0,15
	Probe	1
	Gesamtvolumen	2,5
$^{\circ}$ C	Zeit	Zyklen
95	10 min	1x
95	30 sec	33x
54	30 sec	
72	45 sec	
72	3 min	1x
4	$\infty$	

### TaqMan Real-time PCR-Protokoll

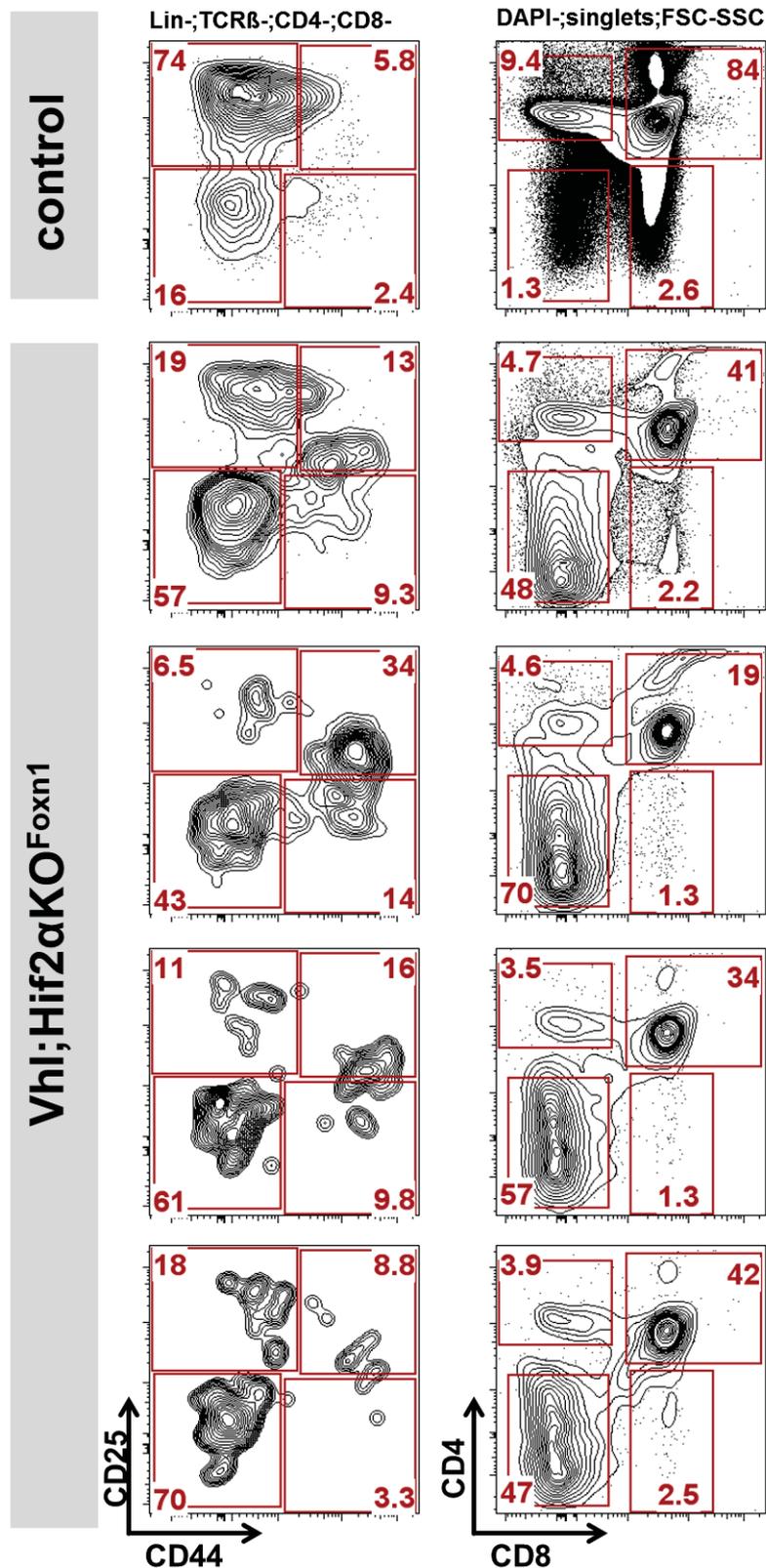
Konz.	Komponente	$\mu$ l
2x	MasterMix	10
20x	Assay	1
18ng	cDNA Probe	9
	Gesamtvolumen	20
$^{\circ}$ C	Zeit	Zyklen
95	20 sec	1
95	1 sec	40x
60	20 sec	
4	$\infty$	

## Aufstellung von ergänzenden Contour plots aus durchflusszytometrischen Analysen



**Abbildung 45** Zusammenstellung der Contour plots aus der durchflusszytometrischen Analyse der Thymusanlagen von E15,5-VhIKO<sup>Foxn1</sup> Embryonen.

Für die detaillierte Analyse der TEC-Subpopulationen wurden die enzymatisch verdauten Thymusanlagen von E15,5 VhIKO<sup>Foxn1</sup>- und Kontroll-Embryonen mit anti-EpCAM, -CD45, -Ly51, -MHCII und UEA gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert; Ergänzung zu Abbildung 20.



**Abbildung 46** Ergänzende Contour plots aus der durchflusszytometrischen Analyse der Thymi von  $Vhl;Hif2\alpha^{KO^{F_{oxn1}}}$ -Mäusen.

Thymuszellen wurden auf das Vorhandensein der Thymozyten- Entwicklungsstufen ( $CD44^+CD25^-DN1$ ,  $CD44^+CD25^+DN2$ ,  $CD44^+CD25^+DN3$ ,  $CD44^+CD25^+DN4$ ,  $CD4CD8DP$ ,  $CD4SP$  und  $CD8SP$  Thymozyten) hin durchflusszytometrisch analysiert; Alter der Mäuse 6 Wochen; Ergänzung zu Abbildung 33.

## 12 Literaturverzeichnis

Adkins,B., Gandour,D., Strober,S., and Weissman,I. (1988). Total lymphoid irradiation leads to transient depletion of the mouse thymic medulla and persistent abnormalities among medullary stromal cells. *J. Immunol.* 140, 3373-3379.

Aifantis,I., Raetz,E., and Buonamici,S. (2008). Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 380-390.

Akiyama,T., Shimo,Y., Yanai,H., Qin,J., Ohshima,D., Maruyama,Y., Asaumi,Y., Kitazawa,J., Takayanagi,H., Penninger,J.M., Matsumoto,M., Nitta,T., Takahama,Y., and Inoue,J. (2008). The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity.* 19;29, 423-437.

Alves,N.L., Huntington,N.D., Rodewald,H.R., and Di Santo,J.P. (2009). Thymic epithelial cells: the multi-tasking framework of the T cell "cradle". *Trends Immunol.* 30, 468-474.

Alves,N.L., Takahama,Y., Ohigashi,I., Ribeiro,A.R., Baik,S., Anderson,G., and Jenkinson,W.E. (2014). Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments. *Eur. J. Immunol.* 44, 16-22.

Anderson,M.S., Venanzi,E.S., Klein,L., Chen,Z., Berzins,S.P., Turley,S.J., von, B.H., Bronson,R., Dierich,A., Benoist,C., and Mathis,D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* 298, 1395-1401.

Apostolou,I., Sarukhan,A., Klein,L., and von, B.H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* 3, 756-763.

Aschenbrenner,K., D'Cruz,L.M., Vollmann,E.H., Hinterberger,M., Emmerich,J., Swee,L.K., Rolink,A., and Klein,L. (2007). Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 8, 351-358.

Biju,M.P., Neumann,A.K., Bensinger,S.J., Johnson,R.S., Turka,L.A., and Haase,V.H. (2004). Vhlh gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes. *Mol. Cell Biol.* 24, 9038-9047.

Blackburn,C.C., Augustine,C.L., Li,R., Harvey,R.P., Malin,M.A., Boyd,R.L., Miller,J.F., and Morahan,G. (1996). The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5742-5746.

Bleul,C.C., Corbeaux,T., Reuter,A., Fisch,P., Monting,J.S., and Boehm,T. (2006). Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature.* 441, 992-996.

Boehm,T. (2012). Self-renewal of thymocytes in the absence of competitive precursor replenishment. *J. Exp. Med.* 209, 1397-1400.

Boehm,T., Scheu,S., Pfeffer,K., and Bleul,C.C. (2003). Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J. Exp. Med.* 198, 757-769.

Bonito,A.J., Aloman,C., Fiel,M.I., Danzl,N.M., Cha,S., Weinstein,E.G., Jeong,S., Choi,Y., Walsh,M.C., and Alexandropoulos,K. (2013). Medullary thymic epithelial cell depletion leads to autoimmune hepatitis. *J. Clin. Invest* 123, 3510-3524.

- Bosma,M.J. and Carroll,A.M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 323-350.
- Boutin,A.T., Weidemann,A., Fu,Z., Mesropian,L., Gradin,K., Jamora,C., Wiesener,M., Eckardt,K.U., Koch,C.J., Ellies,L.G., Haddad,G., Haase,V.H., Simon,M.C., Poellinger,L., Powell,F.L., and Johnson,R.S. (2008). Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* **133**, 223-234.
- Braun,R.D., Lanzen,J.L., Snyder,S.A., and Dewhirst,M.W. (2001). Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **280**, H2533-H2544.
- Brokers,N., Le-Huu,S., Vogel,S., Hagos,Y., Katschinski,D.M., and Kleinschmidt,M. (2010). Increased chemoresistance induced by inhibition of HIF-prolyl-hydroxylase domain enzymes. *Cancer Sci.* **101**, 129-136.
- Cai,J. and Ma,L. (2011). Msx2 and Foxn1 regulate nail homeostasis. *Genesis.* **49**, 449-459.
- Calderon,L. and Boehm,T. (2012). Synergistic, context-dependent, and hierarchical functions of epithelial components in thymic microenvironments. *Cell.* **149**, 159-172.
- Carroll,A.M. and Bosma,M.J. (1991). T-lymphocyte development in scid mice is arrested shortly after the initiation of T-cell receptor delta gene recombination. *Genes Dev.* **5**, 1357-1366.
- Chen,L., Xiao,S., and Manley,N.R. (2009). Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* **113**, 567-574.
- Corbeaux,T., Hess,I., Swann,J.B., Kanzler,B., Haas-Assenbaum,A., and Boehm,T. (2010). Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16613-16618.
- Cowan,J.E., Parnell,S.M., Nakamura,K., Caamano,J.H., Lane,P.J., Jenkinson,E.J., Jenkinson,W.E., and Anderson,G. (2013). The thymic medulla is required for Foxp3+ regulatory but not conventional CD4+ thymocyte development. *J. Exp. Med.* **210**, 675-681.
- Cramer,T., Yamanishi,Y., Clausen,B.E., Forster,I., Pawlinski,R., Mackman,N., Haase,V.H., Jaenisch,R., Corr,M., Nizet,V., Firestein,G.S., Gerber,H.P., Ferrara,N., and Johnson,R.S. (2003). HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* **112**, 645-657.
- Dang,E.V., Barbi,J., Yang,H.Y., Jinasena,D., Yu,H., Zheng,Y., Bordman,Z., Fu,J., Kim,Y., Yen,H.R., Luo,W., Zeller,K., Shimoda,L., Topalian,S.L., Semenza,G.L., Dang,C.V., Pardoll,D.M., and Pan,F. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **146**, 772-784.
- Danzl,N.M., Donlin,L.T., and Alexandropoulos,K. (2010). Regulation of medullary thymic epithelial cell differentiation and function by the signaling protein Sin. *J. Exp. Med.* **207**, 999-1013.
- Dervovic,D. and Zuniga-Pflucker,J.C. (2010). Positive selection of T cells, an in vitro view. *Semin. Immunol.* **22**, 276-286.
- Doedens,A.L., Phan,A.T., Stradner,M.H., Fujimoto,J.K., Nguyen,J.V., Yang,E., Johnson,R.S., and Goldrath,A.W. (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat. Immunol.* **14**, 1173-1182.

- Dooley,J. and Liston,A. (2012). Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1073-1079.
- Dudakov,J.A., Hanash,A.M., Jenq,R.R., Young,L.F., Ghosh,A., Singer,N.V., West,M.L., Smith,O.M., Holland,A.M., Tsai,J.J., Boyd,R.L., and van den Brink,M.R. (2012). Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science.* **336**, 91-95.
- Emile,J.F., Lemoine,A., Azoulay,D., Debuire,B., Bismuth,H., and Reynes,M. (2001). Histological, genomic and clinical heterogeneity of clear cell hepatocellular carcinoma. *Histopathology* **38**, 225-231.
- Farr,A.G., Hosier,S., Braddy,S.C., Anderson,S.K., Eisenhardt,D.J., Yan,Z.J., and Robles,C.P. (1989). Medullary epithelial cell lines from murine thymus constitutively secrete IL-1 and hematopoietic growth factors and express class II antigens in response to recombinant interferon-gamma. *Cell Immunol.* **119**, 427-444.
- Ferrero,I., Koch,U., Claudinot,S., Favre,S., Radtke,F., Luther,S.A., and MacDonald,H.R. (2013). DL4-mediated Notch signaling is required for the development of fetal alphabeta and gammadelta T cells. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2845-2853.
- Fiorini,E., Ferrero,I., Merck,E., Favre,S., Pierres,M., Luther,S.A., and MacDonald,H.R. (2008). Cutting edge: thymic crosstalk regulates delta-like 4 expression on cortical epithelial cells. *J. Immunol.* **181**, 8199-8203.
- Fletcher,A.L., Lowen,T.E., Sakkal,S., Reiseger,J.J., Hammett,M.V., Seach,N., Scott,H.S., Boyd,R.L., and Chidgey,A.P. (2009). Ablation and regeneration of tolerance-inducing medullary thymic epithelial cells after cyclosporine, cyclophosphamide, and dexamethasone treatment. *J. Immunol.* **183**, 823-831.
- Frank,J., Pignata,C., Panteleyev,A.A., Prowse,D.M., Baden,H., Weiner,L., Gaetaniello,L., Ahmad,W., Pozzi,N., Cserhalmi-Friedman,P.B., Aita,V.M., Uyttendaele,H., Gordon,D., Ott,J., Brissette,J.L., and Christiano,A.M. (1999). Exposing the human nude phenotype. *Nature* **398**, 473-474.
- Frew,I.J. and Krek,W. (2008). pVHL: a multipurpose adaptor protein. *Sci. Signal.* **1**, e30.
- Gabler,J., Arnold,J., and Kyewski,B. (2007). Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 3363-3372.
- Gnarra,J.R., Ward,J.M., Porter,F.D., Wagner,J.R., Devor,D.E., Grinberg,A., Emmert-Buck,M.R., Westphal,H., Klausner,R.D., and Linehan,W.M. (1997). Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 9102-9107.
- Gordon,J. and Manley,N.R. (2011). Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development.* **138**, 3865-3878.
- Gordon,J., Wilson,V.A., Blair,N.F., Sheridan,J., Farley,A., Wilson,L., Manley,N.R., and Blackburn,C.C. (2004). Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat. Immunol.* **5**, 546-553.
- Gray,D.H., Seach,N., Ueno,T., Milton,M.K., Liston,A., Lew,A.M., Goodnow,C.C., and Boyd,R.L. (2006). Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood.* **108**, 3777-3785.

- Hale,L.P., Braun,R.D., Gwinn,W.M., Greer,P.K., and Dewhirst,M.W. (2002). Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **282**, H1467-H1477.
- Heng,T.S., Chidgey,A.P., and Boyd,R.L. (2010). Getting back at nature: understanding thymic development and overcoming its atrophy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 425-433.
- Hinterberger,M., Wirnsberger,G., and Klein,L. (2011). B7/CD28 in central tolerance: costimulation promotes maturation of regulatory T cell precursors and prevents their clonal deletion. *Front Immunol.* **2**, 30.
- Horak,P., Crawford,A.R., Vadysirisack,D.D., Nash,Z.M., DeYoung,M.P., Sgroi,D., and Ellisen,L.W. (2010). Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 4675-4680.
- Hunziker,L., Benitah,S.A., Braun,K.M., Jensen,K., McNulty,K., Butler,C., Potton,E., Nye,E., Boyd,R., Laurent,G., Glogauer,M., Wright,N.A., Watt,F.M., and Janes,S.M. (2011). Rac1 deletion causes thymic atrophy. *PLoS. ONE.* **6**, e19292.
- Irla,M., Hugues,S., Gill,J., Nitta,T., Hikosaka,Y., Williams,I.R., Hubert,F.X., Scott,H.S., Takahama,Y., Hollander,G.A., and Reith,W. (2008). Autoantigen-specific interactions with CD4+ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity.* **29**, 451-463.
- Jameson,S.C. (2005). T cell homeostasis: keeping useful T cells alive and live T cells useful. *Semin. Immunol.* **17**, 231-237.
- Jeker,L.T., Barthlott,T., Keller,M.P., Zuklys,S., Hauri-Hohl,M., Deng,C.X., and Hollander,G.A. (2008). Maintenance of a normal thymic microenvironment and T-cell homeostasis require Smad4-mediated signaling in thymic epithelial cells. *Blood.* **112**, 3688-3695.
- Jenkinson,W.E., Bacon,A., White,A.J., Anderson,G., and Jenkinson,E.J. (2008). An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. *J. Immunol.* **181**, 6101-6108.
- Jerome,L.A. and Papaioannou,V.E. (2001). DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat. Genet.* **27**, 286-291.
- Jiang,B.H., Semenza,G.L., Bauer,C., and Marti,H.H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am. J. Physiol* **271**, C1172-C1180.
- Kaech,S.M. and Ahmed,R. (2001). Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol.* **2**, 415-422.
- Kaelin,W.G., Jr. (2008). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 865-873.
- Keith,B., Johnson,R.S., and Simon,M.C. (2012). HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 9-22.
- Kelly,R.M., Highfill,S.L., Panoskaltsis-Mortari,A., Taylor,P.A., Boyd,R.L., Hollander,G.A., and Blazar,B.R. (2008). Keratinocyte growth factor and androgen blockade work in concert to protect against conditioning regimen-induced thymic epithelial damage and enhance T-cell reconstitution after murine bone marrow transplantation. *Blood.* **111**, 5734-5744.

- Kennedy,J.D., Pierce,C.W., and Lake,J.P. (1992). Extrathymic T cell maturation. Phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *J. Immunol.* *148*, 1620-1629.
- Khan,I.S., Taniguchi,R.T., Fasano,K.J., Anderson,M.S., and Jeker,L.T. (2014). Canonical microRNAs in thymic epithelial cells promote central tolerance. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1313-1319.
- Kim,W.Y., Safran,M., Buckley,M.R., Ebert,B.L., Glickman,J., Bosenberg,M., Regan,M., and Kaelin,W.G., Jr. (2006). Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor alpha phenocopies VHL inactivation in vivo. *EMBO J.* *25*, 4650-4662.
- Klausner,R.D., Lippincott-Schwartz,J., and Bonifacino,J.S. (1990). The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu. Rev. Cell Biol.* *6*, 403-431.
- Klein,L., Hinterberger,M., Wirnsberger,G., and Kyewski,B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 833-844.
- Klein,L., Klugmann,M., Nave,K.A., Tuohy,V.K., and Kyewski,B. (2000). Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* *6*, 56-61.
- Klug,D.B., Carter,C., Gimenez-Conti,I.B., and Richie,E.R. (2002). Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J. Immunol.* *169*, 2842-2845.
- Koch,U., Fiorini,E., Benedito,R., Besseyrias,V., Schuster-Gossler,K., Pierres,M., Manley,N.R., Duarte,A., MacDonald,H.R., and Radtke,F. (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp. Med.* *205*, 2515-2523.
- Krenger,W., Blazar,B.R., and Hollander,G.A. (2011). Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *117*, 6768-6776.
- Kurabayashi,A., Kakinuma,Y., Morita,T., Inoue,K., Sato,T., and Furihata,M. (2013). Conditional VHL gene deletion causes hypoglycemic death associated with disproportionately increased glucose uptake by hepatocytes through an upregulated IGF-I receptor. *PLoS. ONE.* *8*, e69139.
- Kurban,G., Duplan,E., Ramlal,N., Hudon,V., Sado,Y., Ninomiya,Y., and Pause,A. (2008). Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2. *Oncogene* *27*, 1004-1012.
- Kyewski,B. and Klein,L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* *24*:571-606., 571-606.
- Larmonie,N.S., van der Spek,A., Bogers,A.J., van Dongen,J.J., and Langerak,A.W. (2014). Genetic and epigenetic determinants mediate proneness of oncogene breakpoint sites for involvement in TCR translocations. *Genes Immun.* *15*, 72-81.
- Latif,F., Tory,K., Gnarr,J., Yao,M., Duh,F.M., Orcutt,M.L., Stackhouse,T., Kuzmin,I., Modi,W., Geil,L., and . (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* *260*, 1317-1320.
- Lee,D., Prowse,D.M., and Brissette,J.L. (1999). Association between mouse nude gene expression and the initiation of epithelial terminal differentiation. *Dev. Biol.* *208*, 362-374.

- Li,M. and Kim,W.Y. (2011). Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J. Cell Mol. Med.* *15*, 187-195.
- Lio,C.W., Dodson,L.F., Deppong,C.M., Hsieh,C.S., and Green,J.M. (2010). CD28 facilitates the generation of Foxp3(-) cytokine responsive regulatory T cell precursors. *J. Immunol.* *184*, 6007-6013.
- Lio,C.W. and Hsieh,C.S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity.* *28*, 100-111.
- Lolkema,M.P., Mehra,N., Jorna,A.S., van,B.M., Giles,R.H., and Voest,E.E. (2004). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein influences microtubule dynamics at the cell periphery. *Exp. Cell Res.* *301*, 139-146.
- Lonser,R.R., Glenn,G.M., Walther,M., Chew,E.Y., Libutti,S.K., Linehan,W.M., and Oldfield,E.H. (2003). von Hippel-Lindau disease. *Lancet* *361*, 2059-2067.
- Mackall,C.L., Fleisher,T.A., Brown,M.R., Andrich,M.P., Chen,C.C., Feuerstein,I.M., Magrath,I.T., Wexler,L.H., Dimitrov,D.S., and Gress,R.E. (1997). Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* *89*, 3700-3707.
- Majmundar,A.J., Wong,W.J., and Simon,M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* *40*, 294-309.
- Meijer,T.W., Kaanders,J.H., Span,P.N., and Bussink,J. (2012). Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clin. Cancer Res.* *18*, 5585-5594.
- Michalek,R.D. and Rathmell,J.C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol. Rev.* *236*, 190-202.
- Moeller,B.J., Cao,Y., Li,C.Y., and Dewhirst,M.W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* *5*, 429-441.
- Moeller,B.J., Dreher,M.R., Rabbani,Z.N., Schroeder,T., Cao,Y., Li,C.Y., and Dewhirst,M.W. (2005). Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* *8*, 99-110.
- Mori,K., Itoi,M., Tsukamoto,N., and Amagai,T. (2010). Foxn1 is essential for vascularization of the murine thymus anlage. *Cell Immunol.* *260*, 66-69.
- Mouri,Y., Yano,M., Shinzawa,M., Shimo,Y., Hirota,F., Nishikawa,Y., Nii,T., Kiyonari,H., Abe,T., Uehara,H., Izumi,K., Tamada,K., Chen,L., Penninger,J.M., Inoue,J., Akiyama,T., and Matsumoto,M. (2011). Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma. *J. Immunol.* *186*, 5047-5057.
- Muller,S.M., Terszowski,G., Blum,C., Haller,C., Anquez,V., Kuschert,S., Carmeliet,P., Augustin,H.G., and Rodewald,H.R. (2005). Gene targeting of VEGF-A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10587-10592.
- Nehls,M., Pfeifer,D., Schorpp,M., Hedrich,H., and Boehm,T. (1994). New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature.* *372*, 103-107.

- Nelson,A.J., Clegg,C.H., and Farr,A.G. (1998). In vitro positive selection and anergy induction of class II-restricted TCR transgenic thymocytes by a cortical thymic epithelial cell line. *Int. Immunol.* *10*, 1335-1346.
- Nowell,C.S., Bredenkamp,N., Tetelin,S., Jin,X., Tischner,C., Vaidya,H., Sheridan,J.M., Stenhouse,F.H., Heussen,R., Smith,A.J., and Blackburn,C.C. (2011). Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS. Genet.* *7*, e1002348.
- Nowell,C.S., Farley,A.M., and Blackburn,C.C. (2007). Thymus organogenesis and development of the thymic stroma. *Methods Mol. Biol.* *380:125-62.*, 125-162.
- Papadopoulou,A.S., Dooley,J., Linterman,M.A., Pierson,W., Ucar,O., Kyewski,B., Zuklys,S., Hollander,G.A., Matthys,P., Gray,D.H., De,S.B., and Liston,A. (2011). The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN-alpha receptor. *Nat. Immunol.* *13*, 181-187.
- Park,S.K., Haase,V.H., and Johnson,R.S. (2007). von Hippel Lindau tumor suppressor regulates hepatic glucose metabolism by controlling expression of glucose transporter 2 and glucose 6-phosphatase. *Int. J. Oncol.* *30*, 341-348.
- Perry,J.S., Lio,C.W., Kau,A.L., Nutsch,K., Yang,Z., Gordon,J.I., Murphy,K.M., and Hsieh,C.S. (2014). Distinct contributions of aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus. *Immunity.* *41*, 414-426.
- Pignata,C., Gaetaniello,L., Masci,A.M., Frank,J., Christiano,A., Matrecano,E., and Racioppi,L. (2001). Human equivalent of the mouse Nude/SCID phenotype: long-term evaluation of immunologic reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* *97*, 880-885.
- Porritt,H.E., Rumpfelt,L.L., Tabrizifard,S., Schmitt,T.M., Zuniga-Pflucker,J.C., and Petrie,H.T. (2004). Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity.* *20*, 735-745.
- Pugh,C.W. and Ratcliffe,P.J. (2003). The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin. Cancer Biol.* *13*, 83-89.
- Raaijmakers,M.H. (2012). Myelodysplastic syndromes: revisiting the role of the bone marrow microenvironment in disease pathogenesis. *Int. J. Hematol.* *95*, 17-25.
- Ramsdell,F. and Fowlkes,B.J. (1990). Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* *248*, 1342-1348.
- Randle-Barrett,E.S. and Boyd,R.L. (1995). Thymic microenvironment and lymphoid responses to sublethal irradiation. *Dev. Immunol.* *4*, 101-116.
- Reeh,K.A., Cardenas,K.T., Bain,V.E., Liu,Z., Laurent,M., Manley,N.R., and Richie,E.R. (2014). Ectopic TBX1 suppresses thymic epithelial cell differentiation and proliferation during thymus organogenesis. *Development* *141*, 2950-2958.
- Rocha,B. (2007). The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut. *Immunol. Rev.* *215:166-77.*, 166-177.
- Rodewald,H.R. (2008). Thymus organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* *26:355-88.*, 355-388.

- Rodewald,H.R., Kretzschmar,K., Swat,W., and Takeda,S. (1995). Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo. *Immunity*. **3**, 313-319.
- Rodewald,H.R., Paul,S., Haller,C., Bluethmann,H., and Blum,C. (2001). Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature*. **414**, 763-768.
- Romano,R., Palamaro,L., Fusco,A., Giardino,G., Gallo,V., Del,V.L., and Pignata,C. (2013). FOXP1: A Master Regulator Gene of Thymic Epithelial Development Program. *Front Immunol*. **4**, 187.
- Rossi,S., Blazar,B.R., Farrell,C.L., Danilenko,D.M., Lacey,D.L., Weinberg,K.I., Krenger,W., and Hollander,G.A. (2002). Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood*. **100**, 682-691.
- Rossi,S.W., Jenkinson,W.E., Anderson,G., and Jenkinson,E.J. (2006). Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*. **441**, 988-991.
- Rossi,S.W., Kim,M.Y., Leibbrandt,A., Parnell,S.M., Jenkinson,W.E., Glanville,S.H., McConnell,F.M., Scott,H.S., Penninger,J.M., Jenkinson,E.J., Lane,P.J., and Anderson,G. (2007). RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med*. **204**, 1267-1272.
- Rothenberg,E.V., Moore,J.E., and Yui,M.A. (2008). Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat. Rev. Immunol*. **8**, 9-21.
- Russell,R.C., Sufan,R.I., Zhou,B., Heir,P., Bunda,S., Sybingco,S.S., Greer,S.N., Roche,O., Heathcote,S.A., Chow,V.W., Boba,L.M., Richmond,T.D., Hickey,M.M., Barber,D.L., Cheresch,D.A., Simon,M.C., Irwin,M.S., Kim,W.Y., and Ohh,M. (2011). Loss of JAK2 regulation via a heterodimeric VHL-SOCS1 E3 ubiquitin ligase underlies Chuvash polycythemia. *Nat. Med*. **17**, 845-853.
- Sallusto,F., Geginat,J., and Lanzavecchia,A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol*. **22**, 745-763.
- Sallusto,F., Lenig,D., Forster,R., Lipp,M., and Lanzavecchia,A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712.
- Saran,N., Lyszkiewicz,M., Pommerencke,J., Witzlau,K., Vakilzadeh,R., Ballmaier,M., von,B.H., and Krueger,A. (2010). Multiple extrathymic precursors contribute to T-cell development with different kinetics. *Blood*. **115**, 1137-1144.
- Seggewiss,R. and Einsele,H. (2010). Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* **115**, 3861-3868.
- Semenza,G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**, 399-408.
- Shakib,S., Desanti,G.E., Jenkinson,W.E., Parnell,S.M., Jenkinson,E.J., and Anderson,G. (2009). Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells. *J. Immunol*. **182**, 130-137.

- Shortman,K. and Wu,L. (1996). Early T lymphocyte progenitors. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 29-47.
- Shoshani,T., Faerman,A., Mett,I., Zelin,E., Tenne,T., Gorodin,S., Moshel,Y., Elbaz,S., Budanov,A., Chajut,A., Kalinski,H., Kamer,I., Rozen,A., Mor,O., Keshet,E., Leshkowitz,D., Einat,P., Skaliter,R., and Feinstein,E. (2002). Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 22, 2283-2293.
- Starr,T.K., Jameson,S.C., and Hogquist,K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:139-76. *Epub; %2002 Oct 16.*, 139-176.
- Tajima,T., Goda,N., Fujiki,N., Hishiki,T., Nishiyama,Y., Senoo-Matsuda,N., Shimazu,M., Soga,T., Yoshimura,Y., Johnson,R.S., and Suematsu,M. (2009). HIF-1alpha is necessary to support gluconeogenesis during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 789-794.
- Taniguchi,C.M., Miao,Y.R., Diep,A.N., Wu,C., Rankin,E.B., Atwood,T.F., Xing,L., and Giaccia,A.J. (2014). PHD inhibition mitigates and protects against radiation-induced gastrointestinal toxicity via HIF2. *Sci. Transl. Med.* 6, 236ra64.
- Terszowski,G., Muller,S.M., Bleul,C.C., Blum,C., Schirmbeck,R., Reimann,J., Pasquier,L.D., Amagai,T., Boehm,T., and Rodewald,H.R. (2006). Evidence for a functional second thymus in mice. *Science.* 312, 284-287.
- Thompson,P.K. and Zuniga-Pflucker,J.C. (2011). On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. *Semin. Immunol.* 23, 350-359.
- Tun,H.W., Marlow,L.A., von Roemeling,C.A., Cooper,S.J., Kreinest,P., Wu,K., Luxon,B.A., Sinha,M., Anastasiadis,P.Z., and Copland,J.A. (2010). Pathway signature and cellular differentiation in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS. ONE.* 5, e10696.
- Ucar,A., Ucar,O., Klug,P., Matt,S., Brunk,F., Hofmann,T.G., and Kyewski,B. (2014). Adult Thymus Contains FoxN1(-) Epithelial Stem Cells that Are Bipotent for Medullary and Cortical Thymic Epithelial Lineages. *Immunity.* 41, 257-269.
- Vang,K.B., Yang,J., Pagan,A.J., Li,L.X., Wang,J., Green,J.M., Beg,A.A., and Farrar,M.A. (2010). Cutting edge: CD28 and c-Rel-dependent pathways initiate regulatory T cell development. *J. Immunol.* 184, 4074-4077.
- Vassar,R., Rosenberg,M., Ross,S., Tyner,A., and Fuchs,E. (1989). Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 1563-1567.
- Venanzi,E.S., Gray,D.H., Benoist,C., and Mathis,D. (2007). Lymphotoxin pathway and Aire influences on thymic medullary epithelial cells are unconnected. *J. Immunol.* 179, 5693-5700.
- Williams,K.M., Mella,H., Lucas,P.J., Williams,J.A., Telford,W., and Gress,R.E. (2009). Single cell analysis of complex thymus stromal cell populations: rapid thymic epithelia preparation characterizes radiation injury. *Clin. Transl. Sci.* 2, 279-285.
- Zamisch,M., Moore-Scott,B., Su,D.M., Lucas,P.J., Manley,N., and Richie,E.R. (2005). Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J. Immunol.* 174, 60-67.
- Zepeda,A.B., Pessoa,A., Jr., Castillo,R.L., Figueroa,C.A., Pulgar,V.M., and Farias,J.G. (2013). Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem. Funct.* 31, 451-459.

Zlotnik,A., Godfrey,D.I., Fischer,M., and Suda,T. (1992). Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J. Immunol.* *149*, 1211-1215.

Zuklys,S., Gill,J., Keller,M.P., Hauri-Hohl,M., Zhanybekova,S., Balciunaite,G., Na,K.J., Jeker,L.T., Hafen,K., Tsukamoto,N., Amagai,T., Taketo,M.M., Krenger,W., and Hollander,G.A. (2009). Stabilized beta-catenin in thymic epithelial cells blocks thymus development and function. *J. Immunol.* *182*, 2997-3007.

## 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Joachim R. Göthert für die Überlassung des spannenden Themas und die wissenschaftliche Anleitung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Ulrich Dührsen für die freundliche Aufnahme in sein Team bedanken.

Herrn Prof. Bertram Opalka danke ich insbesondere für die fast täglichen fachlichen Gespräche und das stete Interesse an dieser Arbeit.

An Herrn Prof. Jens Fischer geht mein besonderer Dank für die Betreuung und die wertvolle Unterstützung, durch die alles möglich wurde.

Herrn Prof. Ulrich Rütter danke ich insbesondere für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Ulf Dittmer danke ich sehr für die Erhebung der regulatorischen T-Zell-Daten.

Ein ganz besonderer Dank geht an Stefanie Weber und Mandy Necke für die Genotypisierung der Mäuse und die tatkräftige Unterstützung bei den Analysen.

Ein sehr herzlicher Dank geht an Michael Möllmann für so manche Unterstützung beim FACSen und in der Zellkultur.

Klaus Lennartz danke ich für durchflusszytometrische Sortierungen.

Weiterhin bedanke ich mich beim zentralen Tierlaboratorium, insbesondere Lars Thieme, für die zuverlässige Versorgung der Mäuse.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Erich Gulbins für die Bereitstellung des Kryotoms und Herrn Prof. Karl Lang für die Nutzung des Fluoreszenz-Mikroskopes. Dr. Hannes Klump danke ich für die Unterstützung bei der Hypoxie-Inkubation.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Kathrin Händschke für manch fachliche Hilfe.

Benedikt Pelzer, Stefanie Rost, Marie Zsesewitz und allen Mitarbeitern des Hämatologie-Forschungslabors danke ich für viele nette Begegnungen und unterstützende Gespräche.

Mein ganz besonderer Dank geht an Markus, Jan Peter und Linda für die aufmerksame Begleitung und den Rückhalt während dieser Zeit, insbesondere für die großartige Unterstützung auf der Zielgeraden.

## 14 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Anita Hollenbeck  
Geburtstag: 11. Februar 1963, Dinslaken  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet seit 1986 mit Prof. Dr. Markus Hollenbeck  
Kinder: Jan Peter geb. 1991 und Linda geb. 1992

### SCHULAUSSBILDUNG

---

1969 - 1973      Grundschule, Dinslaken  
1973 - 1982      Ernst-Barlach-Gymnasium, Dinslaken  
Abschluss: Abitur

### BERUFSAUSSBILDUNG

---

1982 -1984      Staatlich anerkannte Lehranstalt für MTA, Moers  
Zertifikat: Medizinisch-Technische Laboratoriumsassistentin  
1988 - 1990      berufsbegleitende Fachweiterbildung in Hämatologie, Klinische  
Immunologie und Hämostaseologie  
Zertifikat: DIW-Fachassistentin für Hämatologie

### BERUFSTÄTIGKEIT ALS MTA

---

01-06/ 1985      Med.-Diagnostisches Institut Drs. Hirtzel/ Hövener, Aachen  
Abteilung Mikrobiologie  
1985 - 1986      Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Blutspendedienst  
komm. Leiter Prof. G. Gillissen  
1986 - 1989      Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Abteilung für Neuroanatomie  
Direktor Prof. Dr. med. D. Graf v. Keyserlingk  
1989 - 1991      Klinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Zentralinstitut für  
Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik  
Direktor Prof. Rick  
1991 – 2003      Erziehungsurlaub  
2003 - 2010      Universitätsklinikum Essen, Institut für Medizinische Strahlenbiologie  
Direktor Prof. G. Iliakis

**STUDIUM**

---

- Juni 2008                      Aufnahmeprüfung HAN-University of Applied Sciences, Nijmegen, NL  
Bachelor-Äquivalenz
- 2008 - 2010                    HAN-University of Applied Sciences, Nijmegen, NL  
Masterstudiengang "Master of Molecular Life Sciences"  
Abschluss: Master of Molecular Life Sciences (MA Sc.)
- 01-06 / 2010                  Universitätsklinikum Essen, Abteilung Hämatologie, Prof. Dührsen, AG  
PD Dr. Jan Dürig  
Masterarbeit: „Hepatitis C virus infections in the pathogenesis of B-cell  
lymphoproliferative disorders“

**PROMOTIONSHINFÜHRENDE TÄTIGKEITEN UND STUDIEN**

---

- seit 01/2011                    Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen,  
Abteilung Hämatologie, Prof. Dührsen, AG Dr. Joachim R. Göthert  
Thema des Forschungsvorhabens : „**Das von Hippel-Lindau Protein  
ist essentiell für die Organogenese des Thymus**“
- SS11-SS2014                    BIOME, Graduate School of Biomedical Science  
Universitätsklinikum Essen/ University of Duisburg-Essen  
BIOME-Core-Einheit "Cellular and Molecular Immunity"
- SS12                              Vorlesung/ Seminar „Pathobiologie“ für Masterstudenten der Med.  
Biologie, Institut für Physiolog. Chemie, UK Essen
- seit 10/2012                    Mentee im Mentoring<sup>3</sup>-Programm der UAMR (Universitätsallianz  
Metropole Ruhr; Science Career Net Ruhr)

## 15 Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift